



**HAL**  
open science

# Caractérisation de la polarisation des macrophages pulmonaires humains et voies de régulation

Charlotte Abrial

► **To cite this version:**

Charlotte Abrial. Caractérisation de la polarisation des macrophages pulmonaires humains et voies de régulation. Biologie cellulaire. Université de Versailles-Saint Quentin en Yvelines, 2014. Français. NNT : 2014VERS0033 . tel-01326578

**HAL Id: tel-01326578**

**<https://theses.hal.science/tel-01326578>**

Submitted on 8 Dec 2016

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

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

**Université de Versailles Saint Quentin en Yvelines**

**UFR DES SCIENCES DE LA SANTÉ**

École doctorale GAO

"Des génomes aux organismes"

**Année universitaire 2014 – 2015**

N°

le 03 novembre 2014

**THESE DE DOCTORAT**

Présentée pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ VERSAILLES – SAINT QUENTIN EN YVELINES

Spécialité : Biologie cellulaire

Par

**Charlotte ABRIAL**

**Caractérisation de la polarisation des macrophages  
pulmonaires humains et voies de régulation**

Composition du jury:

Directeur de thèse

Pr. DEVILLIER Philippe

Rapporteur

Dr. FROSSARD Nelly

Rapporteur

Pr. LAGENTE Vincent

Examineur

Dr. TOUQUI Lhousseine



**Université de Versailles Saint Quentin en Yvelines**

**UFR DES SCIENCES DE LA SANTÉ**

École doctorale GAO

"Des génomes aux organismes"

**Année universitaire 2014 – 2015**

N°

**THESE DE DOCTORAT**

Présentée pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ VERSAILLES – SAINT QUENTIN EN YVELINES**

Spécialité : Biologie cellulaire

Par

**Charlotte ABRIAL**

**Caractérisation de la polarisation des macrophages  
pulmonaires humains et voies de régulation**

Composition du jury:

Directeur de thèse

Pr. DEVILLIER Philippe

Rapporteur

Dr. FROSSARD Nelly

Rapporteur

Pr. LAGENTE Vincent

Examineur

Dr. TOUQUI Lhousseine

*"A journey of a thousand miles, begins with a single step..."*

*Lao-tzu*

*Pour toi, papa*



**C'est au terme d'un voyage de 4 ans que je souhaite remercier toutes les personnes qui ont partagé avec moi cette aventure.**

**Je tiens tout d'abord à adresser mes remerciements aux membres du jury,**

*Au Professeur Vincent Lagente*, qui me fait l'honneur d'être rapporteur de cette thèse.

Vous avez suivi mon parcours depuis mon master et toujours soutenue dans mes démarches. Grâce à vous j'ai pu connaître le laboratoire du Professeur Devillier, ce qui m'a conduit jusque là.

Je vous adresse mes sincères remerciements.

*Au Docteur Nelly Frossard*, qui me fait l'honneur d'évaluer ma thèse en tant que rapporteur.

Je vous remercie de l'attention et de la considération que vous avez porté à mon travail au cours de ces 3 ans et pour les remarques constructives que vous avez porté à mon égard lors de nos différents échanges en congrès.

Je vous adresse mes sincères remerciements.

*Au Docteur Lhousseine Touqui*, qui me fait l'honneur d'examiner mon travail de thèse.

Je vous remercie de l'intérêt que vous avez porté à mon travail ainsi que d'avoir accepté de transmettre ma candidature à l'institut Pasteur.

Je vous adresse mes sincères remerciements.

*Au Professeur Philippe Devillier*, qui me fait l'honneur en tant que directeur de thèse d'être membre de mon jury.

C'est avec émotion que je vous adresse mes plus sincères remerciements pour m'avoir acceptée chaleureusement au sein de votre laboratoire en stage de master et pour m'avoir offert l'opportunité de continuer jusqu'en thèse. Merci pour la confiance, l'encadrement et la compréhension dont vous avez fait preuve à mon égard et pour les nombreuses opportunités que j'ai eu de présenter mes travaux.

Je vous adresse ma sincère reconnaissance et mon profond respect.



**Ce travail, n'aurait pu aboutir sans le soutien des membres du laboratoire UPRES EA220.**

**Je tiens à remercier chaleureusement,**

*Le Docteur Stanislas Grassin-Delyle* pour m'avoir encadrée dès mon arrivée au laboratoire et dont l'aboutissement de ce travail n'aurait pu se faire sans son aide, sa disponibilité et ses conseils bienveillants à mon égard. Merci pour tes encouragements et ta positivité à l'égard de mon travail.

*Le Docteur Emanuel Naline* pour avoir fait en sorte que je ne manque de rien au laboratoire. Merci pour votre bonne humeur sans failles, vos découvertes culinaires et pour tout ces moments de belle rigolade passés en congrès et dont je garderai un très bon souvenir.

*Le Docteur Amparo Buenestado*, pour m'avoir montrée et formée aux différentes techniques. Merci Amparotita, pour ton accueil chaleureux, tes conseils avisés et ta bonne humeur espagnole. Je me souviendrai toujours de mon premier congrès P2T avec toi ! En espérant te revoir très bientôt à Barcelone.

*La petite marlotte/charion* pour avoir été et être toujours là quand il faut dans les bons comme les mauvais moments. J'ai toujours pu compter sur toi et à de nombreuses reprises. Ton soutien sans failles m'a été plus que nécessaire pour mener ce travail jusqu'au bout. Plus qu'une collègue tu es devenue au fil de ce voyage une véritable amie sur qui je peux compter. Je te souhaite avec Vincent plein de bonheur dans le futur. J'espère conserver ce lien d'amitié avec vous.

*Hélène et Tatiana* qui m'ont généreusement aidée cette dernière année pour finaliser à bien ce travail. Un grand merci à vous les filles pour tout ce que vous avez fait pour moi afin que je puisse me concentrer sur la rédaction de ma thèse. A Hélène, à qui je souhaite plein de bonheur avec sa petite famille et de réussite dans son futur poste de chef de clinique à l'Hôpital Foch. En plus d'être un bon médecin tu feras une très bonne chercheuse! A Tatiana à qui je souhaite une réussite professionnelle et personnelle, avec Nico, à Rio de Janeiro, j'espère que l'on gardera contact malgré les nombreux kilomètres !

*Sonia* pour son aide précieuse au cytomètre de flux et pour le temps que tu m'as accordé avec FlowJo ! Je te souhaite plein de courage pour l'année prochaine et une belle réussite professionnelle.

Je remercie également les stagiaires *Silvia, Sirima, Diane et Anthony* pour leur collaboration à ce travail et auprès desquels j'ai appris à encadrer et déléguer. Une tâche pas toujours facile à accomplir. J'espère leur avoir transmis le goût de la recherche.

**Enfin, je souhaite remercier toute ma famille qui, au cours de ce voyage, ont été mes repères, mes 4 points cardinaux.**

*A toi Maman* pour m'avoir donnée la persévérance et avoir toujours cru en moi.

*A toi Noémie* pour tous tes précieux conseils et pour me faire l'honneur d'être une seconde fois Tata.

*A toi Marie* sur qui j'ai pu compter, à ma nièce *Célie* pour avoir égayé mon écran d'ordinateur et à mon beau frère *David* pour m'avoir encouragée.

*A toi mon petit loulou*, pour avoir pris soin des gens que j'aime et être là quand je ne pouvais pas.

Merci à ma belle famille, *Martine, Yvon et Katell* pour leur générosité et leur bienveillance à mon égard.

**Enfin ce voyage n'aurait pu aboutir sans toi *matelot* !**

Tu as été la voile qui m'a permis d'avancer. Merci de m'avoir guidée et épaulée au travers des vagues. Merci pour ton soutien durant ce voyage et désolé pour mon retard.

A deux dans le même bateau, ce n'était pas gagné, mais nous y sommes quand même arrivés...

A jeter l'ancre !

---

<b>PREFACE .....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>4</b>
<b>I. LES MACROPHAGES, CELLULES CLES DE L'INFLAMMATION.....</b>	<b>5</b>
A. Définition et origine .....	5
B. Les macrophages pulmonaires .....	7
<b>II. LA POLARISATION DES MACROPHAGES.....</b>	<b>9</b>
A. L'origine du concept de la polarisation.....	9
B. Voie d'activation classique des macrophages en phénotype M1 .....	10
1) Les agonistes des Toll Like Receptors .....	10
2) Les cytokines de type Th1 .....	12
a) L'interféron- $\gamma$ .....	12
b) Le Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ .....	15
C. Voie d'activation alternative des macrophages en phénotype M2.....	15
1) Les macrophages réparateurs M2a .....	16
a) Les cytokines de type Th2: l'Interleukine 4 et l'Interleukine 13 .....	16
2) Les macrophages régulateurs M2b et M2c.....	18
D. Propriétés fonctionnelles des macrophages et polarisation .....	20
1) Production de médiateurs de l'inflammation .....	20
a) Les chimiokines.....	21
b) Les cytokines et facteurs de croissance .....	25
2) Activité phagocytaire .....	27
a) Récepteurs membranaires des macrophages .....	28
b) Production d'agents microbicides .....	29
(1) <i>Monoxyde d'azote</i> .....	29
(2) <i>Métabolites de l'oxygène</i> .....	30
c) Présentation des antigènes aux lymphocytes.....	31
3) Production de médiateurs lipidiques : les eicosanoïdes .....	32
a) Synthèse des prostandoïdes : voie des cyclooxygénases .....	33

b)	Synthèse des leucotriènes et acides eicosatétraénoïques : voie des lipoxygénases .....	34
(1)	<i>La 5-lipoxygénase</i> .....	34
(2)	<i>La 12-lipoxygénase</i> .....	35
(3)	<i>La 15-lipoxygénase</i> .....	35
c)	Synthèse des lipoxines, résolvines et protectines .....	36
<b>III.</b>	<b>POLARISATION DES MACROPHAGES DANS LES MALADIES INFECTIEUSES ET INFLAMMATOIRES.....</b>	<b>39</b>
A.	Infections bactériennes, virales et parasitaires .....	39
B.	Allergie/Asthme .....	41
C.	La Broncho Pneumopathie Chronique Obstructive.....	42
D.	Obésité.....	43
E.	Cancer.....	44
<b>IV.</b>	<b>SYSTEME CHOLINERGIQUE ET RECEPTEURS NICOTINIQUES <math>\alpha 7</math> DANS LES MACROPHAGES.....</b>	<b>45</b>
A.	Le système cholinergique neuronal et non neuronal .....	45
1)	Les récepteurs cholinergiques .....	47
a)	Les récepteurs muscariniques.....	47
b)	Les récepteurs nicotiniques .....	48
(1)	<i>Les différents sous-types de récepteurs nicotiniques</i> .....	48
(2)	<i>Structure des récepteurs nicotiniques</i> .....	49
(3)	<i>Expression des récepteurs nicotiniques</i> .....	50
B.	Les récepteurs nicotiniques $\alpha 7$ .....	51
1)	Structure du récepteur nicotinique $\alpha 7$ .....	51
2)	Rôle du récepteur nicotinique $\alpha 7$ dans les fonctions des macrophages .....	52
3)	Voie de signalisation du récepteur $\alpha 7$ .....	53
4)	Les récepteurs nicotiniques $\alpha 7$ : une cible thérapeutique.....	54
<b>V.</b>	<b>INTRODUCTION AUX TRAVAUX DE THESE .....</b>	<b>55</b>
<b>MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>57</b>	
<b>I.</b>	<b>ISOLEMENT ET CULTURE DES MACROPHAGES PULMONAIRES HUMAINS .....</b>	<b>58</b>
A.	Isolement des macrophages pulmonaires .....	58

B.	Culture des macrophages pulmonaires.....	58
1)	Traitement pharmacologique des macrophages pulmonaires humains.....	59
2)	Transfection des macrophages par la technique de siARNs .....	61
<b>II.</b>	<b>BIOLOGIE MOLECULAIRE .....</b>	<b>61</b>
A.	Transcriptomique .....	61
1)	Extraction des ARNs .....	61
2)	Vérification de la qualité des ARNs.....	62
3)	Transcription inverse.....	62
4)	Réaction en chaîne par polymérase .....	62
5)	Puces génomiques à ADN.....	63
<b>III.</b>	<b>DOSAGE IMMUNOLOGIQUE DES CYTOKINES/CHIMIOKINES .....</b>	<b>64</b>
<b>IV.</b>	<b>DOSAGE DES METABOLITES LIPIDIQUES .....</b>	<b>64</b>
A.	PGE <sub>2</sub> et 15(S)-HETE.....	64
B.	13(S)-HODE.....	65
<b>V.</b>	<b>PHAGOCYTOSE DES MACROPHAGES PULMONAIRES HUMAINS .....</b>	<b>65</b>
<b>VI.</b>	<b>PHENOTYPAGE DES MACROPHAGES POLARISES .....</b>	<b>66</b>
<b>VII.</b>	<b>EXPRESSION DES RESULTATS ET STATISTIQUES.....</b>	<b>66</b>
A.	Biologie moléculaire .....	66
B.	Dosage immunologique et lipidique .....	66
C.	Test de phagocytose et phénotypage des macrophages .....	67
D.	Analyse statistique des résultats .....	67
<b>TRAVAUX DE RECHERCHE .....</b>	<b>68</b>	
<i>Article n°1</i> .....	<i>69</i>	
Introduction.....	70	
Résultats complémentaires.....	71	
Discussion .....	73	
<i>Article n°2</i> .....	<i>77</i>	
Introduction.....	78	
Résultats complémentaires.....	79	
Discussion .....	84	
<i>Article n°3</i> .....	<i>87</i>	

Introduction.....	88
Résultats complémentaires.....	90
Discussion .....	95
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>97</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>101</b>

## Figures

Figure 1 : Origine et différenciation des macrophages à partir des monocytes .....	5
Figure 2 : Localisation anatomique et propriétés fonctionnelles des sous-populations de macrophages tissulaires.....	7
Figure 3 : Localisation et ligands des TLRs.....	11
Figure 4 : Expression relative des ARNm des TLRs dans les macrophages pulmonaires humains .....	11
Figure 5 : Voies de signalisation des agents inducteurs du phénotype M1 des macrophages .	14
Figure 6: Expression relative des ARNm des récepteurs de type I et II à l'IL-4 et l'IL-13 par les macrophages pulmonaires humains .....	16
Figure 7: Voies de signalisation des récepteurs de type I et de type II activés par des cytokines Th2, IL-4 et IL-13 .....	17
Figure 8 : Voies de signalisation des agents inducteurs du phénotype M1 et M2 des macrophages.....	19
Figure 9: Nomenclature et cellules cibles recrutés par les chimiokines de type CXC.....	22
Figure 10: Nomenclature des chimiokines de type CC et leur rôle dans les réponses immunitaires.....	23
Figure 11: Les cytokines et chimiokines spécifiques de chaque phénotype de polarisation des macrophages.....	25
Figure 12: Les principales voies métaboliques de l'acide arachidonique .....	32
Figure 13: Représentation schématique de la polarisation M1/M2 des macrophages avec les marqueurs spécifiques de chaque état d'activation .....	38
Figure 14: Continuum d'états fonctionnels de la polarisation des macrophages .....	38
Figure 15: Les différents composants du système cholinergique neuronal.....	46
Figure 16: Structure des récepteurs cholinergiques nicotiques de type homopentamère ( $\alpha 7$ ) et hétéropentamère ( $\alpha 4\beta 2$ ).....	49
Figure 17: Effet de la polarisation M1 (LPS) et M2a (IL-4/IL-13) des macrophages pulmonaires humains sur la phagocytose de E.coli.....	72
Figure 18 : Effet du NDGA sur la production des cytokines de type M1 induite par le LPS dans les macrophages pulmonaires humains.....	79
Figure 19 : Effet du NDGA sur la production des cytokines de type M2a induite par l'IL-4 (A) et l'IL-13 (B) dans les macrophages pulmonaires humains .....	80
Figure 20 : Effet de la 15(S)-HETE sur la production de CCL4 dans les macrophages pulmonaires humains stimulés par le LPS .....	82

---

Figure 21 : Dosage de la 13(S)-HODE dans les surnageants de macrophages pulmonaires humains .....	83
Figure 22 : Effet des agonistes nicotiques $\alpha 7$ sur la production de CXCL8 par les macrophages pulmonaires humains polarisés en phénotype M1 par le LPS .....	91
Figure 23 : Effet de d'agonistes mixtes $\alpha 4\beta 2$ et $\alpha 7$ sur la production de CXCL8 par les macrophages pulmonaires humains polarisés M1 par le LPS .....	92
Figure 24 : Expression des transcrits du récepteur nicotinique dup $\alpha 7$ dans les macrophages pulmonaires humains polarisés .....	92
Figure 25 : Effet du GTS-21 sur l'expression des transcrits de la PTGS2 et de l'IDO1 dans les macrophages pulmonaires humains polarisés M1 .....	93
Figure 26 : Effet du GTS-21 sur l'expression des transcrits de MRC1 et de l'ALOX15 dans les macrophages pulmonaires humains polarisés M2a .....	94
Figure 27 : Schéma de synthèse reprenant les principaux marqueurs associés à la polarisation M1/M2a in vitro des macrophages pulmonaires humains .....	100



<b>ACh</b>	acétylcholine
<b>ADN</b>	<i>acide désoxyribonucléique</i>
<b>AMPc</b>	<i>adenosine MonoPhosphate cyclique</i>
<b>AP-1</b>	<i>activator protein-1</i>
<b>Arg1</b>	<i>arginase-1</i>
<b>ARN</b>	<i>acide ribonucléique</i>
<b>ARNm</b>	ARN messenger
<b>ATM</b>	adipose tissu macrophages
<b>BPCO</b>	broncho-pneumopathie chronique obstructive
<b>CarAT</b>	carnitine acétyl transférase
<b>CCR</b>	<i>CC chemokine receptor</i>
<b>CFU-GM</b>	<i>colonizing forming unit of granulocyte and macrophage cells</i>
<b>CFU-ML</b>	<i>colonizing forming unit of myeloid and lymphoid cells</i>
<b>ChAT</b>	choline acétyl transférase
<b>CHI3L</b>	<i>chitinase 3-like</i>
<b>CHRNA7</b>	<i>cholinergic receptor nicotinic <math>\alpha 7</math></i>
<b>ChT1</b>	transporteur de la choline
<b>CLEC7A</b>	<i>C-type lectin domain family 7 member A</i>
<b>CMH</b>	complexe majeur d'histocompatibilité
<b>COX</b>	cyclooxygénase
<b>CSF</b>	<i>colony-stimulating factor</i>
<b>CysLT</b>	cystéinyl leucotriène
<b>DAG</b>	diacylglycérol
<b>DCL-1</b>	<i>C-type lectin receptor</i>
<b>DC-SIGN</b>	<i>dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin</i>
<b>DHA</b>	<i>docosahexaenoic acid</i>
<b>DMSO</b>	diméthylsulfoxyde
<b>DUSP1</b>	<i>dual specificity protein phosphatase 1</i>
<b>dUTP</b>	<i>desoxyuridine triphosphate</i>
<b>EGR2</b>	<i>early growth response protein 2</i>
<b>EIA</b>	<i>enzyme immunoassay</i>
<b>ELISA</b>	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<b>EPA</b>	acide eicosapentaénoïque
<b>FAM7A</b>	<i>family with sequence similarity 7A fusion</i>
<b>FITC</b>	fluoresceine isothiocyanate
<b>FLAP</b>	<i>five lipoxygenase-activating protein</i>
<b>GAPDH</b>	glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
<b>GM-CSF</b>	<i>granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>
<b>GRO</b>	<i>growth-related oncogene</i>
<b>GUSB</b>	$\beta$ -glucuronidase
<b>HPGDS</b>	<i>Hematopoietic prostaglandin D synthase</i>
<b>HPRT</b>	Hypoxanthine phosphoribosyltransférase
<b>IFN</b>	interféron
<b>Ig</b>	immunoglobuline
<b>IL</b>	interleukine
<b>IP3</b>	inositol 1,4,5-triphosphate
<b>IP-10</b>	<i>interferon-<math>\gamma</math> inducible protein 10 kDa</i>
<b>IRF</b>	<i>interferon regulator factor</i>
<b>Jak</b>	janus-kinase
<b>LBA</b>	lavages broncho-alvéolaires
<b>LDL</b>	<i>low density lipoprotein</i>
<b>LOX</b>	lipoxygénase

---

<b>LPS</b>	lipopolysaccharide
<b>MAP kinase</b>	<i>mitogen activated protein kinase</i>
<b>MARCO</b>	<i>macrophage receptor with collagenous structure</i>
<b>MCP</b>	<i>monocyte chemoattractant protein</i>
<b>M-CSF</b>	<i>macrophage colony stimulating factor</i>
<b>MD</b>	<i>macrophage-derived chemokine</i>
<b>MIG</b>	<i>monokine induced by interferon-gamma</i>
<b>MIP-1</b>	<i>macrophage inflammatory protein-</i>
<b>MMP</b>	métalloprotéinase matricielle
<b>MRC1</b>	<i>mannose receptor C-type lectin 1</i>
<b>MyD88</b>	<i>myeloid differentiation primary response gene 88</i>
<b>nAChR</b>	récepteur cholinergique nicotinique
<b>NADPH</b>	nicotinamide adénine di-nucléotide phosphate
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	<i>nuclear factor <math>\kappa</math>B</i>
<b>NO</b>	monoxyde d'azote
<b>NOS</b>	NO synthétase
<b>OCT</b>	<i>organic cation transport protein</i>
<b>PAM</b>	<i>positive allosteric modulator</i>
<b>PAMP</b>	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
<b>PARC</b>	<i>pulmonary and activation-regulated chemokine</i>
<b>PBMC</b>	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>
<b>PCR</b>	<i>polymerase Chain Reaction</i>
<b>PDGF</b>	<i>platelet-derived endothelial growth factor</i>
<b>PG</b>	prostaglandine
<b>PGES</b>	<i>prostaglandin E synthase</i>
<b>PKA</b>	protéine kinase A
<b>PLA2</b>	phospholipase A2
<b>PLC</b>	phospholipase C
<b>PPAR</b>	<i>peroxisome proliferator activated receptor</i>
<b>PRR</b>	<i>pathogen recognition receptor</i>
<b>PTGS</b>	<i>prostaglandin-endoperoxide synthase</i>
<b>RANTES</b>	<i>release by activated T cell expressed and secreted</i>
<b>ROI</b>	<i>reactive oxygen intermediate</i>
<b>RPMI</b>	roswell park memorial institute
<b>RT-qPCR</b>	<i>reverse transcriptase-quantitative polymerase chain reaction</i>
<b>SOCS</b>	<i>suppressor of cytokine signaling</i>
<b>STAT</b>	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
<b>TACE</b>	enzyme de conversion du TNF- $\alpha$
<b>TAM</b>	<i>tumour associated macrophages</i>
<b>TARC</b>	<i>thymus- and activation-dependent chemokine</i>
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	<i>transforming growth factor-<math>\beta</math></i>
<b>TGM2</b>	transglutaminase-2
<b>TIMP</b>	<i>tissue inhibitor of metalloproteinase</i>
<b>TIR</b>	<i>toll IL-1 receptor</i>
<b>TLR</b>	récepteur toll-like
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	tumor necrosis factor- $\alpha$
<b>TREM2</b>	<i>triggering receptor express on myeloid cells 2</i>
<b>TRIF</b>	<i>TIR-domain containing adapter-inducing Interferon</i>
<b>TX</b>	thromboxane
<b>VAChT</b>	transporteur vésiculaire de l'acétylcholine
<b>VEGF</b>	<i>vascular endothelial growth factor</i>
<b>VIH</b>	virus de l'immunodéficience humaine

# Préface

Les macrophages jouent un rôle important dans les réponses immunitaires innées et adaptatives et participent au maintien de l'homéostasie tissulaire. Longtemps décrits comme des cellules "éboueuses" participant à la clairance et à l'élimination d'agents pathogènes, leurs fonctions dans la réponse immunitaire s'avèrent beaucoup plus complexes. En effet, les macrophages ne sont pas simplement des cellules douées d'une activité phagocytaire mais assurent aussi de nombreuses autres fonctions, leur permettant de participer d'une part à l'élimination d'agents pathogènes mais également au processus de réparation tissulaire et de régulation de l'inflammation. En fonction de l'environnement, les macrophages peuvent adapter leurs fonctions selon différentes modalités, on parle alors de polarisation. On distingue de façon dichotomique, la polarisation dite "classique" de type M1 dont l'activité est pro-inflammatoire et l'activation dite "alternative" de type M2 qui participe à la régulation de l'inflammation et au phénomène de réparation tissulaire. En fonction de leur localisation tissulaire, les macrophages acquièrent des propriétés fonctionnelles distinctes (Gordon *et al.*, 2005; Murray *et al.*, 2011a). Parmi les macrophages tissulaires, les macrophages pulmonaires sont les seuls à être exposés de manière directe aux différents composés de l'air inspiré. Cette localisation stratégique leur confère un rôle protecteur et de défense contre les différents pathogènes et/ou particules inhalées mais les implique aussi dans le développement de pathologies respiratoires comme l'asthme et la broncho pneumopathie chronique obstructive (BPCO) (Pappas *et al.*, 2013). La polarisation des macrophages fait l'objet de nombreuses études, principalement dans des modèles cellulaires de macrophages murins, monocytes et de macrophages dérivés de monocytes sanguins humains (Stein *et al.*, 1992; Mills *et al.*, 2000; Martinez *et al.*, 2006; Jaguin *et al.*, 2013; Martinez *et al.*, 2013; Gundra *et al.*, 2014; Italiani *et al.*, 2014; Xue *et al.*, 2014). Cependant des divergences inter-espèces entre les marqueurs de polarisation ont été rapportées entre les macrophages murins et les macrophages dérivés de monocytes humains (Martinez *et al.*, 2013). Par exemple, l'expression de certaines enzymes telles que la NO synthétase inductible (iNOS) et l'Arginase-1 (Arg1) est décrite comme marqueur de la polarisation M1 et M2 respectivement dans les macrophages murins mais n'est pas modulée dans les macrophages dérivés de monocytes humains (Murray *et al.*, 2011b; Shay *et al.*, 2013). Une hétérogénéité des phénotypes est également observable entre les différents macrophages tissulaires chez l'Homme (macrophages péritonéaux, macrophages pulmonaires, cellules de Kupffer, microglies) (Stout *et al.*, 2004). De plus, des études rapportent que les marqueurs de la polarisation identifiés dans les macrophages dérivés de monocytes sont différents de ceux mis en évidence dans les macrophages tissulaires (Stout *et*

*al.*, 2004; Li *et al.*, 2007; Gundra *et al.*, 2014). La maturation *in vitro* des monocytes en macrophages est sous la dépendance de facteur de stimulation comme le M-CSF (*Macrophage Colony Stimulating Factor*) et le GM-CSF (*Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*). Ces deux facteurs modulent l'état de polarisation des macrophages, avec une orientation des macrophages vers le phénotype M1 par le GM-CSF et M2 par le M-CSF (Vogel *et al.*, 2014). La méthode de culture des macrophages dérivés de monocytes influence donc l'état de polarisation des macrophages, limitant ainsi la transposition des données à des macrophages différenciés *in situ* et isolés à partir de leur localisation tissulaire.

La polarisation des macrophages joue un rôle dans certaines pathologies inflammatoires comme l'asthme, la BPCO, les cancers, les maladies auto-immunes et métaboliques où un déséquilibre de la balance M1/M2 est observé (Chinetti-Gbaguidi *et al.*, 2011; Murray *et al.*, 2011a; Pappas *et al.*, 2013). La connaissance des marqueurs de polarisation des macrophages tissulaires est donc nécessaire pour mieux comprendre les réponses inflammatoires dans ces différentes pathologies.

Ainsi, la caractérisation des marqueurs et des voies de régulation de la polarisation sur des macrophages pulmonaires humains est un axe de recherche important pour mieux comprendre l'implication de ces cellules.

Nous avons dans un premier temps étudié les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles de la polarisation M1 et M2 des macrophages pulmonaires humains en se focalisant sur l'étude des marqueurs membranaires et la production de médiateurs de l'inflammation (cytokines, chimiokines et les métabolites lipidiques).

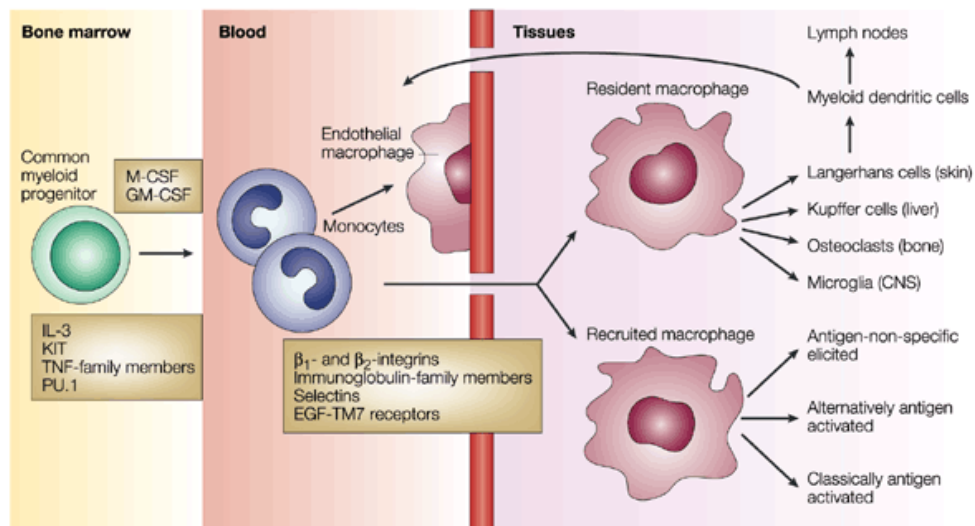
Dans un second temps, nous avons exploré de manière pharmacologique, deux voies de régulation de la polarisation des macrophages pulmonaires humains. La voie des 15-lipoxygénases, une enzyme du métabolisme lipidique, et la voie du système cholinergique non neuronal *via* les récepteurs nicotiques de type  $\alpha 7$ , dans les macrophages pulmonaires humains polarisés M1 et M2.

# Introduction

## I. Les macrophages, cellules clés de l'inflammation

### A. Définition et origine

C'est à la fin du XIX<sup>e</sup> siècle que le terme macrophage fut employé pour la première fois par Elie Metchnikoff pour décrire l'existence de cellules très mobiles capables de phagocyter des bactéries chez des invertébrés et qui lui vaudront l'obtention du prix Nobel en 1908 (Tauber, 2003). Les macrophages sont issus de la différenciation des monocytes sanguins concomitante à leur passage tissulaire (**Figure 1**). Les macrophages ont pour origine le CFU-ML (*Colony Forming Unit of Myeloid and lymphoid cells*). Sous l'influence de cytokines et de facteurs de croissance comme le GM-CSF (*Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*), le CFU-ML se différencie en CFU-GM (*Colony Forming Unit of Granulocyte and Macrophage Cells*), précurseur des granulocytes et macrophages. Sous l'action combinée du facteur de croissance M-CSF et GM-CSF, le CFU-GM se différencie en progéniteur CFU-M (*Colony Forming Unit of Macrophage*) puis en monocytes (Auffray *et al.*, 2009). Les monocytes passent dans la circulation sanguine et migrent dans les tissus où ils vont se différencier en macrophages ou en cellules dendritiques myéloïdes et y vivent entre 3 mois et 3 ans.



**Figure 1 : Origine et différenciation des macrophages à partir des monocytes (Gordon, 2003)**

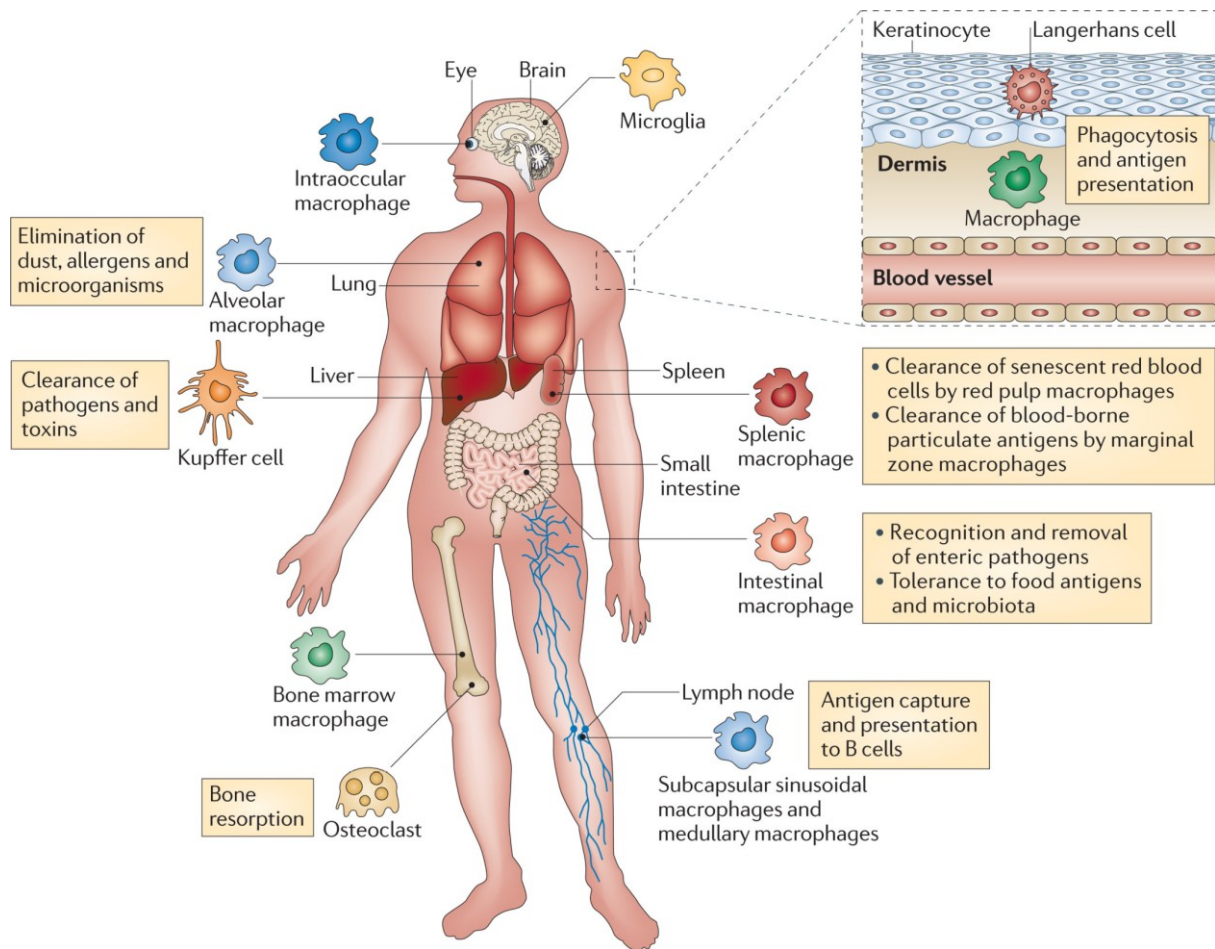
Les monocytes représentent 3-7% des leucocytes sanguins chez l'Homme. Les monocytes peuvent circuler dans le sang pendant 1 à 3 jours avant d'être recrutés vers les

tissus sous l'influence des mécanismes physiologiques de "*homing*" ou de stimuli inflammatoires. Au cours d'une réponse inflammatoire, les monocytes sanguins sont recrutés vers le tissu *via* l'expression du récepteur CCR2 (*CC chemokine receptor type 2*), afin d'augmenter leur nombre au site de l'inflammation (Serbina *et al.*, 2006; Serbina *et al.*, 2008). Une prolifération *in situ* des macrophages résidents est également observée au sein des tissus (Jenkins *et al.*, 2011; Amano *et al.*, 2014). Le passage des monocytes vers le tissu se fait par adhérence des monocytes à l'endothélium vasculaire *via* l'expression de molécules d'adhésions reconnues à la surface des cellules endothéliales. La maturation des monocytes en macrophages tissulaires est accompagnée d'une perte d'expression des récepteurs CCR2 et d'une augmentation de l'expression des récepteurs CCR1 et CCR5 (Fantuzzi *et al.*, 1999; Kaufmann *et al.*, 2001). Les macrophages participent activement aux défenses immunitaires innées *via* la reconnaissance d'une grande majorité de pathogènes (virus, bactéries, parasites, champignons). Cette identification se base sur la reconnaissance de motifs moléculaires très conservés et caractéristiques des microorganismes : les PAMP (*Pathogen Associated Molecular Pattern*) associés à des récepteurs spécifiques, les PRR (*Pathogen Recognition Receptor*) exprimés à la surface des macrophages (Gordon, 2002). Parmi ces PRR, on trouve les récepteurs *Toll-Like* (TLR), les récepteurs *scavenger*, les récepteurs au complément et les récepteurs de type lectine, impliqués dans la reconnaissance des pathogènes mais également des débris cellulaires et des cellules apoptotiques (Gordon, 2002). L'interaction pathogènes/PRR entraîne une activation fonctionnelle des macrophages impliquée dans la réponse immunitaire innée *via* la sécrétion de médiateurs de l'inflammation (cytokines, chimiokines, espèces réactives de l'oxygène et de l'azote et métabolites lipidiques) et l'activité phagocytaire des macrophages pour neutraliser les microorganismes (Murray *et al.*, 2011a). Les macrophages sont également impliqués dans la réaction immunitaire adaptative *via* la présentation d'antigènes aux cellules du système immunitaire inné que sont les lymphocytes T et B (Niedergang *et al.*, 2004). Les macrophages sont les garants de l'homéostasie et de l'intégrité des tissus; ils ont un rôle essentiel dans la réparation tissulaire, la résolution de l'inflammation, le remodelage tissulaire et l'angiogénèse (David Dong *et al.*, 2009; Murray *et al.*, 2011a).

Les macrophages sont impliqués dans de nombreuses fonctions. L'environnement spécifique de chaque tissu influence la différenciation des macrophages qui acquièrent une spécificité fonctionnelle au sein du tissu dans lequel ils résident. Ainsi, les macrophages sont divisés en



sous-populations en fonction de leur localisation anatomique et leur phénotype fonctionnel (Murray *et al.*, 2011a) (**Figure 2**).



**Figure 2 : Localisation anatomique et propriétés fonctionnelles des sous-populations de macrophages tissulaires**  
(Murray *et al.*, 2011a)

## B. Les macrophages pulmonaires

### Population

Les macrophages pulmonaires sont les seuls macrophages tissulaires à être en contact direct avec le milieu extérieur. De par cette localisation stratégique, les macrophages pulmonaires jouent un rôle clé dans la défense contre les agressions extérieures. Il existe 3 sous-populations de macrophages au sein des poumons en fonction de leur localisation et de leur fonction: 1) Les macrophages alvéolaires sont présents à la surface des alvéoles pulmonaires et sont ainsi directement exposés aux particules inhalées. 2) Les macrophages tissulaires résident dans le parenchyme pulmonaire, espace formé entre l'épithélium alvéolaire et

l'endothélium vasculaire. 3) Les macrophages intravasculaires sont quant à eux présent au niveau de l'endothélium des capillaires sanguins.

### **Origine des macrophages pulmonaires**

Deux théories ont été mises en évidence sur l'origine des macrophages pulmonaires. La première étant une origine médullaire par chemoattraction des monocytes sanguins vers le tissu pulmonaire (Ungar *et al.*, 1935; Hunninghake *et al.*, 1979; Landsman *et al.*, 2007). L'interstitium pulmonaire produit un environnement favorable à la maturation des monocytes sanguins en macrophages interstitiels qui servent de stade intermédiaire avant leur différenciation en macrophages alvéolaires. Les macrophages alvéolaires sont ainsi considérés comme le stade terminal de différenciation des monocytes sanguins au niveau pulmonaire (Landsman *et al.*, 2007).

La deuxième théorie étant une prolifération des macrophages résidant au sein du tissu *via* l'exposition au *Colony Stimulating Factors* (CSF) (Golde *et al.*, 1974; Bitterman *et al.*, 1984; Lohmann-Matthes *et al.*, 1994). Une réplication *in situ* des macrophages pulmonaires est observée dans un modèle d'inflammation au Carbone chez des souris présentant une leucopénie (Evans *et al.*, 1986).

Les travaux de Adamson *et al.*, 1980, ont mis en évidence que les macrophages pulmonaires sont dans un premier temps issus d'un influx des monocytes sanguins, suivi par une prolifération/réplication des macrophages pulmonaires (Adamson *et al.*, 1980; Lohmann-Matthes *et al.*, 1994).

### **Fonction**

Les macrophages pulmonaires interagissent avec leur environnement *via* l'expression de nombreux récepteurs membranaires. Parmi ces récepteurs, les macrophages pulmonaires expriment les PPR, les récepteurs aux cytokines, les récepteurs au fragment constant des immunoglobulines (Ig) et au complément pour les particules opsonisées (Lohmann-Matthes *et al.*, 1994).

Les macrophages pulmonaires participent activement aux défenses immunitaires et antimicrobiennes de par leur activité de phagocytose mais également leur production de médiateurs de l'inflammation comme les cytokines, les chimiokines, les facteurs de croissance, les métabolites lipidiques et les espèces réactives de l'oxygène (Lohmann-Matthes *et al.*, 1994). Une hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle existe entre les macrophages

alvéolaires et interstitiels. En effet, de par leur localisation en première ligne de défense dans les poumons, les macrophages alvéolaires ont une activité microbicide, enzymatique, phagocytaire et métabolique qui apparaît nettement plus intense que les macrophages interstitiels présent en seconde ligne de défense et plus impliqués dans la présentation des antigènes (Lohmann-Matthes *et al.*, 1994).

## II. La polarisation des macrophages

### A. L'origine du concept de la polarisation

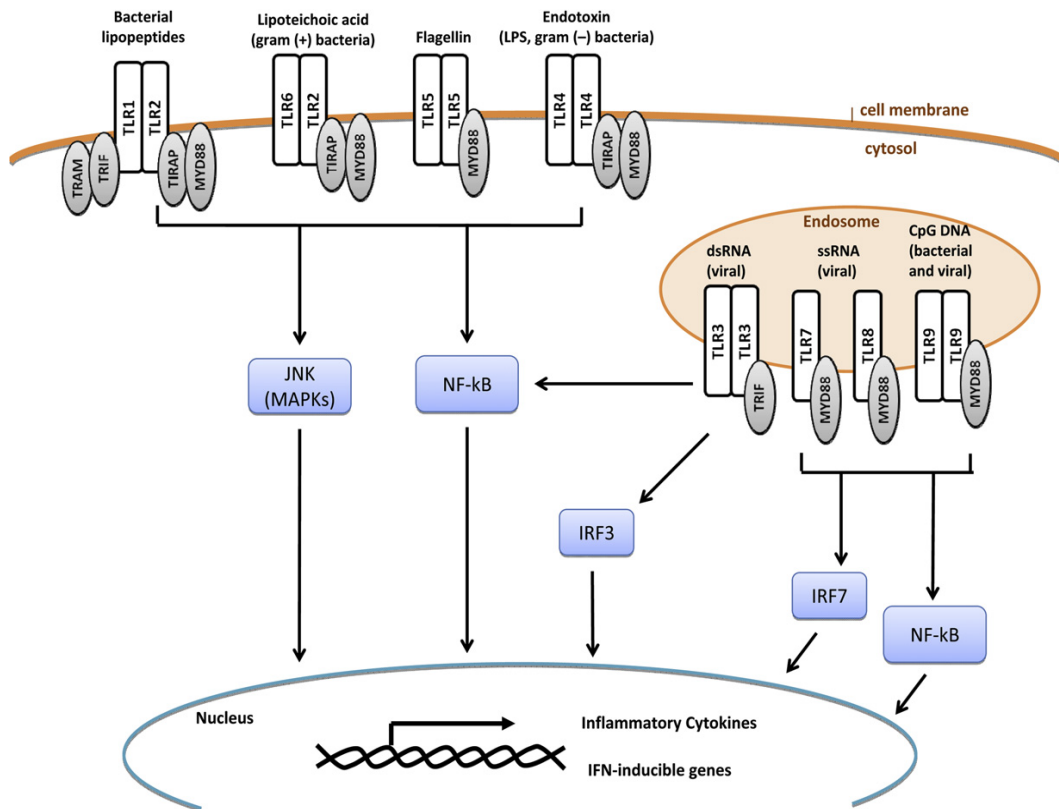
C'est en 1986, que le terme « polarisation » a été introduit par Mosmann *et al.*, définissant ainsi deux sous-populations de lymphocytes *helper* murins, Th1 et Th2 en fonction du stimulus rencontré lors de leur activation (Mosmann *et al.*, 1986). Cette distinction Th1 et Th2 se base sur un profil bien distinct de sécrétion des cytokines que sont : l'Interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) pour le profil Th1 et l'Interleukine-4 (IL-4) pour le profil Th2. Dans ces travaux, ils ont également observé que la réponse immunitaire de ces deux profils de polarisation des lymphocytes T *helper* est fondamentalement opposée (Mosmann *et al.*, 1989a; Mosmann *et al.*, 1989b). De ces expériences est né le terme « réponse de type Th1 à médiation cellulaire » (activation des lymphocytes T cytotoxiques et des macrophages) et « réponse de type Th2 à médiation humorale » (activation des lymphocytes B et production d'anticorps). Plus tard, le rôle des macrophages est apparu important dans cette dichotomie Th1/Th2. Les travaux de Stein *et al.*, 1992, ont montré, que contrairement à l'IFN- $\gamma$ , la stimulation des macrophages murins par l'IL-4 induit une augmentation de l'expression des récepteurs au mannose de type 1 (MRC1 ou CD206) favorisant la phagocytose des micro-organismes comportant des résidus mannose à leur surface (Stein *et al.*, 1992). A l'opposé des effets de l'IFN- $\gamma$ , une diminution de la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor- $\alpha$* ) était également observée dans ces macrophages murins stimulés par l'IL-4 (Stein *et al.*, 1992). Ces résultats ont montré pour la première fois que l'IL-4 active les macrophages d'une façon différente de l'IFN- $\gamma$ . Quelques années plus tard, les travaux de Mills *et al.*, 2000, ont montré que la polarisation lymphocytaires Th1 et Th2 modifiait la réponse inflammatoire des macrophages murins et cela de manière opposée (Mills *et al.*, 2000). En effet, l'analyse du métabolisme de l'arginine dans cette étude a montré que les macrophages murins "Th1" produisent majoritairement du monoxyde d'azote (NO pour Nitric oxide) alors que les macrophages "Th2" produisent de l'ornithine (Mills *et al.*, 2000). Ces travaux ont également

montré que les macrophages "Th1" et "Th2" influencent la réponse inflammatoire des lymphocytes Th *via* une augmentation respective de la production d'IFN- $\gamma$  et de TGF- $\beta$  (inhibiteur du NO) dans les lymphocytes murins (Mills *et al.*, 2000). L'ensemble de ces travaux a permis de faire naître le concept de polarisation des macrophages en phénotype M1 et phénotype M2. Les macrophages M1 sont dits « pro-inflammatoires » alors que les macrophages M2 sont qualifiés « d'immunorégulateurs ». Selon le mode d'activation et leurs propriétés fonctionnelles, les macrophages M2 sont aujourd'hui divisés en trois sous-groupes (Martinez *et al.*, 2008). Les macrophages M2a qualifiés de macrophages « réparateurs » et les macrophages M2b et M2c de « régulateurs et anti-inflammatoires » (Mosser *et al.*, 2008).

## **B. Voie d'activation classique des macrophages en phénotype M1**

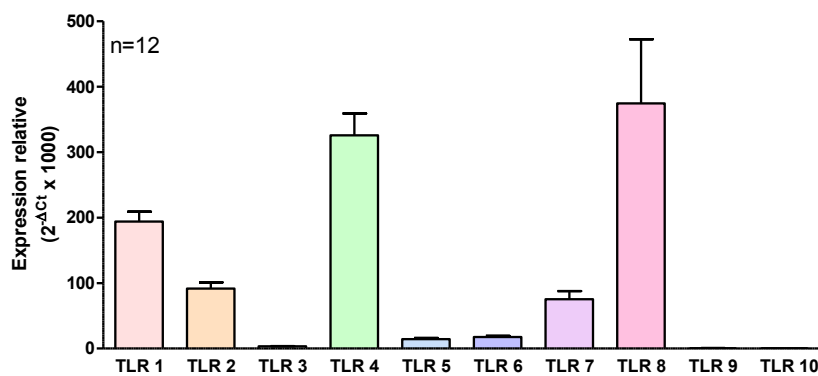
### **1) Les agonistes des Toll Like Receptors**

La polarisation des macrophages en phénotype M1 résulte de l'activation de certains PRR et notamment des récepteurs TLRs. Le gène *Toll* a dans un premier temps été identifié chez la drosophile comme un gène impliqué dans l'ontogénèse, la défense anti-microbienne et dans l'activité anti-fongique où il a ensuite été étendu aux cellules de mammifères. Les TLRs sont des récepteurs transmembranaires qui possèdent un domaine extracytoplasmique de reconnaissance des ligands riche en leucines, un domaine transmembranaire riche en cystéines et un domaine intracytoplasmique extrêmement similaire à celui retrouvé pour le récepteur à l'IL-1 (IL-1R) et l'IL-18R appelé domaine TIR (*Toll IL-1 Receptor*) et impliqué dans la transduction du signal dans la cellule. Il existe actuellement 10 types de TLRs identifiés chez l'Homme capable de reconnaître un vaste panel de composants endogènes ou exogènes (Akira, 2009). La localisation cellulaire des TLRs est associée à la nature des ligands qu'ils reconnaissent (**Figure 3**). Les TLRs 1, 2, 4, 5 et 6 sont exprimés à la membrane plasmique des cellules, ont pour ligands des composés exogènes et participent à la défense contre les pathogènes extracellulaires (Mogensen, 2009). A l'inverse, les TLRs 3, 7, 8 et 9 sont localisés dans les endosomes/lysosomes, interagissent avec des composés endogènes et participent à la clairance des pathogènes intracellulaires (Mogensen, 2009). Les TLRs 1, 2, 4 et 6 sont impliqués dans la reconnaissance de lipoprotéines et endotoxines, le TLR 5 reconnaît certaines protéines bactériennes comme les flagellines et les TLRs 3, 7, 8 et 9 détectent les acides nucléiques (Mogensen, 2009).



**Figure 3 : Localisation et ligands des TLRs**  
(Bauer et al., *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2012)

Les TLRs sont exprimés par les cellules immunitaires. Des données non publiées obtenues au sein du laboratoire UPRES EA220 ont permis de mettre en évidence que les gènes codant pour les différents types de TLR sont exprimés par les macrophages pulmonaires humains avec une prédominance d'expression des TLRs 1, 2, 4, 5, 6, 7 et 8 (**Figure 4**).



**Figure 4 : Expression relative des ARNm des TLRs dans les macrophages pulmonaires humains**  
(Données UPRES EA220)

Parmi les agonistes des TLRs, le lipopolysaccharide (LPS), composant de la paroi des bactéries à Gram négatif et agoniste du TLR4 est aujourd'hui considéré comme un agent inducteur de la polarisation de type M1 des macrophages (Mantovani *et al.*, 2004; Benoit *et al.*, 2008; Martinez *et al.*, 2008; Mosser *et al.*, 2008). Le LPS se fixe à la protéine plasmatique LBP (*LPS Binding Protein*) reconnue par le CD14 sur la membrane des macrophages. Ce complexe une fois formé interagit avec le TLR4 pour activer la voie de signalisation MyD88 (*Myeloid Differentiation primary response gene 88*) dépendante. La stimulation de cette voie conduit à l'activation du facteur de transcription nucléaire NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor kappaB*) et du facteur de transcription AP-1 (*Activator Protein-1*) permettant l'expression de nombreux gènes pro-inflammatoires (Tugal *et al.*, 2013). NF- $\kappa$ B est un homo- ou hétérodimère formé de cinq sous-unités : p50, p52, p65 (Rel A), Rel B et c-Rel. Une augmentation des sous-unités p50 et p65 est observée dans des macrophages dérivés de monocytes humains stimulés par du LPS (Jaguin *et al.*, 2013). L'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B induit l'expression du gène SOCS3 (*Supressor Of Cytokine Signaling*), un facteur inhibiteur du facteur de transcription STAT3 (*Signal Transducers and Activators of Transcription 3*), lui même impliqué dans la polarisation M2 des macrophages (détaillé ultérieurement) (Liu *et al.*, 2008). Une autre voie de signalisation est également présente dans la signalisation intracellulaire des TLRs, la voie MyD88 dit « indépendante » qui interagit avec le domaine TRIF (*TIR domain-containing adapter-inducing Interferon- $\beta$* ) pour aboutir à l'activation des IRF (*Interferon Regulator Factor*) et induire l'expression de gènes cibles de l'interféron impliqué dans la défense antivirale. Une augmentation de l'expression du facteur de transcription IRF5 est observée dans les macrophages dérivés de monocytes humains polarisés M1 et est impliquée dans la production de cytokines pro-inflammatoires (Krausgruber *et al.*, 2011).

## 2) Les cytokines de type Th1

### a) L'interféron- $\gamma$

En réponse à divers agents pathogènes, les lymphocytes Th1, lymphocytes cytotoxiques ainsi que les cellules *Natural Killer* vont sécréter une cytokine bien particulière, l'IFN- $\gamma$ . Cette cytokine appartient à la grande famille des IFN, dont l'action principale est d'interférer sur la réplication virale, mais également une action antibactérienne et antiproliférative. Les IFN sont divisés en trois classes selon la spécificité de leurs récepteurs

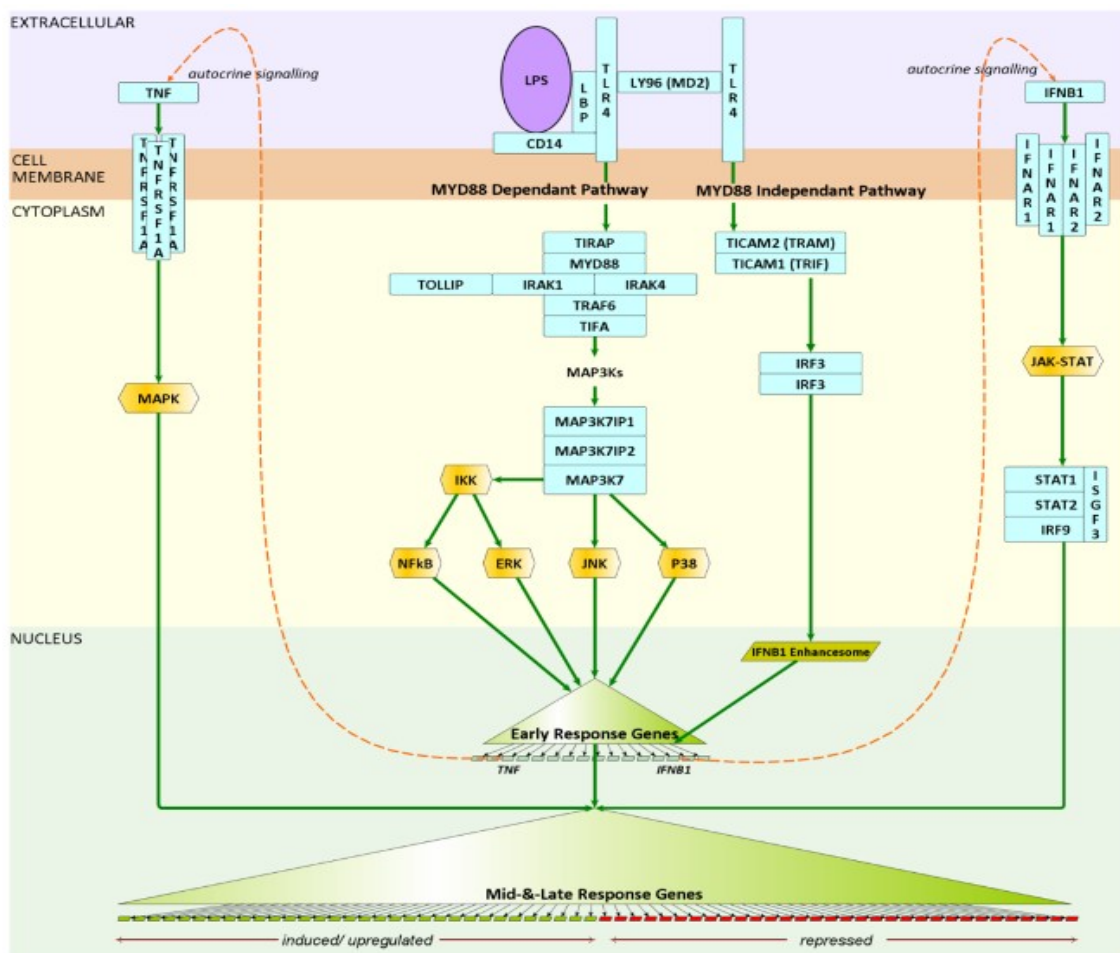
et leur homologie de séquence. L'IFN- $\gamma$  appartient à la famille de classe II et active les macrophages qui produisent à leur tour de l'IL-12 impliquée dans le recrutement des lymphocytes Th1. Le recrutement des lymphocytes Th1 permet d'augmenter la production d'IFN- $\gamma$  de manière local afin d'assurer une activation des macrophages en phénotype M1 pro-inflammatoire (Murray, 1988; Young, 1996; Mosser *et al.*, 2008). En réponse à une agression, les macrophages sont également capables de produire de l'IFN- $\gamma$  (Fenton *et al.*, 1997).

La polarisation des macrophages en phénotype M1 par l'IFN- $\gamma$  résulte de l'activation de voies de signalisation intracellulaire qui conduisent à l'expression de gènes spécifiques impliqués dans l'activité pro-inflammatoire des macrophages (**Figure 5**). L'IFN- $\gamma$  stimule la polarisation M1 des macrophages *via* son interaction avec le récepteur IFN- $\gamma$ R, dont l'expression est retrouvée dans les macrophages alvéolaires humains (Dhillon *et al.*, 2009). Ce récepteur est composé de deux chaînes IFN- $\gamma$ R1 et IFN- $\gamma$ R2 associées aux Janus-Kinases 1 (Jak1) et Jak2. Les Janus-Kinases sont des protéines kinases dont le rôle est d'activer par phosphorylation le facteur de transcription STAT. L'interaction interféron-récepteur induit la phosphorylation et l'homodimérisation de STAT1 qui est ensuite transloqué dans le noyau et se fixe en amont d'un grand nombre de gènes impliqués dans les fonctions pro-inflammatoires des macrophages (Platanias, 2005; Sica *et al.*, 2012; Tugal *et al.*, 2013). Comme décrit précédemment pour le facteur de transcription NF- $\kappa$ B, le facteur de transcription STAT1 inhibe le développement de phénotype M2 des macrophages *via* l'induction de l'expression du facteur inhibiteur SOCS3 (Liu *et al.*, 2008).

L'IFN- $\gamma$  peut également interagir en synergie avec d'autres agents inducteurs du phénotype M1 des macrophages comme les agonistes des TLRs, afin d'induire une activation classique optimale. Une augmentation de l'expression des TLR4 et de l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B est observée lors d'une pré-stimulation de macrophages murins par l'IFN- $\gamma$ , favorisant l'élimination des bactéries à Gram négatif (Darmani *et al.*, 1994; Schroder *et al.*, 2006). Certains gènes, comme la iNOS, impliquée dans l'action microbicide des macrophages M1, nécessite une synergie entre l'IFN- $\gamma$  et le LPS pour être exprimée de manière optimale dans les macrophages murins (Schroder *et al.*, 2004).

Un autre membre de la famille des interférons, l'IFN- $\beta$  (classe I), participe également au processus de polarisation des macrophages en phénotype M1 (**Figure 5**). En réponse au LPS,

les macrophages sont capables d'initier la production d'IFN- $\beta$  *via* la voie Myd88 indépendante (Sica *et al.*, 2012; Tugal *et al.*, 2013). Cette production d'IFN- $\beta$  agit de manière autocrine sur les macrophages *via* son interaction avec le récepteur à l'interféron de type I, composé de deux sous-unités : IFN-R1 et IFN-R2 (Platanias, 2005). Les macrophages dérivés de monocytes humains expriment le récepteur de type I à l'interféron (Eantuzzi *et al.*, 1997). La liaison de l'IFN- $\beta$  sur son récepteur active les kinases Jak1 et Tyk2 (Tyrosine Kinase 2) qui activent, par phosphorylation, les facteurs de transcription STAT1 et STAT2. Ces facteurs de transcription s'associent à l'IRF9 pour former un complexe qui régule de nombreux gènes impliqués dans l'activité antivirale et antimicrobienne de l'IFN- $\beta$  (Platanias, 2005). L'IFN- $\beta$  peut également activer le récepteur de l'IFN- $\gamma$  et induire l'expression de ses gènes cibles (Sica *et al.*, 2012).



**Figure 5 : Voies de signalisation des agents inducteurs du phénotype M1 des macrophages**  
(<http://www.macrophages.com>)



## b) Le Tumor Necrosis Factor- $\alpha$

La polarisation M1 des macrophages par le LPS et/ou l'IFN- $\gamma$  induit la production de TNF- $\alpha$  par les macrophages qui agit de manière autocrine pour amplifier l'activation M1 (Cheshire *et al.*, 1997; Schroder *et al.*, 2004) (**Figure 5**). Le TNF- $\alpha$  est initialement synthétisé sous la forme d'un précurseur de 27 kDa appelé pro-TNF- $\alpha$  qui est stocké à proximité de la membrane cellulaire. Le pro-TNF- $\alpha$  est ensuite clivé par une métalloprotéase appelée enzyme de conversion du TNF- $\alpha$  (TACE), qui aboutit à la formation de TNF- $\alpha$ . Le TNF- $\alpha$  agit *via* deux récepteurs transmembranaires : le récepteur 1 (TNFR1) et le récepteur 2 (TNFR2) (Parameswaran *et al.*, 2010). Le TNFR1 est exprimé de manière constitutive dans tous les tissus alors que l'expression du TNFR2 est restreinte aux cellules de l'immunité et peut-être régulée (Parameswaran *et al.*, 2010). Les effets pro-inflammatoires du TNF- $\alpha$  sont principalement réalisés par le TNFR1. Dans les macrophages, la voie de signalisation du TNF- $\alpha$  fait intervenir le facteur de transcription NF- $\kappa$ B, principal facteur de transcription des gènes de l'inflammation, et la P38 MAP kinase (*Mitogen Activated Protein*) qui participe également à la production de nombreux médiateurs de l'inflammation.

L'activation des macrophages en phénotype M1 confère des propriétés fonctionnelles impliquées dans la défense anti-microbienne et la réponse immunitaire de type Th1, qui seront détaillés ultérieurement.

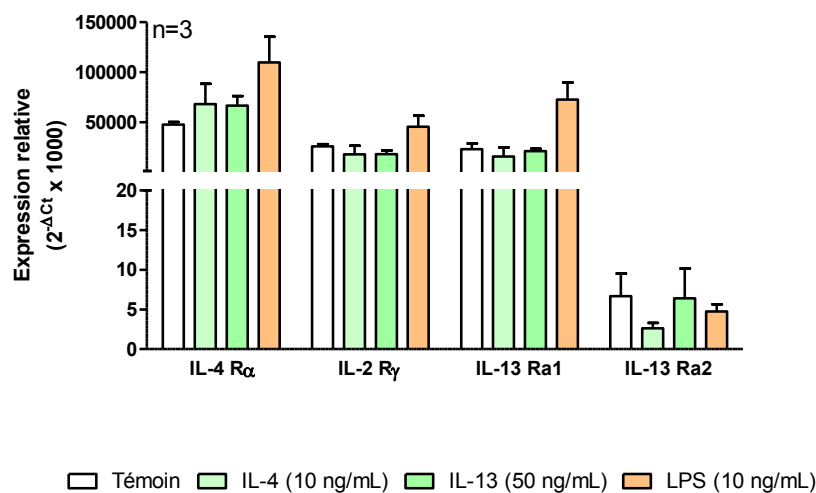
## C. Voie d'activation alternative des macrophages en phénotype M2

Selon Mantovani *et al.*, 2004, les macrophages M2 sont divisés en trois sous-types. Les macrophages M2a activés par l'IL-4 et l'IL-13, les macrophages M2b activés par les complexes immuns associés aux agonistes des TLRs et les macrophages M2c principalement induits par les glucocorticoïdes, l'IL-10 et le TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor- $\beta$* ) (Mantovani *et al.*, 2004). Les macrophages M2a sont qualifiés de macrophages alternatifs et réparateurs alors que les macrophages M2b et M2c sont qualifiés de macrophages « régulateurs et anti-inflammatoires » (Mosser *et al.*, 2008). Dans ce paragraphe, nous insisterons d'avantage sur les voies d'activation des macrophages M2a par rapport à celles des macrophages M2b et M2c dont les caractéristiques sont assez peu documentées dans la littérature.

## 1) Les macrophages réparateurs M2a

### a) Les cytokines de type Th2: l'Interleukine 4 et l'Interleukine 13

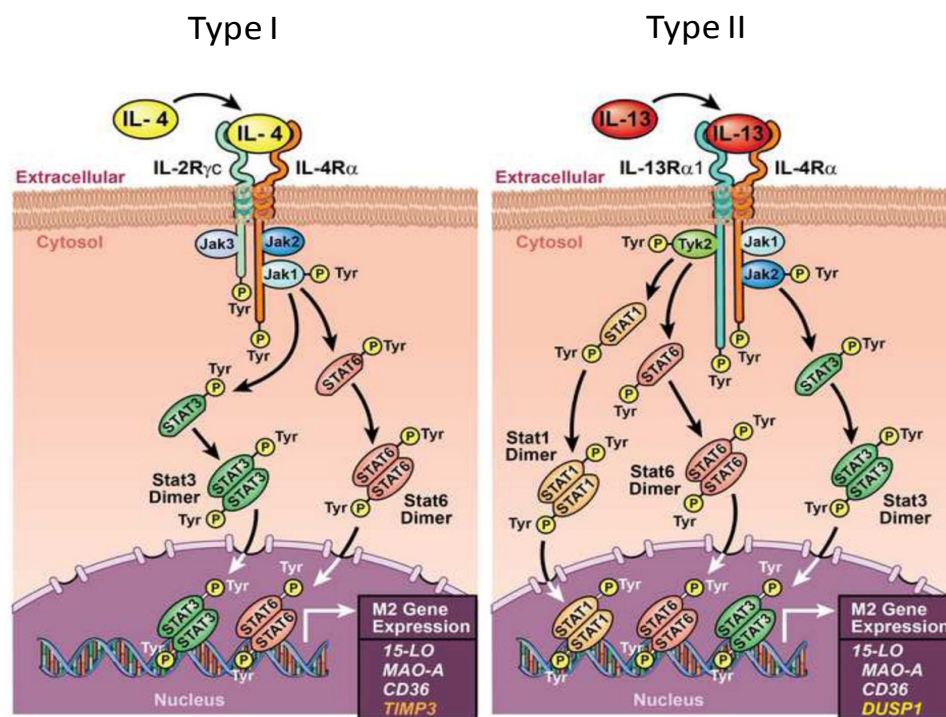
Au cours de la réponse immunitaire de type allergique ou parasitaire, les lymphocytes Th2, mastocytes, basophiles et éosinophiles produisent des cytokines de type Th2 (Martinez *et al.*, 2009; Gordon *et al.*, 2010). Ces cytokines Th2 (IL-4 et IL-13) inhibent la polarisation de type M1 et initient la polarisation M2a des macrophages *via* leur interaction sur deux types de récepteurs hétérodimériques transmembranaires (Martinez *et al.*, 2008; Martinez *et al.*, 2013). Le récepteur de type I formé de deux chaînes transmembranaires: IL-4R $\alpha$  et IL-2R $\gamma$  et le récepteur de type II formé des chaînes IL-4R $\alpha$  et IL-13R $\alpha$ 1 (Van Dyken *et al.*, 2013). L'IL-4 interagit avec les récepteurs de type I et II alors que l'IL-13 interagit uniquement avec les récepteurs de type II ainsi que son récepteur leurre IL-13R $\alpha$ 2 (Van Dyken *et al.*, 2013). Les récepteurs de type I sont majoritairement exprimés par les cellules hématopoïétiques (lymphocytes T et B) alors que les récepteurs de type II sont quant à eux majoritairement exprimés par les cellules non hématopoïétiques (Van Dyken *et al.*, 2013). Des données non publiées du laboratoire UPRES EA220 ont mis en évidence que les macrophages pulmonaires humains expriment les gènes codant pour les chaînes constitutives des récepteurs de type I et de type II (**Figure 6**).



**Figure 6: Expression relative des ARNm des récepteurs de type I et II à l'IL-4 et l'IL-13 par les macrophages pulmonaires humains**

(Données UPRES EA220)

Dans les macrophages dérivés de monocytes humains, l'activation des récepteurs de type I et II initie une cascade de signalisation impliquant les kinases Jak1/Jak2/Jak3 et Jak1/Jak2/Tyk2 respectivement (Bhattacharjee *et al.*, 2013) (**Figure 7**). L'activation de ces kinases aboutit à la phosphorylation du facteur de transcription STAT6/STAT3 pour le récepteur de type I et STAT1/STAT3/STAT6 pour le récepteur de type II (Bhattacharjee *et al.*, 2013) (**Figure 7**). Ces facteurs activent la transcription de gènes cibles impliqués dans la polarisation M2a des macrophages (Sica *et al.*, 2007; Martinez *et al.*, 2009; Beyer *et al.*, 2012; Sica *et al.*, 2012) (**Figure 7**). Parmi les gènes régulés au cours de la polarisation M2a, l'expression du facteur de transcription EGR2 (*Early Growth Response Protein 2*) est augmentée en présence d'IL-4 dans les macrophages dérivés de monocytes humains (Martinez *et al.*, 2006; Jaguin *et al.*, 2013). EGR2 est responsable de l'induction de l'expression de SOCS1 impliquée dans l'inhibition du facteur de transcription STAT1 de la polarisation M1 des macrophages (Whyte *et al.*, 2011; Martinez *et al.*, 2013). De même que l'expression du facteur de régulation IRF4 est retrouvée augmentée dans les macrophages murins M2a et participe à l'inhibition de la voie de signalisation MyD88 des TLRs (Negishi *et al.*, 2005). Ainsi, la polarisation M2a participe à sa propre amplification par l'inhibition de voies impliquées dans la polarisation M1 des macrophages.



**Figure 7: Voies de signalisation des récepteurs de type I et de type II activés par des cytokines Th2, IL-4 et IL-13**

(Bhattacharjee *et al.*, 2013)

Les voies de signalisation de l'IL-4 et l'IL-13 interagissent également avec les récepteurs nucléaires de la famille des PPAR (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor*) qui jouent un rôle dans l'initiation de la polarisation M2a des macrophages *via* son interaction avec le facteur de transcription STAT6 (Martinez *et al.*, 2009; Sica *et al.*, 2012; Tugal *et al.*, 2013). Une augmentation de l'expression de PPAR $\gamma$  est observée dans les macrophages dérivés de monocytes humains stimulés par l'IL-4 (Jaguin *et al.*, 2013).

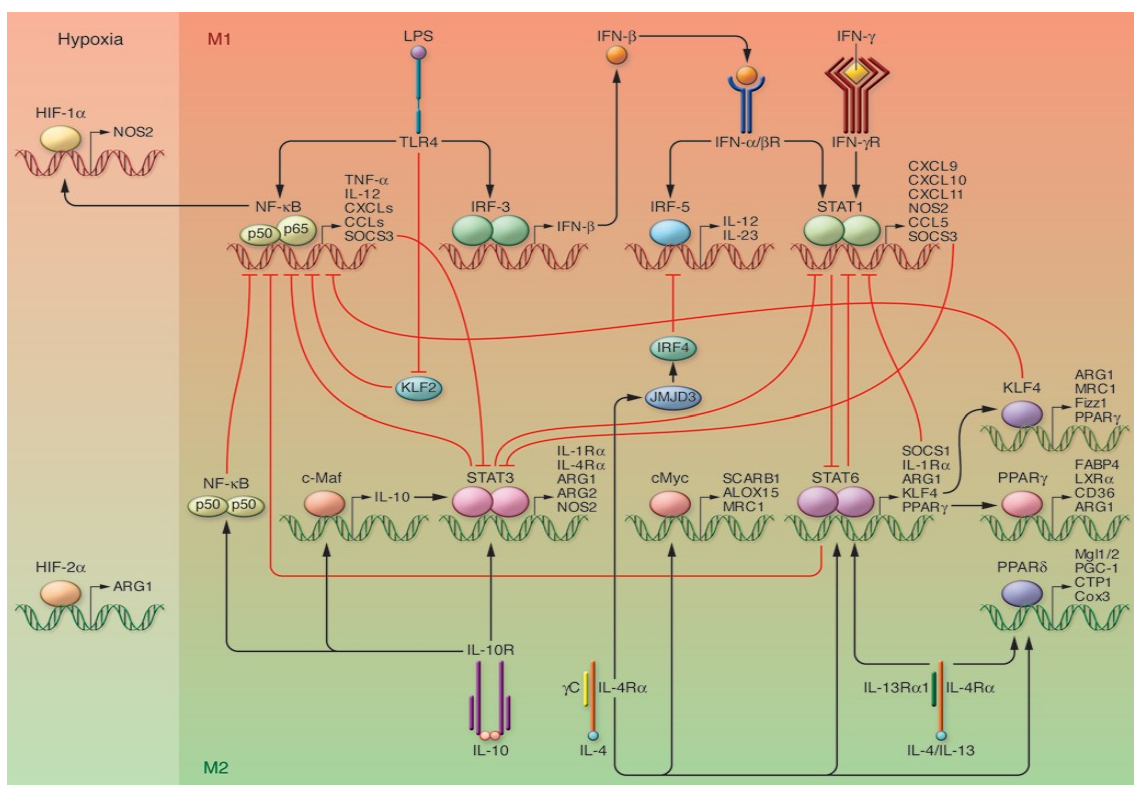
Bien qu'il existe un rôle commun entre l'IL-13 et l'IL-4 dans l'établissement du phénotype M2a des macrophages, des divergences existent quant aux gènes cibles modulés par ces deux cytokines. En effet, l'expression de certains gènes comme *TIMP3* (*Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 3*) est uniquement modulée par l'IL-4 et l'expression du gène *DUSP1* (*Dual Specificity Protein Phosphatase 1*) est uniquement induit par l'IL-13 (Bhattacharjee *et al.*, 2013). De même qu'une régulation spécifique par l'IL-4 de l'expression de certains gènes de type M2 est observé dans les macrophages murins comme l'*Arg1* et la *CHI3L3* (*Chitinase 3-like-3*) (Heller *et al.*, 2008)

## 2) Les macrophages régulateurs M2b et M2c

La polarisation des macrophages M2b nécessite la présence de deux signaux que sont les agonistes des TLRs (réponse immunitaire innée) comme le LPS, associé à des complexes immuns d'immunoglobulines de type G (IgG) produit par les lymphocytes B (réponse immunitaire adaptative) (Gerber *et al.*, 2001). Les IgG interagissent avec les récepteurs au fragment constant (Fc) des IgG (Fc $\gamma$ R), exprimés à la membrane des macrophages (Mosser *et al.*, 2008). En plus des complexes immuns, d'autres facteurs peuvent induire cette différenciation des macrophages en phénotype M2b comme les prostaglandines et les cellules apoptotiques (Mosser *et al.*, 2008).

Les macrophages anti-inflammatoires de phénotype M2c interviennent dans la dernière phase du processus inflammatoire et la restauration de l'homéostasie tissulaire post-inflammatoire. Ces macrophages M2c sont décrits dans la littérature comme étant activés par la cytokine anti-inflammatoire IL-10 mais également par des facteurs de croissance comme le TGF- $\beta$  et les glucocorticoïdes. L'expression du récepteur à l'IL-10 (IL-10R) a été mise en évidence dans les macrophages alvéolaires chez l'Homme (Fernandez *et al.*, 2004). Ce récepteur est couplé à la kinase Jak1 qui phosphoryle et active le facteur de transcription STAT3,

responsable de l'inhibition du facteur de transcription NF- $\kappa$ B et par conséquent de l'expression de cytokines pro-inflammatoires (Murray, 2006) (**Figure 8**). L'IL-10 induit également l'expression du microARN-146b responsable de l'inhibition de la voie de signalisation du TLR4 (Curtale *et al.*, 2013). L'activation des macrophages par l'IL-10 diminue l'expression d'environ 15-20% des gènes induits par le LPS (Lang *et al.*, 2002). Les macrophages M2c pourront également être stimulés de manière autocrine par le TGF- $\beta$  libéré au cours des processus de réparation tissulaire. Le TGF- $\beta$  interagit avec son récepteur hétérodimère formé des sous-unités TGF- $\beta$ R1 et TGF- $\beta$ R2 (Derynck *et al.*, 2003) et induit l'activation de voies de signalisation impliquées dans la régulation de l'expression des gènes de l'inflammation, l'apoptose, la prolifération et la différenciation cellulaire (Derynck *et al.*, 2003). Enfin, les glucocorticoïdes sécrétés en réponse à divers stress (douleur, traumatisme, infection) sont essentiels au maintien de l'homéostasie. Ils interagissent avec le récepteur spécifique aux glucocorticoïdes qui sont exprimés par les macrophages alvéolaires humains (Pujols *et al.*, 2002; Valledor *et al.*, 2004). L'activation du récepteur aux glucocorticoïdes inhibe l'expression des gènes pro-inflammatoires *via* l'inhibition des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et AP-1 (McKay *et al.*, 1999; Tugal *et al.*, 2013).



**Figure 8 : Voies de signalisation des agents inducteurs du phénotype M1 et M2 des macrophages (Sica *et al.*, 2012)**

## D. Propriétés fonctionnelles des macrophages et polarisation

Le terme « polarisation M1/M2 des macrophages » recouvre un *continuum* d'états fonctionnels. Ainsi, selon le microenvironnement, les macrophages vont adopter différentes propriétés fonctionnelles. Ils peuvent être polarisés M1 pour participer à l'activité microbicide et pro-inflammatoire, être polarisés M2a pour participer aux phénomènes de réparation et de cicatrisation du tissu et enfin, s'activer en phénotype M2b et M2c pour une action régulatrice et anti-inflammatoire permettant le retour à l'homéostasie (Mosser, 2003; Mosser *et al.*, 2008; Martinez *et al.*, 2009; Novak *et al.*, 2013).

En réponse aux agents inducteurs de la polarisation définis précédemment, les macrophages modifient de manière spécifique leur profil de production des médiateurs de l'inflammation (cytokines, chimiokines, agents microbicides, métabolites lipidiques) ainsi que leurs activités enzymatiques et phagocytaires (Mantovani *et al.*, 2004; Martinez *et al.*, 2006; Martinez *et al.*, 2013).

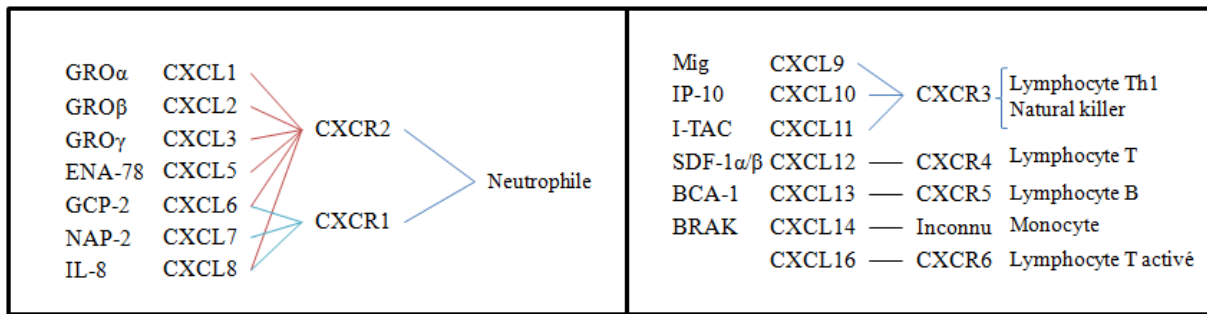
### 1) Production de médiateurs de l'inflammation

Les cytokines sont des glycoprotéines solubles de faible poids moléculaire (8 à 80 kDa) et sont produites par de nombreux types cellulaires. Les cytokines sont des substances solubles de signalisation cellulaire synthétisées par les cellules du système immunitaire, agissant à distance sur d'autres cellules pour en réguler l'activité et la fonction (recrutement, prolifération, différenciation, activation et mort cellulaire). Elles sont impliquées dans l'inflammation, la réponse immunitaire et l'hématopoïèse. Les cytokines agissent de manière autocrine, paracrine mais également endocrine *via* la circulation sanguine. Les cytokines agissent rarement seules, mais de manière conjointe avec d'autres cytokines créant ainsi tout un réseau de communication cellulaire. Elles peuvent influencer l'action d'autres cytokines de façon antagoniste, additive ou synergique. La famille des cytokines regroupe le TNF, les interférons, les interleukines, les facteurs de croissance et les chimiokines. Nous distinguerons par la suite les chimiokines par rapport aux autres membres de la famille des cytokines.

## a) Les chimiokines

Les chimiokines sont de petites molécules d'un poids moléculaire compris entre 8 et 12 kDa. Les chimiokines se divisent en quatre sous-familles (C, CC, CXC, et CX<sub>3</sub>C) selon le nombre de cystéines conservées et le nombre d'acides aminés compris entre la première et dernière cystéine dans la partie N-terminale. Une chimiokine donnée peut se lier à différents récepteurs et différentes chimiokines peuvent se lier à un même récepteur. Sauf exception, les interactions entre les chimiokines et les récepteurs des chimiokines sont peu spécifiques. Les récepteurs des chimiokines sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés à une protéine G pour la transduction du signal (RCPG). Les chimiokines sont impliquées dans le recrutement des cellules immunitaires.

Les chimiokines de type CXC sont divisées en deux sous-groupes en fonction de la présence ou non d'un motif d'acide aminé supplémentaire, E-L-R-CXC (acide glutamique-leucine-arginine-cystéine-X-cystéine). Les chimiokines avec un motif ELR regroupent CXCL1 (GRO- $\alpha$ ), CXCL2 (GRO- $\beta$ ), CXCL3 (GRO- $\gamma$ ), CXCL5 (ENA-78), CXCL6 (GCP-2), CXCL7 (NAP-2) et CXCL8 (IL-8) et sont impliquées dans le recrutement des neutrophiles qui expriment les récepteurs CXCR1 et CXCR2 (Rollins, 1997; Laing *et al.*, 2004; Mantovani *et al.*, 2004) (**Figure 9**). Le rôle de ces chimiokines est de promouvoir l'adhérence des neutrophiles aux cellules endothéliales puis leur migration vers les sites de l'inflammation selon un gradient de chimiokines. En plus d'une attraction des neutrophiles, les chimiokines CXCL1, CXCL2, CXCL3 sont également impliquées dans le recrutement et l'activation des basophiles, éosinophiles, monocytes et lymphocytes (Laing *et al.*, 2004). Le deuxième groupe concerne les chimiokines sans motif ELR comme CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP-10), CXCL11 (I-TAC), CXCL12 (SDF-1), CXCL13 (BCA-1), CXCL14 (BRAK) et CXCL16 (**Figure 9**). Ces chimiokines ont un faible pouvoir d'attraction des neutrophiles mais sont largement impliquées dans le recrutement des lymphocytes, monocytes et *Natural Killer* (Rollins, 1997; Laing *et al.*, 2004; Mantovani *et al.*, 2004).

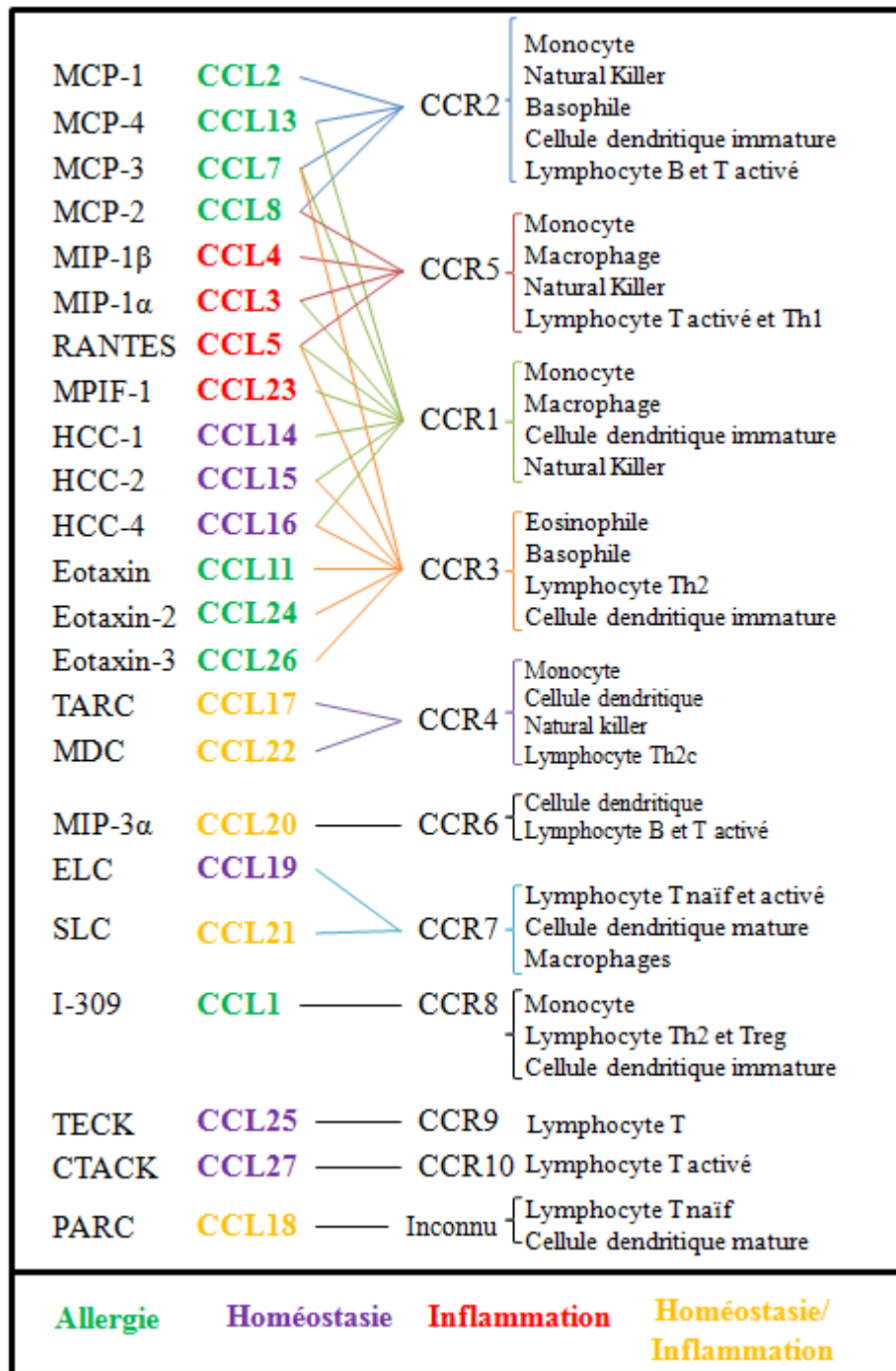


**Figure 9: Nomenclature et cellules cibles recrutés par les chimiokines de type CXC**

Une sous-division en 4 sous-groupes a été proposée pour les chimiokines de type CC selon leur activité au sein du système immunitaire (**Figure 10**). Cette sous-division reste cependant approximative. Parmi ces quatre sous-groupes, on trouve les chimiokines impliquées dans la réponse inflammatoire comme CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), CCL4 (MIP-1 $\beta$ ), CCL5 (RANTES) et CCL23 (MPIF-1) (Laing *et al.*, 2004). Ces chimiokines participent activement au processus inflammatoire *via* leur action sur le recrutement des lymphocytes Th1, monocytes, macrophages, *Natural Killer*, basophiles, éosinophiles, cellules dendritiques (Rollins, 1997; Mantovani *et al.*, 2004). Les chimiokines de l'allergie regroupent CCL1 (I-309), CCL2 (MCP-1), CCL7 (MCP-3), CCL8 (MCP-2), CCL11 (Eotaxin), CCL13 (MCP-4), CCL24 (Eotaxin-2) et CCL26 (Eotaxin-3) et sont impliquées dans le recrutement des lymphocytes Th2 et Treg (régulateur), cellules dendritiques, basophiles, éosinophiles et induisent la dégranulation des basophiles et la libération d'histamine (Laing *et al.*, 2004). Les chimiokines de l'homéostasie comme CCL14 (HCC-1), CCL15 (HCC-2), CCL16 (HCC-4), CCL19 (ELC), CCL25 (TECK) et CCL27 (CTACK) (Laing *et al.*, 2004) induisent le recrutement des lymphocytes T naïfs et mémoires, cellules dendritiques, monocytes et macrophages (Laing *et al.*, 2004; Mantovani *et al.*, 2004). Enfin, le dernier groupe est représenté par les chimiokines de l'inflammation et de l'homéostasie comme CCL17 (TARC), CCL18 (PARC), CCL20 (MIP-3 $\alpha$ ), CCL21 (SLC) et CCL22 (MDC) impliqués dans les recrutements des cellules dendritiques, monocytes, macrophages, lymphocytes B et Th2 et *Natural Killer* (Mantovani *et al.*, 2004).

Les chimiokines de type C se composent uniquement de deux membres, XCL1 (Lymphotactin) et XCL2 (SCM-1 $\beta$ ). Elles agissent uniquement sur le recrutement des lymphocytes par le récepteur XCR1 (Laing *et al.*, 2004).



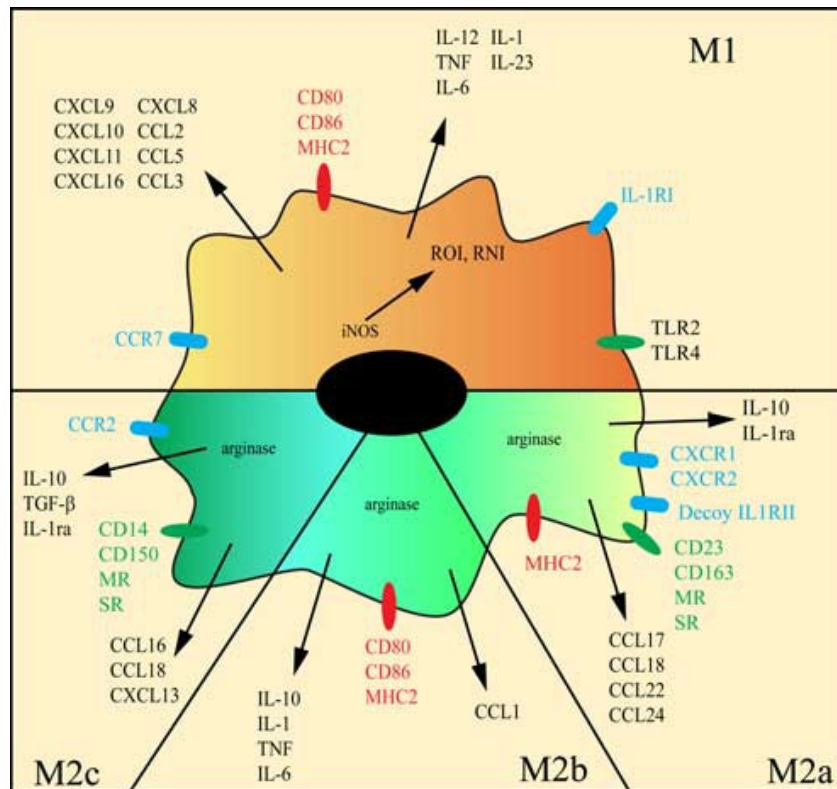


**Figure 10: Nomenclature des chimiokines de type CC et leur rôle dans les réponses immunitaires (Adaptation de la figure de Mantovani, Sica et al. 2004)**

La polarisation des macrophages en phénotype M1 ou M2 modifie le profil de production des chimiokines. La polarisation M1 des macrophages dérivés de monocytes humains par le LPS et/ou l'IFN- $\gamma$  est caractérisée par une augmentation de l'expression des chimiokines de type CC que sont CCL2, 3, 4, 5, 8, 15, 19, 20 et de type CXC que sont CXCL1, 2, 3, 5, 8, 9, 10, 11, 13, 16 (Mantovani *et al.*, 2004; Martinez *et al.*, 2006; Benoit *et al.*, 2008; Martinez *et al.*,

2009; Jaguin *et al.*, 2013) (**Figure 11**). Ces chimiokines sont impliquées dans l'activation et l'entretien de la réponse pro-inflammatoire de type cellulaire par le recrutement des lymphocytes Th1, lymphocytes cytotoxiques, *Natural Killer*, neutrophiles et monocytes. La polarisation M2a des macrophages dérivés de monocytes humains par l'IL-4 et l'IL-13 montre un profil de sécrétion de chimiokines spécifique de type CC que sont CCL13, 17, 18, 22, 23, 24 et 26 (Mantovani *et al.*, 2004; Martinez *et al.*, 2006; Benoit *et al.*, 2008; Martinez *et al.*, 2008) (**Figure 11**). Ces chimiokines sont impliquées dans le recrutement des lymphocytes Th2, lymphocytes T régulateurs (Treg), éosinophiles et basophiles.

Concernant le phénotype M2b et M2c, leur profil de chimiokines a été évalué dans des modèles de monocytes mais pas de macrophages. Ainsi, il a été montré que les monocytes M2b stimulés par le LPS et IgG secrètent CCL1 qui participe au recrutement des lymphocytes Treg, des cellules dendritiques immatures et des monocytes (Sironi *et al.*, 2006; Benoit *et al.*, 2008) (**Figure 11**). La stimulation des monocytes par l'IL-10, le TGF- $\beta$  et les glucocorticoïdes induit un phénotype M2c qui conduit à l'expression des chimiokines CCL16, CCL18 et CXCL13 (Hedrick *et al.*, 1998; Mantovani *et al.*, 2004; Pannellini *et al.*, 2004; Benoit *et al.*, 2008) (**Figure 11**). Ces chimiokines participent au recrutement des lymphocytes T naïfs, lymphocytes B, cellules dendritiques, monocytes, éosinophiles et contribuent à l'immunorégulation, la réponse immunitaire adaptative et le retour à l'homéostasie (Mantovani *et al.*, 2004).



**Figure 11:** Les cytokines et chimiokines spécifiques de chaque phénotype de polarisation des macrophages (Benoit *et al.*, 2008)

#### b) Les cytokines et facteurs de croissance

Comme pour les chimiokines, le TNF- $\alpha$ , les interleukines et les facteurs de croissance sont également régulés au cours de la polarisation des macrophages. L'activation dite classique des macrophages M1 est caractérisée par une production de cytokines de type Th1 telle que l'IL-12 associée à une faible production de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 (Martinez *et al.*, 2008). Une augmentation de l'expression de l'IL-12p35 et de l'IL-12p40 est observée dans les macrophages dérivés de monocytes humains stimulés par le LPS et l'IFN- $\gamma$  (Martinez *et al.*, 2006; Jaguin *et al.*, 2013). La production d'IL-12 par les macrophages participe à l'entretien de la polarisation M1 *via* la sécrétion d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes Th1 (Schroder *et al.*, 2004; Mosser *et al.*, 2008). Les macrophages M1 participent à la promotion et à l'entretien de la réponse inflammatoire *via* la sécrétion d'autres cytokines pro-inflammatoires que sont le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et l'IL-23 qui participent à l'activation de la réponse Th1 et à l'activité microbicide des macrophages (Mantovani *et al.*, 2004; Benoit *et al.*, 2008; Martinez *et al.*, 2008) (**Figure 11**). Une augmentation de l'expression de ces

cytokines est retrouvée dans les macrophages M1 dérivés de monocytes humains stimulés par le LPS et l'IFN- $\gamma$  (Martinez *et al.*, 2006; Jaguin *et al.*, 2013).

A l'inverse, les macrophages M2 possèdent une faible activité microbicide. L'IL-4 et l'IL-13 modulent l'activité pro-inflammatoire de l'IL-1 $\beta$  *via* la production d'IL-1ra, un antagoniste endogène des récepteurs à l'IL-1 et l'augmentation de l'expression du récepteur leurre à l'IL-1 appelé IL-1RII (Mantovani *et al.*, 2001; Martinez *et al.*, 2008). Dans les monocytes, une diminution de la production d'IL-1 $\beta$  est associée à une augmentation de l'IL-1ra (Fenton *et al.*, 1992). Il a également été observé que l'IL-4 et l'IL-13 diminuent l'expression de la caspase-1, responsable du clivage de la pro-IL-1 $\beta$  sous sa forme active (Scotton *et al.*, 2005). Une diminution de la production des cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 et IFN- $\gamma$  est également observée dans les macrophages M2a (Mantovani *et al.*, 2004; Martinez *et al.*, 2008) qui ont un faible pouvoir microbicide. (Gordon, 2003; Novak *et al.*, 2013). L'expression du TGF- $\beta$  est augmentée dans les macrophages M2a dérivés de monocytes humains (Martinez *et al.*, 2006; Jaguin *et al.*, 2013) et au cours de l'ingestion de cellules apoptotiques (Brancato *et al.*, 2011). Le TGF- $\beta$  contribue à la réparation et à la régénération tissulaire en induisant la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes et la production de collagène par ces derniers (Song *et al.*, 2000; Gordon, 2003; Novak *et al.*, 2013). Les macrophages M2a sont capables de synthétiser directement des composants de la matrice extracellulaire comme le collagène de type VI (Schnoor *et al.*, 2008), la fibronectine et la protéine BetaIG-H3 (Gratchev *et al.*, 2001; Gordon, 2003; Martinez *et al.*, 2006). Cette protéine, BetaIG-H3 entraîne l'adhésion et la migration des monocytes et fibroblastes afin d'assurer le processus de réparation tissulaire et d'augmenter la synthèse de collagène par les fibroblastes (Nacu *et al.*, 2008).

Les macrophages M2b stimulés par le LPS et les complexes immuns sont caractérisés par la production conjointe de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , l'IL-1 et l'IL-6) et anti-inflammatoire (IL-10), ce qui les différencie des macrophages de phénotype M1 et M2a (Gerber *et al.*, 2001; Mantovani *et al.*, 2004; Martinez *et al.*, 2008). L'interaction des complexes immuns avec les macrophages augmente la production d'IL-10 (Sutterwala *et al.*, 1998) mais inhibe la production d'IL-12 (Sutterwala *et al.*, 1997) empêchant la sécrétion d'IFN- $\gamma$  et le développement de la polarisation M1 (Moore *et al.*, 1993). Les macrophages M2b ne sont pas considérés comme des macrophages aux activités anti-inflammatoires mais plutôt impliqués dans le processus de régulation de l'inflammation (Mosser *et al.*, 2008).

Les agents inducteurs du phénotype M2c que sont l'IL-10, le TGF- $\beta$  et les glucocorticoïdes sont responsables de l'inhibition de l'expression des cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-12) et de l'augmentation de la production d'IL-10, IL-4 et de l'IL-1Ra impliquée dans le retour à l'homéostasie (Bogdan *et al.*, 1992; Almawi *et al.*, 1996; Valledor *et al.*, 2004; Ehrchen *et al.*, 2007; Martinez *et al.*, 2008). Les macrophages M2c sont qualifiés de macrophages désactivés et anti-inflammatoires, impliqués dans la phagocytose des cellules en apoptose et dans la résolution de l'inflammation (Martinez *et al.*, 2008).

## 2) Activité phagocytaire

Activité majeure des macrophages, la phagocytose participe aux défenses anti-microbiennes par l'internalisation et la dégradation de micro-organismes ( $\geq 0.5 \mu\text{m}$ ) et au maintien de l'homéostasie tissulaire par la phagocytose de débris, cellules sénescents, et corps apoptotique appelé efferocytose. La phagocytose débute par la reconnaissance de la particule à ingérer par un récepteur de surface puis à son internalisation. Cette internalisation est différente selon le type d'interaction micro-organisme/récepteur. Il existe deux modèles d'internalisation (Swanson *et al.*, 1995). Le modèle dit « *zippering* » correspond à l'émission de pseudopodes de part et d'autre de la particule à internaliser et est dépendant de l'interaction des récepteurs de membranes avec leurs ligands. Dans le modèle dit « *triggering* », la reconnaissance initiale entre particule et récepteur déclenche le processus d'ingestion et la formation du phagosome sans prolongement cytoplasmique. Une fois le phagosome formé, ce dernier migre vers le centre de la cellule et subit une maturation par fusion et formation de vésicules endosomiales puis lysosomiales. Cette maturation correspond au déversement dans le phagosome des enzymes et peptides antimicrobiens contenus dans les lysosomes qui vont permettre la lyse des micro-organismes et la digestion de leur constituant. Cette fusion est accompagnée d'une activation brutale du métabolisme de l'oxygène *via* la NADPH oxydase (Nicotinamide Adénine Di-nucléotide Phosphate) et d'une production de NO, tous deux ayant une forte activité bactéricide.

### a) Récepteurs membranaires des macrophages

La reconnaissance entre la particule à ingérer et les récepteurs peut être de type « directe » par reconnaissance entre les motifs moléculaires des agents pathogènes appelés PAMPs et leurs récepteurs PRR. Les PRRs sont spécifiques d'une classe de pathogène. La détection des pathogènes par ces récepteurs induit une réponse directe et rapide. La reconnaissance indirecte dite par « opsonisation » intervient quand le micro-organisme est recouvert de protéines solubles présentes dans le sérum appelées « opsonines » tels que les IgG et les composants du complément qui vont être reconnus par des récepteurs aux opsonines : FcγR et récepteurs au complément. Les cellules apoptotiques sont quant à elles reconnues par la phosphatidylsérine exprimée à leur membrane.

L'expression des récepteurs à la surface des macrophages diffère selon la polarisation M1 ou M2. Ainsi, les macrophages polarisés de type M1 par le LPS et/ou l'IFN-γ expriment majoritairement les récepteurs TLRs comme le TLR4 et son co-récepteur le CD14 ainsi que les récepteurs FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) et FcγRIII (CD16) favorisant la clairance des pathogènes opsonisés par les IgG (Mantovani *et al.*, 2004; Ambarus *et al.*, 2012). L'activation de ces récepteurs conduit majoritairement à une réponse pro-inflammatoire et à la production d'agents cytotoxiques permettant la destruction des agents pathogènes intracellulaires. L'expression du récepteur *scavenger* de type A, MARCO (*Macrophage Receptor with Collagenous Structure*), impliqué dans la reconnaissance et l'élimination des bactéries, est également un marqueur M1 (Peiser *et al.*, 2002).

Dans les macrophages dérivés de monocytes humains et les macrophages murins, l'expression du récepteur MRC1 est fortement induite en présence des cytokines Th2 que sont l'IL-4 et l'IL-13 mais également l'IL-10 (Stein *et al.*, 1992; Martinez-Pomares *et al.*, 2003; Martinez *et al.*, 2006). Ce récepteur est impliqué dans la reconnaissance et la phagocytose de certains pathogènes exprimant à leur surface des résidus mannose, fucose et N-acétylglucosamine. L'activation de ce récepteur induit un signal inhibiteur sur la réponse pro-inflammatoire de type M1 *via* l'augmentation de l'expression du récepteur leurre à l'IL-1, la sécrétion de l'antagoniste à l'IL-1R (IL-1Ra) et la production d'IL-10 (Chieppa *et al.*, 2003). Une étude transcriptomique montre également que les macrophages M2a dérivés de monocytes humains stimulés par l'IL-4 expriment le récepteur *scavenger* des macrophages de type 1 (MRS1) et des récepteurs de type lectines comme Dectin-1 (CLEC7A), DC-SIGN (CD209) et DCL-1 (CD302) impliqués dans la reconnaissance de pathogènes (Martinez *et al.*, 2006).

L'expression du récepteur *scavenger* de type B, le CD36 est augmentée dans les macrophages dérivés de monocytes humains polarisés M2a par l'IL-4 (Martinez *et al.*, 2006). Ce récepteur participe à la reconnaissance et l'internalisation des lipoprotéines de faible densité (*Low Density Lipoprotein*, LDL). Une étude récente a mis en évidence que l'internalisation des LDL par le CD36 et leur lipolyse par la lipase A joue un rôle dans l'établissement du phénotype M2a des macrophages murins et dans la défense contre les parasites (Huang *et al.*, 2014). Le CD36 participe également au processus d'efférocytose permettant la clairance des cellules en apoptose et des débris cellulaires pour restaurer l'homéostasie tissulaire (Ferracini *et al.*, 2013). D'autres marqueurs membranaires comme FcεRII (CD23) et CD200R sont également exprimés par les macrophages dérivés de monocytes humains polarisés en phénotype M2a par l'IL-4 (Koning *et al.*, 2010; Ambarus *et al.*, 2012; Beyer *et al.*, 2012).

Concernant la polarisation de type M2b et M2c des macrophages, il existe peu d'études sur la caractérisation des récepteurs pour ces deux profils de polarisation. Mais une étude récente montre que les macrophages M2c expriment le MRC1 ainsi que les récepteurs FcγRII (CD32), FcγRIII (CD16) et le récepteur *scavenger* de type B CD163, impliqués d'une part dans la reconnaissance des particules opsonisées par l'IgG et d'autre part dans la clairance des complexes hémoglobine/haptoglobuline qui prévient de l'inflammation (Ambarus *et al.*, 2012).

## b) Production d'agents microbicides

### (1) Monoxyde d'azote

Le NO est une molécule extrêmement importante dans le système immunitaire. Il est produit par l'activité de la NO synthase (NOS) dont il existe trois isoformes. La NOS1 (NOS neuronale) et la NOS3 (NOS endothéliale) sont exprimées de manière constitutive (cNOS) alors que l'expression de la NOS2 est inductible (iNOS). Les macrophages humains expriment majoritairement la iNOS dont la production de NO est dépendante de l'induction de cette enzyme (Reiling *et al.*, 1994; MacMicking *et al.*, 1997; Jung *et al.*, 2013). L'expression de la iNOS dans les macrophages est associée au phénotype M1. L'exposition des macrophages aux agonistes du TLR2, 4, 5 et 9 augmente l'expression de cette enzyme ainsi que la production de NO (Gao *et al.*, 1999; Cherayil *et al.*, 2000; Shoda *et al.*, 2001; Thoma-Uszynski *et al.*, 2001). Le NO réagit très rapidement pour donner des espèces réactives de l'azote, nitrites (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) et peroxy-nitrite (ONOO<sup>-</sup>) qui forment de puissants agents

aux activités antimicrobiennes. En revanche, l'expression de la iNOS est inhibée par les cytokines de type M2 que sont l'IL-4 et le TGF- $\beta$  (Bogdan *et al.*, 1994; Vodovotz *et al.*, 1994). Cette diminution de l'activité de l'iNOS s'explique par une augmentation de l'expression de l'Arg1 qui rentre en compétition avec la iNOS pour la L-arginine (Vodovotz *et al.*, 1994; Munder *et al.*, 1999). Dans les macrophages murins, l'IL-4 et l'IL-10 inhibent la production de NO des macrophages activés par l'IFN- $\gamma$  (Cenci *et al.*, 1993). Dans les macrophages M2a stimulés par IL-4 et IL-13, l'augmentation de l'expression de l'Arg1 induit le métabolisme de l'arginine en urée et ornithine précurseur de la synthèse de proline et polyamines (Louis *et al.*, 1999; Raes *et al.*, 2002; Martinez *et al.*, 2008). La proline et les polyamines sont impliquées dans les processus de réparation tissulaire (Shearer *et al.*, 1997).

Cependant, il est important de noter que l'induction de l'expression de la iNOS et de l'Arg1 est une des caractéristiques de la polarisation M1 et M2 des macrophages murins, aucune régulation de leur expression n'étant observée dans les macrophages chez l'homme (Murray *et al.*, 2011b).

## (2) Métabolites de l'oxygène

Les métabolites de l'oxygène également appelés espèces réactive de l'oxygène ou ROI (*Reactive Oxygen Intermedita*) sont produits lors du stress oxydatif réalisé par les macrophages activés au cours d'une infection. Ces radicaux libres sont produits par l'intermédiaire d'un complexe protéique membranaire appelé NADPH oxydase. La NADPH active permet de réduire l'oxygène moléculaire pour produire une grande quantité d'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ). L'anion superoxyde est un composé radicalaire extrêmement actif qui sert de substrat à la formation de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et de radicaux hydroxyles OH par la superoxyde dismutase et la peroxydase. Ces radicaux libres sont très instables et très actifs pour oxyder et éliminer les microorganismes mais ils peuvent également induire des lésions tissulaires. Ainsi il existe des enzymes tels que les peroxydases et les catalases, capables d'éliminer et de réguler cette production d'espèces intermédiaires réactives de l'oxygène.

Une augmentation de l'expression et de l'assemblage de la NADPH oxydase est observée au niveau des phagosomes des macrophages polarisés M1 (Brune *et al.*, 2013; Canton, 2014). A l'inverse, une diminution de l'expression de la NADPH oxydase est observée dans les macrophages de phénotype M2a, ce qui contribue à leur faible pouvoir microbicide (Balce *et al.*, 2011). Une étude récente montre que la production de ROI est augmentée dans



macrophages M2c dérivés de monocytes humains comparé aux macrophages M2a, résultant en partie d'une réduction de l'expression protéique de la sous-unité gp91phox du complexe NADPH oxydase (Kraaij *et al.*, 2013). Les phagosomes des macrophages polarisés M2a ont un pH plus acide associé à une maturation du phagosome plus rapide alors que les macrophages M1 ont un pH moins acide associé à une maturation plus lente (Canton, 2014). Cette différence de pH au sein de la lumière du phagosome pourrait contribuer aux différences d'activités de phagocytose entre les deux phénotypes de macrophages. La faible acidité des phagosomes des macrophages M1 prévient d'une trop grande dégradation des peptides immunogéniques et permet une meilleure présentation de ces derniers aux lymphocytes T.

### c) Présentation des antigènes aux lymphocytes

Les macrophages participent également à la réponse immunitaire adaptative en tant que cellule présentatrice d'antigène aux lymphocytes T. La présentation de l'antigène se réalise grâce au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Le CMH de classe I est responsable de la présentation de peptides cytosoliques, endogènes, issus ou non de la digestion de pathogènes (Mantegazza *et al.*, 2013). Le CMH de classe II est spécifique aux cellules présentatrices d'antigène, comme les macrophages, les cellules dendritiques, les lymphocytes B et T, et est impliqué dans la présentation des antigènes exogènes résultant de la phagocytose (Mantegazza *et al.*, 2013). Les molécules du CMH de classe I et de classe II présentes à la membrane des macrophages sont exposées aux lymphocytes T pour induire leur activation (Mantegazza *et al.*, 2013). Les macrophages M1 favorisent la présentation des antigènes aux lymphocytes T *via* une augmentation de l'expression des CMH de classe I et de classe II et les molécules de co-stimulation (CD80, CD86) (Mantovani *et al.*, 2004; Martinez *et al.*, 2008; Ambarus *et al.*, 2012). Les macrophages M2a et M2b expriment également les CMH de classe II et les molécules de co-stimulation (CD80, CD86) (Mosser, 2003; Edwards *et al.*, 2006; Mosser *et al.*, 2008). En revanche, la présentation des antigènes est réduite dans les macrophages M2c *via* une diminution de l'expression des CMH de classe II et des molécules de co-stimulation (Schebesch *et al.*, 1997; Martinez *et al.*, 2008).

### 3) Production de médiateurs lipidiques : les eicosanoïdes

Les eicosanoïdes sont des produits d'oxygénation d'acides gras polyinsaturés. L'acide arachidonique majoritairement incorporé dans les phospholipides membranaires est le plus abondant des précurseurs des eicosanoïdes. C'est un acide gras à 20 carbones qui possède quatre doubles liaisons commençant en position  $\omega 6$  (dénommé 20 : 4  $\omega 6$ ). Au cours d'un processus inflammatoire, l'acide arachidonique est d'abord libéré de la membrane phospholipidique et mobilisé grâce à une phospholipase A2 (PLA<sub>2</sub>). L'acide arachidonique peut également être obtenu par l'action d'une phospholipase C ou D qui aboutit à la formation d'acide phosphatidique substrat de la PLA<sub>2</sub>. Une fois l'acide arachidonique formé, ce dernier est oxygéné par deux voies principales, celle des cyclooxygénases et des lipoxygénases qui aboutissent à la formation des eicosanoïdes (**Figure 12**). Au cours de la polarisation des macrophages, le métabolisme des lipides et la production de ces eicosanoïdes sont modifiés.

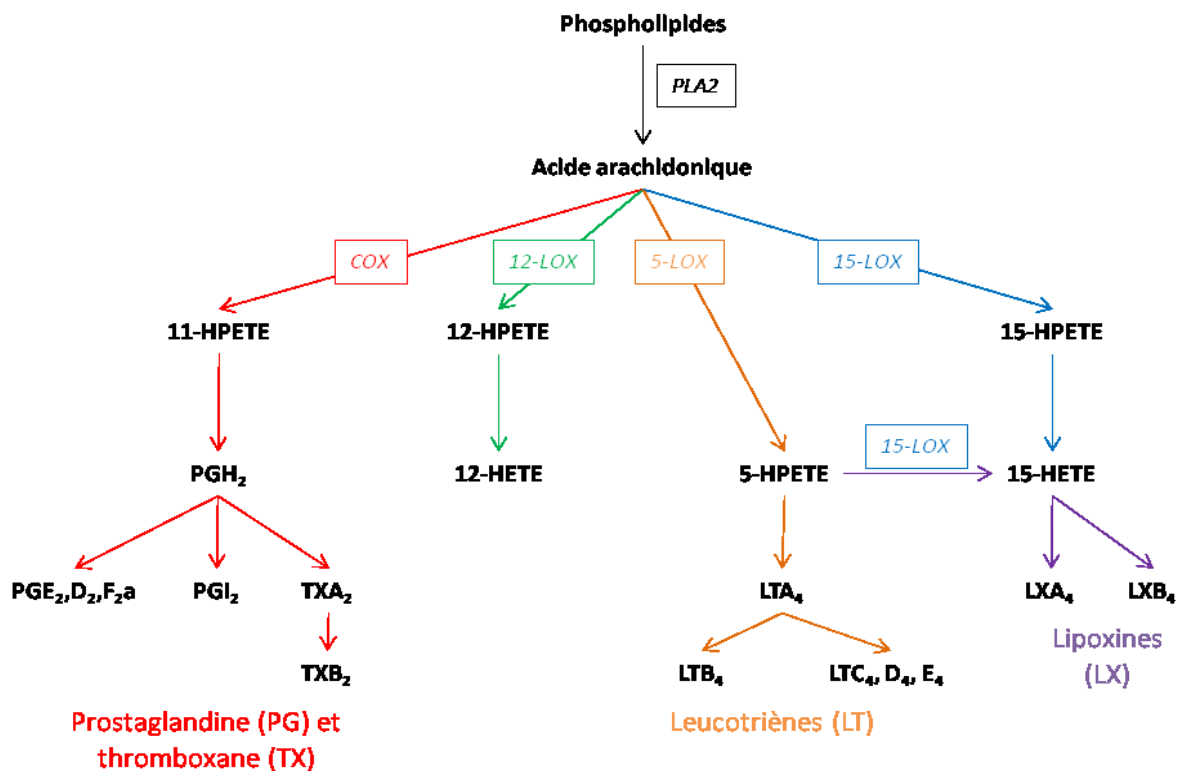


Figure 12: Les principales voies métaboliques de l'acide arachidonique

## a) Synthèse des prostanoïdes : voie des cyclooxygénases

Les cyclooxygénases sont impliquées dans la synthèse des prostanoïdes. Il existe deux isoformes de cette enzyme, codées par deux gènes différents. La cyclooxygénase de type 1 (COX-1) codée par le gène *PTGS1* (*Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 1*) dont l'expression est constitutive et qui permet la synthèse immédiate en quelques minutes des prostanoïdes. A l'inverse, l'expression de la cyclooxygénase de type 2 (COX-2) codée par le gène *PTGS2* est dite inductible par l'action de stimuli inflammatoires et agit au bout de quelques heures. L'action des COX-1 et COX-2 aboutit à la formation de prostaglandine (PG) de type  $G_2$  ( $PGG_2$ ) instable qui est rapidement modifiée pour former la  $PGH_2$  précurseur des prostaglandines  $D_2$ ,  $E_2$  et  $F_{2\alpha}$ , des protacyclines  $PGI_2$  et 6 kéto- $PGF_{1\alpha}$  et du thromboxane (TX)  $A_2$  et  $TXB_2$ . Parmi les prostanoïdes synthétisés, la  $PGE_2$  est majoritairement produite par les macrophages et joue un rôle important dans les processus inflammatoires. La  $PGE_2$  est produite par trois types de prostaglandines E synthases (PGES), l'une étant cytosolique (cPGES) et les autres étant attachées à la membrane (mPGES-1 et mPGES-2). La  $PGE_2$  exerce son activité *via* quatre récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G que sont EP1, EP2, EP3 et EP4.

Les macrophages de phénotype M1 sont majoritairement impliqués dans la synthèse de  $PGE_2$ . Une augmentation des concentrations en  $PGF_{2\alpha}$ ,  $PGI_2$  (Data UPRES EA220) et  $TBX_2$  est observée dans les macrophages polarisés M1 par le LPS et l'IFN- $\gamma$  (Dalli *et al.*, 2012). Des études ont mis en évidence que l'expression des transcrits et l'activité de la COX-2 étaient augmentées dans les macrophages alvéolaires humains de phénotype M1 stimulés par le LPS, induisant une augmentation de la production de  $PGE_2$  (Endo *et al.*, 1998; Buenestado *et al.*, 2012). A l'inverse, il a été montré que la polarisation M2a des macrophages alvéolaires par l'IL-4 diminue l'expression de la COX-2 et la production de  $PGE_2$  (Endo *et al.*, 1998).

Cependant, le rôle de la  $PGE_2$  dans la polarisation M1 des macrophages n'est pas de promouvoir ni de participer au processus pro-inflammatoire mais plutôt de limiter son développement *via* l'inhibition de la production des cytokines pro-inflammatoires comme TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CCL2, CCL3, CCL4, CXCL8 et CXCL10 par les macrophages dérivés de monocytes humains stimulés par du LPS (Bailly *et al.*, 1990; Takayama *et al.*, 2002; Ratcliffe *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2011). L'effet inhibiteur de la  $PGE_2$  sur la production des cytokines pro-inflammatoires est également observé dans les macrophages pulmonaires stimulés par le LPS (Williams *et al.*, 1997; Buenestado *et al.*, 2012). Des études ont montré que la  $PGE_2$

inhibe la phagocytose ainsi que la NADPH oxydase, limitant ainsi, la destruction des agents pathogènes par les macrophages alvéolaires humains (Aronoff *et al.*, 2004; Serezani *et al.*, 2007). La production de PGE<sub>2</sub> par les macrophages participe donc, au processus de régulation de l'inflammation et initie la reprogrammation des macrophages M1 vers un phénotype M2.

b) Synthèse des leucotriènes et acides eicosatétraénoïques : voie des lipoxygénases

L'acide arachidonique est également métabolisé par la voie des lipoxygénases. Les lipoxygénases incorporent une molécule d'oxygène dans les acides gras insaturés comme l'acide arachidonique et l'acide linoléique. Il existe trois types de lipoxygénase en fonction de la position du Carbone où sera incorporé l'oxygène : la 5-lipoxygénase, la 12-lipoxygénase et la 15-lipoxygénase.

(1) *La 5-lipoxygénase*

La 5-lipoxygénase (5-LOX) permet la synthèse d'acide 5-hydroxyperoxyeicosatétraénoïque (5-HPETE) à partir de l'acide arachidonique qui aboutit à la synthèse d'acide 5-hydroxyeicosatétraénoïque (5-HETE) et des leucotriènes (LT) A<sub>4</sub>. La FLAP (*Five Lipoxygenase-Activating Protein*), une protéine ancrée dans la membrane nucléaire, facilite la présentation de l'acide arachidonique à la 5-LOX pour la conversion en LTA<sub>4</sub>. Les leucotriènes A<sub>4</sub>Ce sont les précurseurs de la synthèse des leucotriènes B<sub>4</sub> et des cystéinyl-leucotriènes (CysLT) regroupant les leucotriènes C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> et E<sub>4</sub>. Les leucotriènes B<sub>4</sub> sont majoritairement produits par les macrophages. La polarisation M1 des macrophages induite par le LPS et l'IFN- $\gamma$  augmente la synthèse des leucotriènes B<sub>4</sub> et des CysLT qui agissent comme agents chimioattractant des polynucléaires neutrophiles (Fels *et al.*, 1982; Dalli *et al.*, 2012) et participent également à l'activité phagocytaire et cytotoxique des macrophages (Mancuso *et al.*, 1998) *via* deux types de récepteurs, les récepteurs aux leucotriènes B<sub>4</sub>, (BLT<sub>1</sub> et BLT<sub>2</sub>) et les récepteurs aux cystéinyl-leucotriènes (CysLT<sub>1</sub>, CysLT<sub>2</sub>) exprimés par les macrophages (Peters-Golden *et al.*, 2007). Les travaux de Serezani *et al.* en 2011, ont mis en évidence que la réponse au LPS est diminuée chez des souris *Knock-Out* pour la 5-LOX et qu'une production de LTB<sub>4</sub> amplifie l'activation MyD88 dépendante du facteur de transcription NF- $\kappa$ B dans les macrophages murins (Serezani *et al.*, 2011). Dans les macrophages alvéolaires humains, la production de LTD<sub>4</sub> potentialise celle du TNF- $\alpha$  et de CCL3 induite par le LPS (Menard *et al.*, 2000). Dans les monocytes et les

macrophages dérivés de monocytes humains polarisés M2a par l'IL-4 et l'IL-13, la production de LTB4 et l'expression de la 5-LOX et de la FLAP est diminuée (Chaitidis *et al.*, 2005; Dalli *et al.*, 2012; Martinez *et al.*, 2013).

### (2) *La 12-lipoxygénase*

La 12-lipoxygénase (12-LOX) initie la synthèse d'acide 12-hydroxyperoxyeicosatétraénoïque (12-HPETE) qui est rapidement transformé en acide 12-hydroxyeicosatétraénoïque (12-HETE). Les macrophages dérivés de monocytes humains expriment la 12-LOX et produisent de la 12-HETE (Dalli *et al.*, 2012; Wuest *et al.*, 2012). Dans les macrophages murins, la 12-HETE semble jouer un rôle pro-inflammatoire *via* une augmentation de l'expression et de la production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$ , l'IL-6 et CCL2 (Wen *et al.*, 2007; Wen *et al.*, 2008). Cependant, la polarisation M1/M2 des macrophages dérivés de monocytes humains induite par le LPS, l'IFN- $\gamma$ , l'IL-4 et l'IL-13, ne module pas l'expression des transcrits de la 12-LOX (Wuest *et al.*, 2012).

### (3) *La 15-lipoxygénase*

La 15-lipoxygénase (15-LOX) existe sous deux isoformes, la 15-lipoxygénase de type 1 (15-LOX-1) et de type 2 (15-LOX-2), codés respectivement par les gènes *ALOX15* et *ALOX15B* situés sur le chromosome 17 et dont l'expression est retrouvée dans les macrophages dérivés de monocytes humains et les macrophages alvéolaires humains (Levy *et al.*, 1993; Wuest *et al.*, 2012). Ces deux isoenzymes produisent, à partir de l'acide arachidonique, de l'acide 15-hydroxyperoxyeicosatétraénoïque (15(S)-HPETE) qui est transformé en acide 15-hydroxyeicosatétraénoïque (15(S)-HETE) (Kuhn *et al.*, 1993; Kilty *et al.*, 1999; Dobrian *et al.*, 2011). La 15-LOX-1 produit également de l'acide 13-hydroxyoctadécadiénoïque (13(S)-HODE) à partir de l'acide linoléique (Kuhn *et al.*, 1993; Dobrian *et al.*, 2011). L'étude de Wuest *et al.*, 2012 a montré qu'il existe une régulation distincte de l'expression de ces deux isoenzymes dans les macrophages dérivés de monocytes humains polarisés (Wuest *et al.*, 2012). En effet, dans les macrophages dérivés de monocytes humains polarisés M1 par le LPS, l'expression de la 15-LOX-2 est augmentée alors que dans les macrophages polarisés M2a par l'IL-4 et l'IL-13, l'expression de la 15-LOX-1 et de la 15-LOX-2 est induite (Wuest *et al.*, 2012). Dans la littérature, le rôle de ces deux isoenzymes dans la polarisation des macrophages a été peu étudié. Certaines études laissent suggérer un

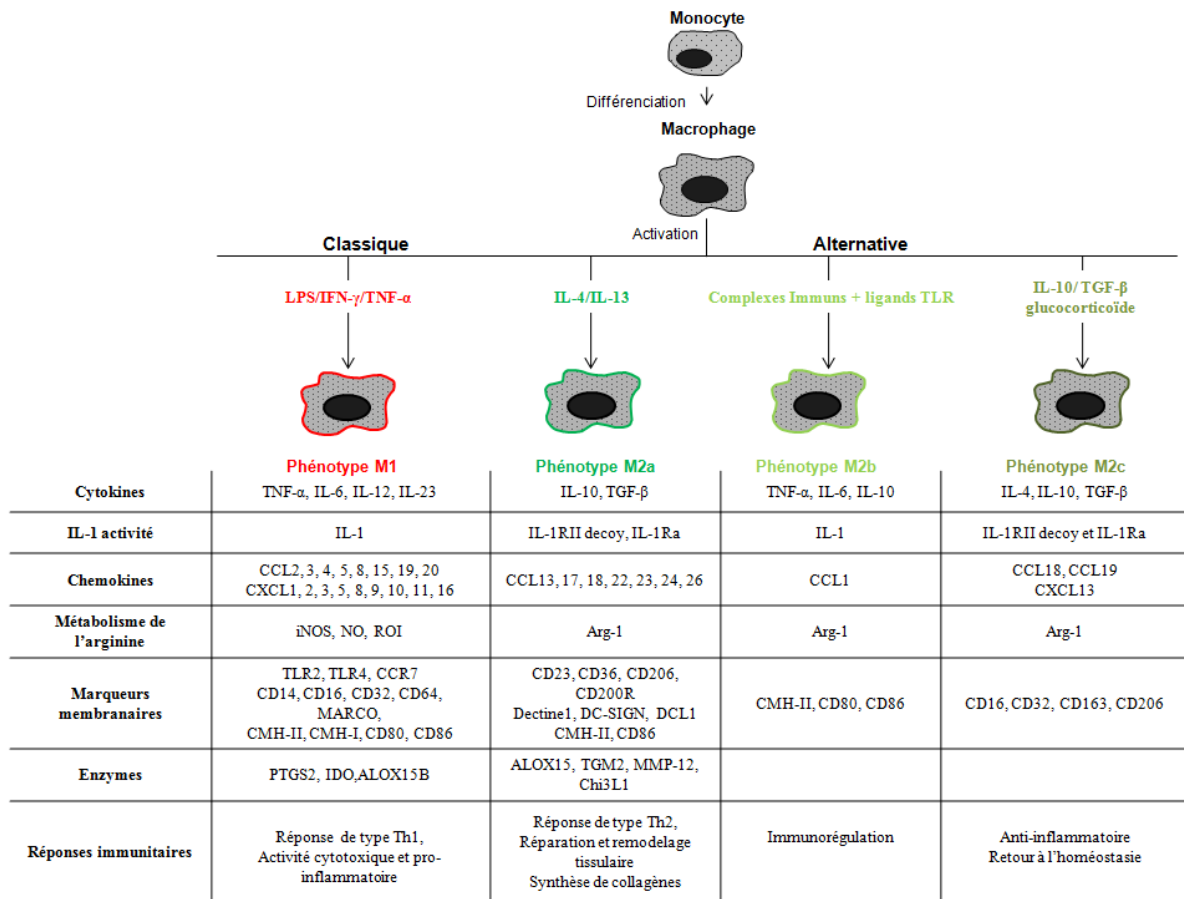
rôle pro-inflammatoire de la 15-LOX-2 dans les macrophages. L'étude de Danielsson *et al.*, 2008 a montré que l'induction de l'expression de la 15-LOX-2 augmente la production de CXCL10 par les macrophages dérivés de monocytes humains (Danielsson *et al.*, 2008). De plus, l'inhibition de l'expression de 15-LOX-2 par transfection de siRNA, est associée à une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires (IFN- $\gamma$ , IL-6, et CXCL8) dans les macrophages dérivés de monocytes humains (Magnusson *et al.*, 2012). Dans les macrophages murins, l'inhibition de la 15-LOX-1 par un inhibiteur enzymatique spécifique, le PD 146176, diminue la production d'IL-12 induite par le LPS (Middleton *et al.*, 2006). L'induction de l'expression de la 15-LOX-1 par l'IL-4 dans les macrophages murins est responsable d'une augmentation de l'expression du récepteur *scavenger* de type B, le CD36, un marqueur du phénotype M2a des macrophages (Huang *et al.*, 1999). Cependant, d'autres travaux montrent que les 15-lipoxygénases possèdent un rôle anti-inflammatoire et de résolution de l'inflammation *via* la synthèse de lipoxines, résolvines et protectines, des médiateurs lipidiques aux propriétés anti-inflammatoires (Levy *et al.*, 2014).

### c) Synthèse des lipoxines, résolvines et protectines

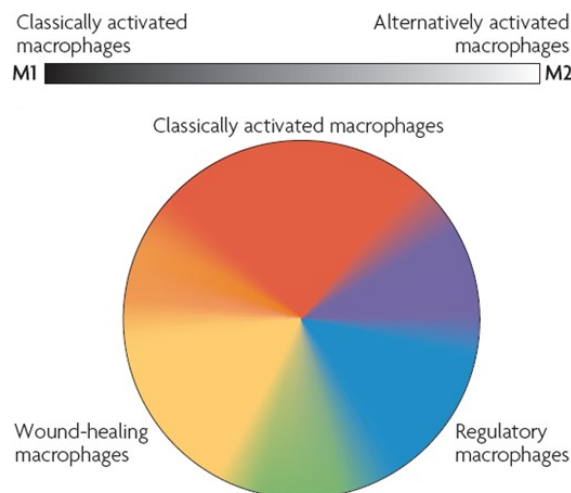
Ces métabolites lipidiques sont impliqués dans la dernière phase du processus inflammatoire qui est la résolution de l'inflammation (Serhan *et al.*, 2005). L'activation de cette phase est en partie due au changement de synthèse des médiateurs lipidiques pro-inflammatoires vers la synthèse de médiateurs anti-inflammatoires (Levy *et al.*, 2001). Le métabolisme de l'acide arachidonique est un élément clé de l'initiation de cette dernière phase. La production de PGE<sub>2</sub> au cours de l'inflammation va inhiber la production de LTB<sub>4</sub> et initier celle des lipoxines par activation successive des 15-LOX et 5-LOX (Levy *et al.*, 2001). Ces lipoxines constituent un signal d'arrêt du recrutement des polynucléaires neutrophiles au site de l'inflammation et favorisent l'élimination des cellules apoptotiques, en particulier les neutrophiles, par les macrophages (Godson *et al.*, 2000). La clairance des cellules apoptotiques induit un changement du phénotype M1 des macrophages vers un phénotype M2 favorisant un programme dit « de résolution de l'inflammation » *via* la production de TGF- $\beta$  et d'autres médiateurs lipidiques comme les résolvines et les protectines. Les résolvines sont synthétisées à partir de l'acide eicosapentaénoïque (EPA) (20 :5 w-3) et les protectines à partir de l'acide docosahexaénoïque (DHA) (22 :6 w-3) (Levy *et al.*, 2014). Une augmentation des concentrations en lipoxines et résolvines est observée dans les macrophages dérivés de monocytes humains polarisés M2a par IL-4 (Dalli *et al.*, 2012). De même que

l'ajout de résolvines sur des macrophages murins induit une polarisation de type M2 caractérisée par une augmentation de l'IL-10, du MRC1 et une diminution des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$ , l'IL-6 et CCL2 (Titos *et al.*, 2011). Ces médiateurs lipidiques contribuent à la résolution de l'inflammation et au retour à l'homéostasie.

En résumé, cet état de la littérature montre bien, que suivant leur environnement et les signaux perçus, les macrophages peuvent acquérir des fonctions distinctes (**Figure 13**). Mais la polarisation M1/M2 des macrophages ne représente pas deux populations distinctes mais un *continuum* d'états fonctionnels (**Figure 14**). En effet, les travaux de Redente *et al.*, 2010, ont montré qu'au cours d'une infection par *M tuberculosis*, il existe une compartimentalisation temporelle et spatiale des macrophages alvéolaires murins polarisés M1 et M2 (Redente *et al.*, 2010). En effet, les macrophages sont dans un premier temps polarisés M1 puis c'est mêmes macrophages s'orientent dans le temps vers une polarisation M2 au cours du temps. En adéquation avec ces résultats, les récents travaux de Xu *et al.*, 2013 ont montré qu'il existait une réversibilité de la polarisation M1/M2 des macrophages dérivés de monocytes murins (Xu *et al.*, 2013b). Ces observations suggèrent qu'au cours d'une infection, la réponse inflammatoire des macrophages débute par leur activation en phénotype M1 permettant l'élimination des pathogènes, puis s'orientent vers une polarisation de type M2 permettant de réguler la réponse inflammatoire et de favoriser la réparation tissulaire et le retour à l'homéostasie. Ces deux fonctions opposées d'une même entité révèlent à elles seules l'importante complexité et plasticité de la polarisation des macrophages, dont l'équilibre est nécessaire pour réguler la réponse inflammatoire.



**Figure 13: Représentation schématique de la polarisation M1/M2 des macrophages avec les marqueurs spécifiques de chaque état d'activation**



**Figure 14: Continuum d'états fonctionnels de la polarisation des macrophages (Mosser et al., 2008)**



### III. Polarisation des macrophages dans les maladies infectieuses et inflammatoires

La polarisation des macrophages est tributaire de l'environnement tissulaire et a fait l'objet d'investigation dans différentes pathologies. En effet, un déséquilibre de la balance M1/M2 peut conduire au développement de certaines pathologies infectieuses et inflammatoires comme l'asthme, la BPCO, les cancers, les maladies auto-immunes et métaboliques (Chinetti-Gbaguidi *et al.*, 2011; Murray *et al.*, 2011a; Pappas *et al.*, 2013).

#### A. Infections bactériennes, virales et parasitaires

Le phénotype M1 des macrophages a été mis en évidence dans des infections bactériennes avec différentes bactéries (Benoit *et al.*, 2008) que sont : *L.monocytogenes* (Shaughnessy *et al.*, 2007), *S.typhimurium* (Jouanguy *et al.*, 1999) et *M.tuberculosis* (Chacon-Salinas *et al.*, 2005). Cependant, l'action prolongée et exagérée de l'activité inflammatoire des macrophages peut s'avérer néfaste et délétère si celle-ci n'est pas contrôlée (Benoit *et al.*, 2008). L'activité excessive des macrophages M1 se retrouve dans certaines pathologies aiguës comme le sepsis (Bozza *et al.*, 2007) et les pneumopathies d'origines bactériennes (Smith *et al.*, 2007). Certaines bactéries intracellulaires vont réussir à survivre dans les macrophages par l'inhibition de leurs activités pro-inflammatoires et microbicides. Par exemple, *S dublin* inhibe la production d'IL-12 dans les macrophages murins (Bost *et al.*, 1997), de même que *M tuberculosis* inhibe l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Pathak *et al.*, 2007). Cette perturbation de la polarisation M1 des macrophages par les bactéries pathogènes peut aller jusqu'à la reprogrammation des macrophages en phénotype M2, inefficace dans l'élimination des pathogènes intracellulaires. La mise en place d'un phénotype M2 des macrophages est retrouvée dans certaines pathologies infectieuses chroniques, comme la Brucellose et les infections mycobactériennes chroniques caractérisées par une production importante d'IL-10 (Benoit *et al.*, 2008). De plus, l'exposition répétée et prolongée des macrophages à des signaux microbiens comme le LPS conduit au phénomène de tolérance caractérisé par une production réduite des cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, CCL3, CCL4 et CXCL10) et une augmentation des cytokines anti-inflammatoire

(TGF- $\beta$ , IL-10 et IL-1ra) (Mages *et al.*, 2007; Biswas *et al.*, 2009) dont l'action immunosuppressive est inefficace dans l'élimination des pathogènes intracellulaires.

Pour ce qui concerne les infections virales, l'un des exemples les plus étudiés est celui du virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Un modèle a été proposé dans lequel, les macrophages de phénotype M1 sont présents dans les stades précoces de la maladie et s'orientent vers un phénotype M2a dans la phase chronique de l'infection. Les macrophages M1 et M2a sont efficaces dans la lutte antivirale (Cassol *et al.*, 2009; Cassol *et al.*, 2010; Herbein *et al.*, 2010; Cassetta *et al.*, 2013). En effet, il a été montré *in vitro*, que le prétraitement des macrophages dérivés de monocytes humains par l'IFN- $\gamma$  pour induire le phénotype M1 et par l'IL-4 pour induire le phénotype M2a, inhibe l'infection et la réplication du virus (Cassol *et al.*, 2009). La faible susceptibilité à l'infection par le VIH des macrophages dérivés de monocytes polarisés M1 et M2a peut s'expliquer par la diminution de l'expression du récepteur CD4 qui reconnaît les protéines virales gp120 du VIH (Cassol *et al.*, 2009). De plus, les macrophages M1 produisent des chimiokines telles que CCL3, CCL4 et CCL5 (Cassol *et al.*, 2009). Ces chimiokines interagissent avec le récepteur CCR5, empêchant ce dernier d'agir comme co-récepteur du CD4 pour permettre l'entrée du virus dans la cellule. Contrairement aux macrophages M1, les macrophages M2a sont également impliqués dans la transmission du virus aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> *via* l'induction de l'expression de récepteurs de type lectine, DC-SIGN (Cassol *et al.*, 2009; Cassetta *et al.*, 2011).

Les infections parasitaires sont caractérisées par une polarisation de type M2a des macrophages associées à l'augmentation de la production des cytokines Th2 (IL-4 et IL-13), une production importante d'IgE et de mucus ainsi qu'une altération des cellules musculaires lisses et des fibroblastes (Martinez *et al.*, 2009). Cette polarisation M2a est nécessaire pour la survie de l'hôte infecté car ces macrophages participent à l'élimination des parasites extracellulaires par encapsulation de ces derniers et formation d'un granulome permettant de limiter la dissémination tissulaire (Jenkins *et al.*, 2010). L'activité de remodelage et de réparation tissulaire par les macrophages M2a est très importante au cours de ce type d'infection pour limiter les dommages tissulaires (Herbert *et al.*, 2004). Cependant, cette activité accrue de remodelage peut conduire au développement d'une fibrose délétère.

## B. Allergie/Asthme

La polarisation des macrophages joue un rôle important dans l'asthme. Les concentrations en cytokines Th2, IL-4 et IL-13, sont retrouvées augmentées dans les voies aériennes de patients asthmatiques (Murphy *et al.*, 2010). De même, dans les LBA, une augmentation de la production d'IL-13 et du nombre de macrophages alvéolaires producteurs d'IL-13 est observée chez ces patients (Prieto *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2008; Melgert *et al.*, 2011). Les concentrations en IL-13 semblent être corrélées à la sévérité de l'inflammation dans des modèles animaux d'asthme allergique (Draijer *et al.*, 2013). La production des chimiokines de type M2 par l'IL-4 et l'IL-13 participe au recrutement des cellules inflammatoires impliquées dans l'asthme (lymphocytes Th2, éosinophiles, basophiles, macrophages et cellules dendritiques) (Barnes, 2008; Dasgupta *et al.*, 2012), ainsi qu'à la libération d'histamine par les basophiles et au remodelage tissulaire *via* la synthèse de MMP-12 et la production de collagène par le TGF- $\beta$  (de Nadai *et al.*, 2006; Barnes, 2008; Kim *et al.*, 2009). L'expression du MRC1 ainsi que d'autres marqueurs de la polarisation M2 des macrophages, comme la CHI3L1 (*Chitinase-3Like protein 1*) et la TGM2 (Transglutaminase de type 2), est augmentée dans les biopsies bronchiques de patients asthmatiques (Chupp *et al.*, 2007; Melgert *et al.*, 2011; Martinez *et al.*, 2013). La CHI3L1 participe à la prolifération et la différenciation des cellules impliquées dans le remodelage de la matrice extracellulaire (Johansen *et al.*, 2007) mais également à l'hyperréactivité bronchique (Ober *et al.*, 2008). La TGM2 pourrait amplifier l'inflammation *via* l'induction de la production d'eicosanoïdes (Hallstrand *et al.*, 2010). Bien qu'il existe une dominante de la réponse Th2 dans l'asthme, plusieurs études s'accordent à montrer que les macrophages M1 sont également impliqués dans cette pathologie. Les concentrations de LPS, d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$  sont augmentées dans les expectorations et les LBA de patients asthmatiques (Berry *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2007; Shannon *et al.*, 2008) et contribuent à l'inflammation des voies aériennes et à l'hyperréactivité bronchique *via* le recrutement des neutrophiles (Lukacs *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 2009). La corticorésistance observée chez certains patients asthmatiques sévères est corrélée à une polarisation M1 des macrophages dans les LBA pouvant être liée à la présence de grande quantité de LPS dans les voies aériennes de ces patients (Goleva *et al.*, 2008).

### C. La Broncho Pneumopathie Chronique Obstructive

Dans la BPCO, le nombre de macrophages alvéolaires est augmenté dans les voies aériennes et dans le parenchyme pulmonaire (Wallace *et al.*, 1992; Di Stefano *et al.*, 1998; Barnes, 2004). Cette accumulation de macrophages est corrélée avec la sévérité de la pathologie (Chen *et al.*, 2003). La fumée de cigarette est le facteur de risque majeur de la BPCO. L'exposition *in vitro* à la fumée de cigarette, des macrophages dérivés de monocytes humains et des macrophages issus de la lignée cellulaire U937, augmente la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$  et CXCL8) suggérant l'induction d'un état de polarisation M1 (Demirjian *et al.*, 2006; Karimi *et al.*, 2006). De plus, des données non publiées au laboratoire ont montré que l'exposition *in vitro* à la fumée de cigarette augmente la production des cytokines M1 pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$  et CXCL8) et des cytokines M2 immunorégulatrices (CCL13 et CCL22) par les macrophages pulmonaires humains. Cependant, deux études récentes réalisées par Shaykhiev *et al.*, 2009 et Hodge *et al.*, 2011 ont remis en question la polarisation M1 des macrophages dans la BPCO. En effet, l'analyse transcriptomique de macrophages alvéolaires de patients non fumeurs, fumeurs et fumeurs avec BPCO a montré une diminution de l'expression de certains marqueurs M1 au profit d'une induction de l'expression des marqueurs M2 chez les patients fumeurs, qui s'accroît chez les patients BPCO (Shaykhiev *et al.*, 2009). Parmi, les marqueurs M1 dont l'expression est diminuée on trouve les chimiokines (CXCL9, CXCL10, CXCL11 et CCL5) impliquées dans le recrutement des lymphocytes Th1 et lymphocytes T cytotoxiques. La diminution de ces chimiokines pro-inflammatoires serait responsable d'une altération de l'activité cytotoxique et phagocytaire des macrophages, associée à la persistance de certaines infections bactériennes et d'une augmentation des exacerbations chez les patients BPCO (Berenson *et al.*, 2006; Sapey *et al.*, 2006; Taylor *et al.*, 2010). Parmi les marqueurs M2 dont l'expression est augmentée, on peut noter, le récepteur à l'adénosine A3 (*ADORA3*) impliqué dans l'immunorégulation et les métalloprotéinases matricielle-2 (MMP-2) et MMP-7 qui jouent un rôle dans la dégradation de la matrice-extracellulaire et le remodelage tissulaire observés chez les patients souffrant de BPCO (Baraldo *et al.*, 2007). L'étude de Kim *et al.*, 2008 a montré une augmentation des macrophages marqués positivement à l'IL-13 chez les patients BPCO suggérant une augmentation du phénotype M2 (Kim *et al.*, 2008). L'étude de Hodge *et al.*, 2011, a quant à lui montré qu'il existait un phénotype mixte M1/M2 des macrophages alvéolaires chez les patients BPCO (Hodge *et al.*, 2011). En effet, certains marqueurs M1

(CMH de classe II) et M2 (MRC1, CD31, CD44 et CD91) sont diminués alors que d'autres marqueurs M1 (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12) et M2 (DC-SIGN) sont augmentés dans les macrophages alvéolaires de patients fumeurs avec BPCO (Hodge *et al.*, 2003; Hodge *et al.*, 2011).

Ces observations suggèrent que l'état de polarisation des macrophages varie en fonction de la sévérité et de l'évolution de la BPCO.

## D. Obésité

L'obésité est aujourd'hui un problème de santé publique majeur dans les pays industrialisés et représente un risque important de développement du diabète de type 2 d'insulino-résistance et d'athérosclérose. L'obésité est associée à une diminution de la sensibilisation des adipocytes à l'insuline. La sensibilité des adipocytes à l'insuline est influencée par la sécrétion d'adipokines : la leptine et l'adiponectine (Tateya *et al.*, 2013). L'obésité est associée au développement d'un état d'inflammation chronique du tissu adipeux. Les macrophages qui résident dans le tissu adipeux sont appelés ATM (*Adipose Tissue Macrophages*). Les ATM de souris saines, ont un phénotype M2 (Lumeng *et al.*, 2007). Ces macrophages sont maintenus en l'état par la production d'IL-4 et d'IL-13 par les adipocytes et participent au maintien de l'homéostasie du tissu adipeux et à la sensibilité des adipocytes à l'insuline (Kang *et al.*, 2008). En revanche chez les individus obèses, la polarisation des macrophages s'oriente vers un phénotype M1. Ce changement de phénotype semble être associé à la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires par les adipocytes comme le TNF- $\alpha$ , CCL2, CCL5 et CCL8 impliqués dans le recrutement des monocytes qui vont s'activer en macrophages M1 (Weisberg *et al.*, 2003; Weisberg *et al.*, 2006). Le taux d'infiltration des ATM de phénotype M1 est corrélé à la sévérité de l'obésité et contribue à l'inflammation chronique. Ces macrophages vont sécréter des cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) impliquées dans le phénomène d'insulino-résistance par inhibition de l'action des adipokines (Lumeng *et al.*, 2007). De plus, chez les patients obèses, on observe une accumulation de cellules apoptotiques issues des adipocytes qui crée un environnement inflammatoire autour des macrophages facilitant l'activation en phénotype M1 (Cinti *et al.*, 2005).

## E. Cancer

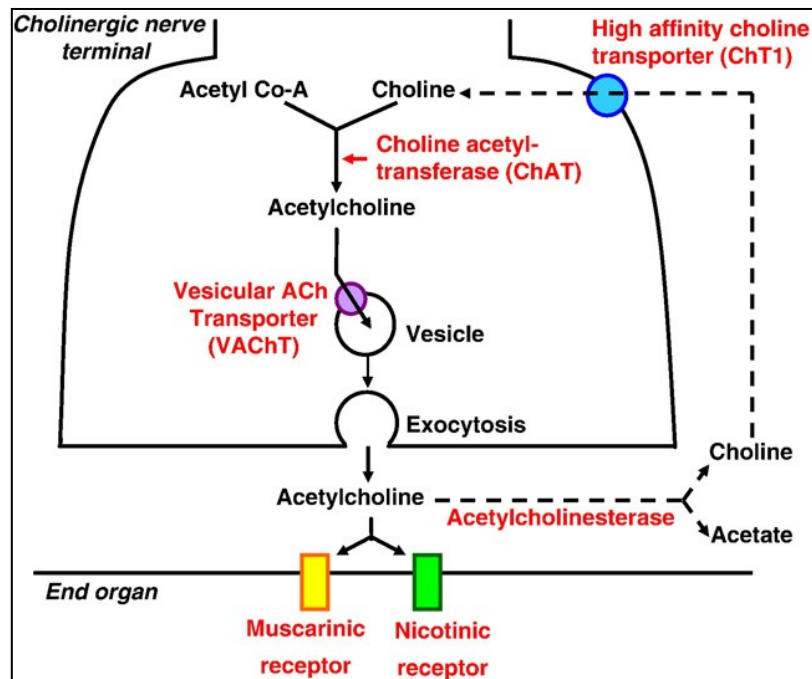
Dans le cancer, l'inflammation est majoritairement due au recrutement des monocytes qui vont se différencier en macrophages dans le tissu tumoral. Les macrophages M1 jouent un rôle anti-tumoral et sont impliqués dans l'inhibition de la croissance tumorale *via* leur action cytotoxique et pro-inflammatoire (Biswas *et al.*, 2010; Almatroodi *et al.*, 2014). La présence des macrophages M1 est notamment corrélée à un meilleur pronostic de survie dans le cancer pulmonaire non à petites cellules (Ohri *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2010). L'environnement tumoral et la progression tumorale pourraient résulter d'un changement de phénotype des macrophages *via* l'initiation d'un profil transcriptionnel spécifique proche de celui des macrophages M2 (M2-like). Ces macrophages au profil M2-like sont appelés TAM (*Tumour Associated Macrophages*). Les TAM sont en nombre important au sein des tumeurs et font le lien entre inflammation et cancer. La densité des TAM au sein des cancers est corrélée de manière significative à un mauvais pronostic de survie des patients (Ohri *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2010; Chung *et al.*, 2012). Les TAM sont capables de sécréter la cytokine anti-inflammatoire IL-10 et produisent de faible quantité de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et l'IL-6, impliquées dans la régression tumorale (Mantovani *et al.*, 2002; Biswas *et al.*, 2006; Almatroodi *et al.*, 2014). Les TAM sont de faibles producteurs de NO, de ROI et expriment très faiblement les CMH de classe II, ce qui leur confère un faible pouvoir cytotoxique, de présentation des antigènes et facilite la progression tumorale (Mantovani *et al.*, 2002; Martinez *et al.*, 2008; Almatroodi *et al.*, 2014). Ces macrophages possèdent surtout une activité pro-angiogénique importante qui leur permet d'agir sur le développement tumoral et la dissémination de métastases (Martinez *et al.*, 2008). L'accumulation des TAM est associée à l'angiogénèse et à la production de facteurs pro-angiogéniques comme le TGF- $\beta$ , le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) et le PDGF (*Platelet-Derived Endothelial Growth Factor*) (Martinez *et al.*, 2008). Les TAM produisent également de la MMP-9 qui participe à la destruction de la matrice extracellulaire et du stroma facilitant la migration des cellules cancéreuses vers la circulation sanguine (Quatromoni *et al.*, 2012).

## IV. Système cholinergique et récepteurs nicotiques $\alpha 7$ dans les macrophages

### A. Le système cholinergique neuronal et non neuronal

Dans la littérature, deux systèmes cholinergiques sont actuellement décrits. Le système cholinergique neuronal et le système cholinergique non neuronal. Ce dernier correspond à la production d'acétylcholine (ACh) dans les cellules non neuronales.

L'acétylcholine, principal neurotransmetteur endogène du système nerveux cholinergique, est synthétisée, stockée et libérée par les terminaisons nerveuses cholinergiques (Prado *et al.*, 2002). La synthèse d'ACh est réalisée à partir d'acétyl-coenzyme A (acétyl-coA) et de choline catalysée par la choline acétyltransférase (ChAT) et dans une moindre mesure par la carnitine acétyltransférase (CarAT) (Tucek *et al.*, 1982). La choline est transportée dans la cellule *via* l'expression du transporteur de haute affinité pour la choline (ChT1). L'acétylcholine nouvellement synthétisée est capturée et stockée dans des vésicules synaptiques par le transporteur vésiculaire de l'acétylcholine (VACHT) avant d'être libérée par exocytose dans le milieu extracellulaire. L'acétylcholine libérée interagit avec deux types de récepteurs, les récepteurs nicotiques et les récepteurs muscariniques. Afin de limiter l'action de l'acétylcholine au niveau de la synapse, celle-ci est dégradée par l'acétylcholinestérase en choline et acétate. La butyrylcholinestérase est également capable de dégrader l'acétylcholine mais n'est pas impliquée dans la dégradation de l'acétylcholine au niveau synaptique. La choline est ensuite recyclée à l'intérieur de la cellule par le transporteur ChT1 pour être une nouvelle fois utilisée comme substrat (**Figure 15**).



**Figure 15: Les différents composants du système cholinergique neuronal**  
(Gwilt *et al.*, 2007)

En plus de cette synthèse au niveau neuronal, l'acétylcholine est également synthétisée et sécrétée par des cellules dites non neuronales, définissant ainsi le « système cholinergique non neuronal » (Wessler *et al.*, 1998; Galvis *et al.*, 2006). Le système cholinergique non neuronal utilise les mêmes composants que le système cholinergique neuronal. On y retrouve la choline, la ChAT, le transporteur ChT1 et l'acétylcholinestérase (Gwilt *et al.*, 2007). Parmi les différents types cellulaires impliqués, on trouve principalement les cellules épithéliales et endothéliales, les cellules musculaires ainsi que de nombreuses cellules du système immunitaire dont les macrophages. L'expression de la choline acétyltransférase associée à une production d'acétylcholine a été décrite dans les macrophages alvéolaires chez l'Homme (Wessler *et al.*, 1999; Wessler *et al.*, 2001b). Ce système cholinergique non neuronal pourrait participer au tonus cholinergique bronchique et à l'inflammation pulmonaire dans l'asthme et la BPCO (Wessler *et al.*, 2001b). Même si d'un point de vue fonctionnel, ces deux systèmes semblent être similaires, ils possèdent cependant une différence majeure dans le processus de stockage de l'acétylcholine. Contrairement aux cellules neuronales, où l'acétylcholine est stockée dans des vésicules synaptiques, l'acétylcholine issue des cellules non neuronales semble être immédiatement sécrétée après sa synthèse. Ainsi les concentrations péri-cellulaires resteraient faibles au regard des concentrations intra-synaptiques. L'utilisation de placenta



humain comme modèle d'étude a mis en évidence que la libération d'acétylcholine non neuronale est réalisée par les transporteurs de cation organique (OCT) (Wessler *et al.*, 2001a). Une fois l'ACh libérée par la cellule, cette dernière interagit de manière autocrine et paracrine sur ses récepteurs muscariniques et nicotiniques.

## 1) Les récepteurs cholinergiques

L'acétylcholine est le ligand endogène des récepteurs cholinergiques qui se divisent en deux entités : les récepteurs nicotiniques (nAChRs) et les récepteurs muscariniques (mAChRs). Dans cette partie nous insisteront d'avantage sur les récepteurs nicotiniques que muscariniques puisqu'ils sont l'objet de notre étude sur la polarisation des macrophages.

### a) Les récepteurs muscariniques

Les récepteurs muscariniques sont des récepteurs métabotropiques qui appartiennent à la superfamille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Il existe 5 sous-types de récepteurs différents (M1 ; M2 ; M3 ; M4 ; M5). Chaque sous-type de récepteur se compose : d'une extrémité N-terminale (N-Ter) extracellulaire qui fixe le ligand, de 7 domaines transmembranaires et d'une extrémité intracellulaire couplée aux protéines G. L'expression des sous-types de récepteurs muscariniques (M1-M5) a été décrite dans les cellules immunitaires comme les leucocytes, les lymphocytes B et T, les monocytes et les macrophages. Au niveau du tissu pulmonaire, l'expression des sous-types de récepteurs muscariniques M1, M2 et M3 est documentée dans les voies aériennes (Mak *et al.*, 1990; Gwilt *et al.*, 2007). On retrouve une expression des récepteurs M1-M5 dans les macrophages dérivés de monocytes humains, les macrophages humains isolés d'expectorations induites, les macrophages alvéolaires et les macrophages pulmonaires (Profita *et al.*, 2005; Gwilt *et al.*, 2007; Koarai *et al.*, 2012).

Les récepteurs M1, M3 et M5 sont couplés aux protéines Gq qui activent la phospholipase C (PLC), responsable à son tour de la synthèse d'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) et de diacylglycérol (DAG) qui induit une augmentation de la concentration intracellulaire en  $Ca^{2+}$  responsable de la contraction du muscle lisse trachéo-bronchique et de la sécrétion de mucus

(Rogers, 2002; Racke *et al.*, 2004; Gosens *et al.*, 2006). A l'inverse, les récepteurs M2 et M4 sont principalement couplés à des protéines G inhibitrices (Gi) qui entraînent une diminution de la synthèse d'AMPc (*Adenosine Mono Phosphate cyclique*) et de la PKA (*Protéine Kinase A*), responsable de l'inhibition de la contraction de muscle lisse.

Les récepteurs muscariniques sont également impliqués dans la réponse inflammatoire orchestrée par les macrophages. Une étude récente a montré que la stimulation des macrophages pulmonaires par le carbachol, induit la sécrétion de LTB<sub>4</sub>, impliqué dans l'attraction des neutrophiles, mais ne module pas la production de CXCL8 et d'IL-6 (Koarai *et al.*, 2012). L'utilisation du tiotropium, un antagoniste des récepteurs muscariniques, inhibe le recrutement des neutrophiles par les macrophages alvéolaires humains (Vacca *et al.*, 2011).

## b) Les récepteurs nicotiques

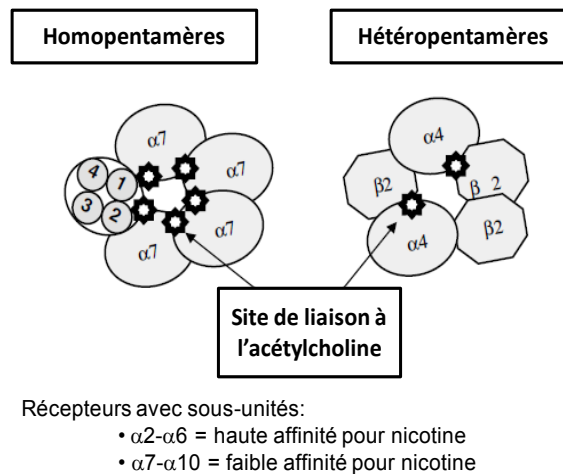
### (1) Les différents sous-types de récepteurs nicotiques

Les récepteurs nicotiques appartiennent à la grande famille des récepteurs canaux extracellulaires (LGIC ou *Ligand Gated Ion Channel*) à boucle-cysteine (*Cys-Loop receptor*). Ce sont des pentamères qui forment un canal ionique perméable aux ions. Ces pentamères se composent de sous-unités homologues ou hétérologues qui s'arrangent symétriquement autour d'un axe perpendiculaire à la membrane. Il existe deux types de récepteurs nicotiques que sont les récepteurs nicotiques de type musculaire et de type neuronal.

Les récepteurs nicotiques de type musculaire sont impliqués dans l'initiation de la contraction musculaire (Albuquerque *et al.*, 2009). Ils sont localisés de manière très dense dans les membranes post-synaptiques du myocyte (muscle strié squelettique) au niveau de la jonction neuromusculaire (plaque motrice). Les récepteurs nicotiques musculaires sont constitués de 5 sous-unités :  $\alpha$  ;  $\beta$  ;  $\gamma$  ;  $\delta$  ; et  $\epsilon$ .

Les récepteurs nicotiques de type neuronal sont quant à eux présent au niveau du système nerveux central ainsi que dans les cellules non neuronales. Ils sont exprimés au niveau présynaptique où ils jouent un rôle dans le contrôle de la libération de divers neurotransmetteurs. Ils sont aujourd'hui très étudiés dans de nombreuses maladies neurologiques (Alzheimer, Parkinson, schizophrénie) et en tant que cible pharmacologique dans l'immunité et la dépendance à la nicotine (Varénicline, agoniste partiel  $\alpha 4/\beta 2$ ). Les

récepteurs nicotiques de type neuronal sont constitués de neuf sous-unités alpha ( $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha 7$ ,  $\alpha 8$ ,  $\alpha 9$  et  $\alpha 10$ ) et 3 sous-unités bêta ( $\beta 2$ ,  $\beta 3$  et  $\beta 4$ ) (Albuquerque *et al.*, 2009). Ces sous-unités s'associent en homopentamères composés de cinq sous-unités identiques ( $\alpha 7$ ,  $\alpha 8$  et  $\alpha 9$ ) ou sous forme d'hétéropentamères formés d'une association de deux sous-unités différentes  $\alpha$  et  $\beta$  avec une stœchiométrie de  $(\alpha x)_2(\beta x)_3$  (**Figure 16**).



**Figure 16: Structure des récepteurs cholinergiques nicotiques de type homopentamère ( $\alpha 7$ ) et hétéropentamère ( $\alpha 4\beta 2$ ) (de Jonge *et al.*, 2007)**

## (2) Structure des récepteurs nicotiques

La structure des récepteurs nicotiques a été très bien étudiée grâce à leur homologue présent dans le tissu électrique du poisson *Torpedo*. Le récepteur nicotinique est une glycoprotéine membranaire d'une masse moléculaire d'environ 290 kDa. Ces récepteurs se composent de 5 sous-unités dont chacune possède un grand domaine extracellulaire hydrophile avec une extrémité N-terminale, 4 domaines transmembranaires hydrophobes (M1-M4), deux boucles intracellulaires hydrophiles qui lient les 4 domaines transmembranaires entre eux et une courte séquence extracellulaire C-terminale (Tsetlin *et al.*, 2011). De plus, chaque sous-unité contient dans sa partie N-terminale, une boucle cystéine formée de deux résidus cystéines à l'origine de la transduction du signal d'ouverture du canal. Le grand domaine extracellulaire possède des sites de fixation pour les agonistes, antagonistes

compétitifs et non compétitifs et les modulateurs allostériques positifs (PAM). Les 4 domaines transmembranaires permettent la formation du canal ionique qui s'organise autour du domaine transmembranaire amphiphile M2 de chacune des 5 sous-unités associées.

Le site de fixation des agonistes nicotiques se situe dans la partie N-terminale du récepteur. Il est situé à l'interface entre deux sous-unités ; une sous-unité  $\alpha$  et une autre sous-unité complémentaire ( $\gamma$ ,  $\delta$  ou  $\varepsilon$  pour les récepteurs de type musculaire,  $\alpha$  ou  $\beta$  pour les récepteurs de type neuronaux). Ce site de fixation est capable de lier les agonistes nicotiques et antagonistes compétitifs. Les récepteurs hétéropentamériques possèdent deux sites de fixations contrairement aux récepteurs homopentamériques qui en possèdent 5. Lorsqu'un agoniste stimule le récepteur nicotinique, celui-ci s'active pour former un canal ionique perméable aux ions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$  qui vont entrer dans le cytoplasme de la cellule. La stimulation des récepteurs nicotiques induit un influx calcique soit par l'ouverture du canal soit par l'entrée de charge positive dans la cellule qui conduit à la dépolarisation membranaire de la cellule provoquant l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants et l'entrée des ions  $\text{Ca}^{2+}$ .

Concernant les antagonistes non compétitifs, il existe deux sites d'interactions. Un site de haute affinité localisé dans le canal pour inhiber de manière stérique le passage des ions. Et un second site de faible affinité, localisé au niveau membranaire pour bloquer le récepteur de façon allostérique.

Les récepteurs nicotiques ont la propriété de pouvoir interagir avec des modulateurs allostériques positifs, permettant d'augmenter la sensibilité des récepteurs pour leur ligand. Ces agents modulateurs positifs, favorisent et amplifient la réponse des agonistes nicotiques. Ils se fixent sur un site distinct, situé dans la partie N-terminale extracellulaire des récepteurs nicotiques.

### (3) *Expression des récepteurs nicotiques*

Les récepteurs nicotiques sont majoritairement exprimés au sein du système nerveux central et périphérique. La mise en évidence d'un système cholinergique non neuronal a cependant révélée que ces récepteurs étaient également exprimés par les cellules immunitaires, comme les monocytes (Wang *et al.*, 2003), neutrophiles (Benhammou *et al.*, 2000), éosinophiles (Blanchet *et al.*, 2007), lymphocytes (Hiemke *et al.*, 1996; Villiger *et al.*,

2002; Peng *et al.*, 2004) et macrophages (Sekhon *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2003; Khan *et al.*, 2012). De nombreuses études ont montré que l'expression du récepteur nicotinique  $\alpha 7$  dans les macrophages est responsable de l'effet anti-inflammatoire du système cholinergique, décrit pour la première fois par l'équipe du Dr. Kevin J. Tracey (Borovikova *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2003; Parrish *et al.*, 2008).

## **B. Les récepteurs nicotiques $\alpha 7$**

### **1) Structure du récepteur nicotinique $\alpha 7$**

Les récepteurs nicotiques  $\alpha 7$  sont de type homopentamérique, formés par l'assemblage de 5 sous-unités  $\alpha 7$  identiques qui forment un pore fonctionnel (**figure 14**). Le gène codant pour la sous-unité  $\alpha 7$  (*CHRNA7*) est situé sur le chromosome 15 et se compose de 10 exons. L'exon 1 correspond au peptide signal de la protéine. Le site de liaison des agonistes est situé dans la partie N-terminale extracellulaire codé par les exons 2 à 6. Les exons 7 à 8 codent pour les 3 premiers domaines transmembranaires dont le deuxième forme le canal ionique. Les exons 9 à 10 codent pour la boucle intracellulaire cytoplasmique ainsi que pour le quatrième et dernier domaine transmembranaire. La sous-unité  $\alpha 7$  est une protéine de 57 kDa, composé de 502 acides aminés. Les récepteurs nicotiques  $\alpha 7$  possèdent une forte affinité pour fixer l' $\alpha$ -bungarotoxine, une neurotoxine de serpent, qui possède des propriétés antagonistes sur ce dernier. Le site de liaison de cet antagoniste se trouve dans la partie N-terminale extracellulaire codée par les exons 1-5. Le canal ionique des récepteurs nicotiques  $\alpha 7$  possède une forte perméabilité aux ions calciques ainsi qu'une rapide désensibilisation lors d'une exposition prolongée à un agoniste nicotinique (Couturier *et al.*, 1990).

L'épissage alternatif conduit à la formation de six variants d'ARN messager codant pour la sous-unité  $\alpha 7$  dont on ne connaît pas encore très bien les propriétés fonctionnelles; et une nouvelle forme partiellement dupliquée du récepteur nicotinique  $\alpha 7$ , codé par le gène *CHRFAM7A* (Gault *et al.*, 1998; Araud *et al.*, 2011). Les exons 5 à 10 du gène *CHRNA7* sont dupliqués et les exons 1 à 4 sont remplacés par quatre nouveaux exons du gène *FAM7A* nommés  $\alpha 7A$ ,  $\alpha 7B$ ,  $\alpha 7C$  et  $\alpha 7D$ . Cette forme dupliquée du récepteur code pour une protéine appelée dup $\alpha 7$ . Cependant, on s'interroge actuellement sur l'activité fonctionnelle de ce récepteur dup $\alpha 7$ . En effet, plusieurs études n'ont pas montré d'activité de la nicotine sur ce

récepteur (Villiger *et al.*, 2002). L'absence des exons 1 à 4 pouvant expliquer cette absence d'activité fonctionnelle du récepteur  $\alpha 7$ .

L'expression du gène *CHRFAM7A* est uniquement retrouvée chez l'Homme au niveau du système nerveux central, des leucocytes (Villiger *et al.*, 2002), des macrophages humains (de Lucas-Cerrillo *et al.*, 2011) ainsi que dans les lignées cellulaires de monocytes (THP-1, U937 et Mono-Mac-6) (Benfante *et al.*, 2011). La découverte d'un polymorphisme du gène *CHRFAM7A* serait corrélée au développement de certaines maladies psychiatriques comme la schizophrénie et les troubles bipolaires (Flomen *et al.*, 2006; Sinkus *et al.*, 2009).

## **2) Rôle du récepteur nicotinique $\alpha 7$ dans les fonctions des macrophages**

Différents travaux ont été consacrés au rôle du système cholinergique dans la composante inflammatoire d'origine macrophagique. Plusieurs travaux dans la littérature ont mis en évidence que la nicotine et la fumée de cigarette altèrent les propriétés fonctionnelles et microbicides des macrophages, comme la phagocytose (Phipps *et al.*, 2010; Kar Mahapatra *et al.*, 2011) et la production de médiateurs de l'inflammation (Borovikova *et al.*, 2000). Une grande partie de ces effets sont attribués à une accumulation de la nicotine dans les lysosomes de macrophages. Dans la littérature, cette composante anti-inflammatoire cholinergique est due aux sous-unités  $\alpha 7$  des récepteurs nicotiniques exprimées par les macrophages humains (Wang *et al.*, 2003). En effet, la stimulation des macrophages par des agonistes nicotiniques  $\alpha 7$  semble avoir un effet inhibiteur sur la production des cytokines pro-inflammatoires caractéristiques du phénotype M1 des macrophages. Ainsi, la nicotine inhibe la production de TNF- $\alpha$ , IL-1 et IL-6 par les macrophages dérivés de monocytes humains stimulés par le LPS (Wang *et al.*, 2003), d'IL-1 et de CXCL8 par une lignée de macrophages U937 stimulés par le LPS (Sugano *et al.*, 1998). De la même manière, l'épibatidine, agoniste des récepteurs nicotiniques  $\alpha 7$ , inhibe la production de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 et IL-18 par la lignée de macrophages U937 stimulés par le LPS (Chernyavsky *et al.*, 2010). Enfin, l'acétylcholine inhibe la production LPS-induite de TNF- $\alpha$ , d'IL-1 $\beta$ , IL-6 et IL-18 dans les macrophages dérivés de monocytes humains (Borovikova *et al.*, 2000). La choline, agoniste des récepteurs  $\alpha 7$ , diminue également la production LPS induite de TNF- $\alpha$  dans les macrophages dérivés de monocytes humains (Parrish *et al.*, 2008). Cette action inhibitrice des agonistes nicotiniques sur la production des cytokines pro-inflammatoires est médiée par les récepteurs nicotiniques

$\alpha 7$ . En effet, chez des souris déficientes pour le gène codant les sous-unités  $\alpha 7$ , aucune diminution de la production de TNF- $\alpha$  n'est observée en présence d'acétylcholine et de nicotine (Wang *et al.*, 2003). De plus, ces effets immunorégulateurs par les agonistes nicotiniques ont été pour certains inhibés par l' $\alpha$ -bungarotoxine, antagoniste des sous-unités  $\alpha 7$  (Yoshikawa *et al.*, 2006; Amoruso *et al.*, 2007). Les travaux de Wongtrakool *et al.*, 2012 montrent que les marqueurs de la polarisation M2 des macrophages (TGF- $\beta$ , IL-13 et Arg-1) sont augmentés après 24h et 48h d'exposition à la nicotine dans les macrophages alvéolaires murins (Wongtrakool *et al.*, 2012).

### 3) Voie de signalisation du récepteur $\alpha 7$

Le récepteur nicotinique  $\alpha 7$  est un canal ionique dont l'activation conduit, à une augmentation des concentrations en  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire. Cependant, la stimulation de ce récepteur par la nicotine et l'acétylcholine n'induit pas d'augmentation du flux ionique dans les cellules non neuronales comme les leucocytes humains (Villiger *et al.*, 2002). Dans les monocytes et les macrophages, l'action anti-inflammatoire des récepteurs nicotiniques  $\alpha 7$  semble principalement médiée par deux voies de signalisations intracellulaires, NF- $\kappa$ B et Jak/STAT.

L'activation du récepteur nicotinique  $\alpha 7$  entraîne l'inhibition du facteur de transcription NF- $\kappa$ B dans les macrophages (Wang *et al.*, 2004; de Jonge *et al.*, 2007). En condition de non stimulation, ce facteur de transcription est retenu dans le cytoplasme par une protéine inhibitrice « I $\kappa$ B ». Lors d'une stimulation par une endotoxine telle que le LPS, il y a dégradation de I $\kappa$ B par phosphorylation et ubiquitination, ce qui permet à NF- $\kappa$ B d'être libéré et transloqué vers le noyau pour initier l'expression de ses gènes cibles (Takeda *et al.*, 2004). La stimulation des récepteurs nicotiniques  $\alpha 7$  dans les monocytes humains inhibe la dégradation d'I $\kappa$ B par le protéasome ce qui conduit au maintien de NF- $\kappa$ B dans le cytoplasme et l'absence de transcription des gènes de l'inflammation (Yoshikawa *et al.*, 2006).

L'autre voie de signalisation responsable des effets anti-inflammatoires des récepteurs nicotiniques  $\alpha 7$  dans les cellules non neuronale est la voie Jak2/STAT3. L'activation du récepteur  $\alpha 7$  conduit au recrutement et à la phosphorylation de Jak2 qui induit successivement l'activation du facteur de transcription STAT3. Ce facteur de transcription STAT3 semble jouer un rôle important dans l'effet anti-inflammatoire de la nicotine. Dans les macrophages

péritonéaux, l'inhibition de la production du TNF- $\alpha$  par la nicotine est dépendante de la phosphorylation de STAT3 (de Jonge *et al.*, 2005).

Par ailleurs dans les monocytes humains, l'activité anti-inflammatoire de la nicotine pourrait aussi passer par l'inhibition de l'expression du TLR4 *via* la diminution de l'expression de son co-récepteur le CD14 (Hamano *et al.*, 2006).

D'autres voies de signalisation sont également modulées par les agonistes nicotiques. Dans un modèle de monocytes humains, la nicotine augmente l'expression de la COX-2 et la production de PGE<sub>2</sub> (Takahashi *et al.*, 2006). L'activation de la PKA serait responsable de l'effet inhibiteur de la nicotine sur la production des cytokines pro-inflammatoires (IL-12 et IL-18) induite par le LPS dans les monocytes humains (Takahashi *et al.*, 2006).

Récemment, une étude a mis en évidence que l'effet anti-inflammatoire induit par la stimulation des récepteurs nicotiques  $\alpha 7$  pouvait impliquer le microARN-124. Ce microARN-124 est un transcrit non codant de 18 à 25 nucléotides qui inhibe l'ARNm. Dans une lignée cellulaire de macrophages murins (RAW264.7), les travaux de Sun *et al.*, 2013 montrent que la nicotine induit une augmentation du microARN-124, responsable de l'inhibition de la production des cytokines pro-inflammatoires *via* l'inhibition de l'activité du facteur de transcription STAT3 (Sun *et al.*, 2013).

#### **4) Les récepteurs nicotiques $\alpha 7$ : une cible thérapeutique**

Depuis la découverte du rôle important des récepteurs nicotiques  $\alpha 7$  dans les processus de régulation de l'inflammation ainsi que dans certaines pathologies neurologiques, ce dernier est devenu une cible d'intérêt thérapeutique. Compte tenu des effets secondaires et toxiques de la nicotine, plusieurs dizaines de molécules ciblant le récepteur nicotique  $\alpha 7$  ont été développées au cours de la dernière décennie. Certaines de ces molécules représentent des pistes prometteuses. Parmi ces composés, le mieux caractérisé est le GTS-21, un agoniste partiel des récepteurs nicotiques  $\alpha 7$ . Le GTS-21 ou DMXB-A est une molécule trouvée dans le ver nemertine du Pacifique (*Paranemertes peregrina*). Des études *in vivo* ont montré un rôle bénéfique du GTS-21 dans la schizophrénie (Olincy *et al.*, 2007) et la maladie de Parkinson (Suzuki *et al.*, 2013), et une étude clinique de phase 2 est actuellement en cours



pour évaluer les effets bénéfiques du GTS-21 contre placebo dans la schizophrénie (NCT01400477). Outre ces effets sur les maladies neurologiques, le GTS-21 apparaît également bénéfique pour limiter les processus inflammatoires. Des études *in vitro* rapportent que le GTS-21 diminue la production des cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$ ) dans les monocytes humains (Rosas-Ballina *et al.*, 2009), les macrophages de souris (Pavlov *et al.*, 2007) et diminue la production d'IL-10 dans les cellules mononucléaires humaines du sang périphérique (PBMC pour *Peripheral Blood Mononuclear Cell*) (Kox *et al.*, 2009). *In vivo*, le GTS-21 a montré un effet anti-inflammatoire chez des souris atteintes d'une pancréatite (van Westerloo *et al.*, 2006) ou de lésions pulmonaires induites par ventilation mécanique (Kox *et al.*, 2011b). Un effet bénéfique du GTS-21 sur le taux de survie de souris soumises à des brûlures expérimentales a également été reporté (Khan *et al.*, 2012). Une étude clinique portant sur l'évaluation du GTS-21 dans la réponse immunitaire chez l'Homme a montré une corrélation inverse entre les concentrations plasmatiques de GTS-21 et celles de TNF- $\alpha$ , IL-6 et IL-1ra (Kox *et al.*, 2011a).

## V. Introduction aux travaux de thèse

Dans la littérature, de nombreux travaux ont étudié la polarisation des macrophages dans différents modèles cellulaires de macrophages à la fois chez l'Homme mais également chez la souris. Les résultats émanant de ces différentes études montrent qu'en terme de spécificité des marqueurs de la polarisation M1 ou M2, il existe des différences inter-espèces ainsi qu'entre les macrophages dérivés de monocytes et les macrophages tissulaires (Stout *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2007; Martinez *et al.*, 2013; Shay *et al.*, 2013; Gundra *et al.*, 2014). La polarisation des macrophages est impliquée dans certaines pathologies infectieuses et pulmonaires (Benoit *et al.*, 2008; Boorsma *et al.*, 2013). La connaissance des marqueurs de polarisation des macrophages pulmonaires est donc nécessaire pour mieux comprendre leur rôle dans ces pathologies mais n'a jamais fait l'objet de travaux de recherche. Ainsi, l'objectif premier de notre étude sera d'étudier la polarisation des macrophages pulmonaires humains en phénotype M1 induit par le LPS et M2 induit par les cytokines Th2 (IL-4 et IL-13) en se focalisant sur l'étude des marqueurs membranaires et la production de médiateurs de l'inflammation comme les cytokines, chimiokines et les métabolites lipidiques. En deuxième partie de ces travaux de recherche nous nous intéresserons à deux voies de régulation de la polarisation des macrophages pulmonaires humains. La voie de la 15-lipoxygénase, une

enzyme du métabolisme lipidique et la voie du système cholinergique non neuronal *via* les récepteurs nicotiniques de type  $\alpha 7$ , dans les macrophages pulmonaires humains polarisés M1 et M2.

## **Matériels et méthodes**

## **I. Isolement et culture des macrophages pulmonaires humains**

### **A. Isolement des macrophages pulmonaires**

Les tissus pulmonaires humains ont été obtenus sur des parties macroscopiquement saines de pièces opératoires de poumons de patients opérés pour cancer broncho-pulmonaire (résection ou lobectomie) à l'hôpital Foch (Suresnes, France) ou à la clinique du Val d'or (Saint Cloud, France). Le Comité de Protection des Personnes Île de France VIII a émis un avis favorable pour l'obtention de ces pièces chirurgicales.

Les macrophages pulmonaires ont été isolés selon une technique préalablement décrite (Jeyaseelan *et al.*, 2005; Buenestado *et al.*, 2012). Ils ont été obtenus à partir d'un fragment de parenchyme pulmonaire prélevé à distance de la tumeur, lavés dans du milieu RPMI additionné d'antibiotiques puis finement découpés et lavés de nouveau. Le liquide de lavage obtenu est ensuite centrifugé (2000 rpm, 10 min, 25°C) et le culot remis en suspension dans du milieu supplémenté, en présence de 10% de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté. La suspension cellulaire a été ajustée à  $10^6$  cellules.mL<sup>-1</sup> et 1 mL de cette suspension a été déposé dans chaque puits d'une plaque 24 puits et mis à incuber 1h et demie à 37°C en atmosphère humidifiée contenant 5% de CO<sub>2</sub>. Durant cette étape, les macrophages adhèrent sur le support plastique. Au bout du temps imparti, les cellules non adhérentes ont été éliminées par trois rinçages successifs au RPMI. Après vérification au microscope inversé de l'absence de globules rouges, 1 mL de milieu RPMI supplémenté contenant 10% de sérum de veau fœtal a été ajouté dans chaque puits, et la plaque a été maintenue à l'étuve pendant une nuit. Il a été démontré par une technique de microscopie optique après coloration par la méthode de May-Grünwald-Giemsa ainsi que par immunohistochimie avec marquage par un anticorps anti-CD68 (anticorps monoclonal humain anti-CD68, Dako, Trappes, France), que la population de cellules adhérentes isolée par cette technique était constituée à plus de 95% par des macrophages. La viabilité cellulaire observée après marquage des cellules mortes au bleu trypan était supérieure à 90%.

### **B. Culture des macrophages pulmonaires**

Au lendemain de l'isolement des macrophages pulmonaires, ces derniers ont été lavés avec du RPMI supplémenté en antibiotiques et glutamines, puis 1 mL de milieu RPMI complet (1% de SVF) a été déposé dans chaque puits. Les macrophages ont ensuite été traités

avec différentes molécules pharmacologiques et de nouveau laissés 1h à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Au terme de cette heure, le LPS (10 ng.mL<sup>-1</sup>), l'IL-4 (10 ng.mL<sup>-1</sup>) ou l'IL-13 (50 ng.mL<sup>-1</sup>), ont été ajoutés au milieu de culture afin de favoriser la différenciation des macrophages vers un profil M1 (LPS) ou M2 (IL-4/IL-13). Après 24h d'incubation, les macrophages ont dans un premier temps été comptés au microscope inversé afin de déterminer la concentration cellulaire. Dans un second temps, les surnageants ont été collectés et centrifugés à 2000 rpm pendant 5 min à 4°C et répartis en deux aliquots de 500 µL puis congelés à -20°C. Les macrophages adhérents au fond du puits ont été lysés et récupérés dans 1 mL de TRIzol<sup>®</sup> pour les expériences de biologie moléculaire.

### **1) Traitement pharmacologique des macrophages pulmonaires humains**

#### ***Article 1: Phenotypic characterization of polarized human lung macrophages***

Les macrophages pulmonaires ont été incubés avec du LPS (10 ng.mL<sup>-1</sup>), de l'IL-4 (10 ng.mL<sup>-1</sup>) et de l'IL-13 (50 ng.mL<sup>-1</sup>) pendant 24h afin d'étudier le profil transcriptomique et protéomique des macrophages pulmonaires polarisés en phénotype M1 (LPS) et en phénotype M2 (IL-4/IL-13).

#### ***Article 2: 15-Lipoxygenases regulate the production of chemokines in human lung macrophages***

Les macrophages pulmonaires ont été traités par un inhibiteur spécifique de la 15-lipoxygénase, le PD 146176 (1-10 µM), pendant 1h. Les macrophages ont ensuite été stimulés avec le LPS (10 ng.mL<sup>-1</sup>), l'IL-4 (10 ng.mL<sup>-1</sup>) ou l'IL-13 (50 ng.mL<sup>-1</sup>) pendant 24h pour induire d'une part le phénotype M1 (LPS) et d'autre part le phénotype M2 (IL-4/IL-13) des macrophages pulmonaires humains. Les macrophages pulmonaires ont également été pré-incubés pendant 30 min avec un inhibiteur non spécifique des cyclooxygénases, l'indométhacine (1 µM) ainsi qu'un inhibiteur de la protéine activatrice de la 5-lipoxygénase, le MK 886 (1 µM) avant d'être traités avec le PD 146176 pendant 1h puis stimulés par le LPS (10 ng.mL<sup>-1</sup>), l'IL-4 (10 ng.mL<sup>-1</sup>) et l'IL-13 (50 ng.mL<sup>-1</sup>) pendant 24h.

Un second inhibiteur non spécifique de la 12- et 15-lipoxygénase, le NDGA (1-10 µM) a également été évalué sur les macrophages pulmonaires humains selon le même protocole décrit ci-dessus. Les résultats obtenus avec cet inhibiteur sont présentés dans la partie résultats complémentaires de cet article.

### ***Article 3: The role of $\alpha 7$ nicotinic receptor in the polarization of human lung macrophages***

Les macrophages pulmonaires ont été traités par des agonistes partiels du récepteur nicotinique  $\alpha 7$  : l'EVP-6124 à la concentration de 1  $\mu\text{M}$  et 20  $\mu\text{M}$ , le GTS-21 ainsi que son métabolite actif, le 4OH-GTS-21, à des concentrations croissantes de 10 à 100  $\mu\text{M}$  pendant 1h. Les macrophages pulmonaires ont ensuite été stimulés pendant 24h avec du LPS (10  $\text{ng.mL}^{-1}$ ) et de l'IL-13 (50  $\text{ng.mL}^{-1}$ ). Les macrophages ont également été exposés à des antagonistes nicotiques spécifiques ( $\alpha$ -bungarotoxine) et non spécifiques (methyllycaconitine) du récepteur nicotinique  $\alpha 7$  pendant 30 min avant d'être traités par les agonistes partiels  $\alpha 7$  pendant 1h puis stimulés pendant 24h avec le LPS (10  $\text{ng.mL}^{-1}$ ) et l'IL-13 (50  $\text{ng.mL}^{-1}$ ). D'autres agonistes du récepteur nicotinique  $\alpha 7$  (**Tableau ci-après**) ont également été évalués sur les macrophages pulmonaires humains selon la même méthode décrite ci-dessus. Ces résultats seront présentés dans la partie résultats complémentaires de l'article 3.

<b>Molécule</b>	<b>Mécanisme d'action</b>	<b>EC<sub>50</sub> (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>modèle</b>	<b>Références</b>
<i>Acétylcholine</i>	Agoniste endogène des nAChRs	36	Récepteurs nicotiques $\alpha 7$ humains clonés sur ovocytes de xénope	(Papke <i>et al.</i> , 2005)
<i>AR-R17779 hydrochloride</i>	Agoniste $\alpha 7$	6	Récepteurs nicotiques $\alpha 7$ humains clonés sur ovocytes de xénope	(Papke <i>et al.</i> , 2005)
<i>EVP-6124</i>	Agoniste partiel $\alpha 7$	3	Récepteurs nicotiques $\alpha 7$ humains clonés sur ovocytes de xénope	(Prickaerts <i>et al.</i> , 2012)
<i>GTS-21</i>	Agonistes partiels $\alpha 7$	109	Récepteurs nicotiques $\alpha 7$ humains clonés sur ovocytes de xénope	(Meyer <i>et al.</i> , 1998)
<i>4OH-GTS-21</i>	Agonistes partiels $\alpha 7$	4.7	Récepteurs nicotiques $\alpha 7$ humains clonés sur ovocytes de xénope	(Papke <i>et al.</i> , 2005)
<i>Nicotine</i>	Agoniste mixte $\alpha 7$ et $\alpha 4$	26	Récepteurs nicotiques $\alpha 7$ humains clonés sur ovocytes de xénope	(Briggs <i>et al.</i> , 1998)
<i>PNU 282987</i>	Agoniste $\alpha 7$	0.128	Culture neurones hippocampiques de rat	(Toyohara <i>et al.</i> , 2010)
<i>SEN 12333</i>	Agoniste $\alpha 7$	1.6	Lignée cellulaire somatolactotrope GH4C1 exprimant le récepteur nicotinique $\alpha 7$ de rat	(Roncarati <i>et al.</i> , 2009)
<i>TC 1698 dihydrochloride</i>	Agoniste $\alpha 7$	0.16	Récepteurs nicotiques $\alpha 7$ humains clonés sur ovocytes de xénope	(Papke <i>et al.</i> , 2005)
<i>Varénicline</i>	Agoniste $\alpha 7$	18	Récepteurs nicotiques $\alpha 7$ et $\alpha 4/\beta 2$ de rats clonés sur ovocytes de xénope	(Mihalak <i>et al.</i> , 2006)
	Agoniste partiel $\alpha 4/\beta 2$	2.3		

#### ***Propriétés des agonistes du récepteur nicotinique $\alpha 7$ utilisés dans notre étude***

## 2) Transfection des macrophages par la technique de siARNs

Au lendemain de l'isolement des macrophages pulmonaires humains, ces derniers ont été lavés avec du RPMI supplémenté en glutamine. Les macrophages ont été comptés, décollés et repris dans du RPMI avec glutamine. Les cellules ont été réparties afin que chaque condition de transfection contienne  $1.10^6$  de macrophages pulmonaires. Les macrophages ont été centrifugés à 2000 rpm pendant 10 min à 25°C. Après centrifugation, les macrophages sont repris très doucement dans 100  $\mu$ L de la solution *Nucleofector*<sup>®</sup> II contenu dans le kit de transfection pour macrophages humains (*Amaxa*<sup>®</sup> *Human Macrophage Nucleofector*<sup>®</sup> *Kit*, Lonza, France) supplémentée de 300 nM de siARN spécifique du gène cible ou d'un contrôle négatif appelé siARN « *scrambled* ». Cette suspension a ensuite été déposée dans une cuvette à transfection permettant de transférer les macrophages par l'*Amaxa*<sup>®</sup> *Nucleofector*<sup>®</sup> II. Le programme de transfection appliqué aux macrophages a été défini par l'*Amaxa*<sup>®</sup> *Human Macrophage Nucleofector*<sup>®</sup> *Kit*. Un fois la transfection réalisée, les macrophages ont été repris dans 500  $\mu$ L de RPMI complet à 10% de SVF et déposés dans une plaque 12 puits préalablement préparée avec 1,5 mL de milieu complet RPMI avec 10% de SVF.

## II. Biologie moléculaire

### A. Transcriptomique

#### 1) Extraction des ARNs

La lyse des macrophages pulmonaires a été réalisée avec 1 mL de TRIzol<sup>®</sup>, qui permet d'effectuer une lyse cellulaire tout en maintenant et en protégeant l'intégrité des ARNs. 200  $\mu$ L de chloroforme ont été ajoutés, puis une centrifugation de 15 min à 12000 rpm a permis l'obtention de deux phases : une phase aqueuse supérieure contenant les ARNs, et une phase organique inférieure contenant les protéines et les ADNs. La phase aqueuse a été récupérée, puis les ARNs ont été précipités par ajout de 500  $\mu$ L d'isopropanol (100%) et récupérés par centrifugation à 12000 rpm pendant 10 min à 4°C. Les culots ont ensuite été lavés avec 1 mL d'éthanol à 70°, séchés et remis en solution dans 20  $\mu$ L d'eau, puis conservés à -80°C. La quantité d'ARNs extraite a été estimée par spectrophotométrie à 260 nm (Spectrophotomètre Biowave DNA; Biochrom, Cambridge, Angleterre).

## 2) Vérification de la qualité des ARNs

La vérification de la qualité des ARNs a été réalisée par un système d'électrophorèse capillaire couplé à un réseau microfluidique (Experion, BioRad). Ce système permet l'analyse qualitative et quantitative de microéchantillons d'acide nucléique en prenant pour marqueur de qualité l'ARN ribosomal 18S et 28S. Une matrice de séparation a été déposée au sein de la puce électrophorétique ainsi que les échantillons à analyser, le tampon de charge et les marqueurs de poids moléculaire. La puce a ensuite été placée dans la station d'électrophorèse et les ARNs ribosomaux de chaque échantillon ont migrés selon leurs poids moléculaires. L'interprétation de la qualité des ARNs a été basée sur l'intensité maximale de fluorescence, le rapport ARN 28S/ ARN 18S et le *RNA Quality Indicator* (RQI) (compris entre 0 et 10).

## 3) Transcription inverse

La formation d'ADN complémentaire (ADNc) à partir des ARNs extraits a été effectuée par transcription inverse (RT pour *Reverse Transcriptase*) à l'aide du kit SuperScript® III *First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR* (Life Technologies, Saint Aubin, France). 1 µg d'ARN, 10 µL de tampon réactionnel et 2 µL d'enzyme ont été mélangés et le volume ajusté à 20 µL avec de l'eau. La réaction a été effectuée dans les conditions suivantes : 10 min à 25°C, 30 min à 50°C puis 5 min à 85°C. 1 µL de RNase H a enfin été ajouté dans chaque échantillon, qui a été maintenu à 37°C durant 20 min afin d'éliminer les ARNs restants à la fin de la réaction. Les échantillons ont été dilués à la concentration de 8 ng.µL<sup>-1</sup> puis conservés à -80°C.

## 4) Réaction en chaîne par polymérase

L'expression des transcrits des gènes a été évaluée par méthode TaqMan. La chimie TaqMan permet d'obtenir un signal fluorescent spécifique du gène étudié grâce à l'utilisation d'une sonde fluorescente spécifique. Pour l'étude de gène unique par réaction en chaîne de la polymérase (*Polymerase Chain Reaction ou PCR*), les échantillons ont été déposés dans un puits avec les amorces et la sonde TaqMan spécifique du gène à amplifier. Le volume réactionnel a été fixé à 20 µL dans chaque puits [4 µL d'ADNc à 5 ng/µL, 1 µL d'amorce avec sonde TaqMan, 10 µL de TaqMan Gene Expression Master Mix (Life Technologies) et 5 µL d'eau]. L'amplification a été réalisée dans un thermocycleur StepOnePlus et dans les



conditions suivantes : 50°C pendant 2 min puis 95°C pendant 10 min, suivi de 40 cycles à deux temps : 95°C pendant 15 s puis 60°C pendant 1 min. Afin de normaliser les données quantitatives, le gène de référence HPRT (hypoxanthine phosphoribosyltransférase) a été utilisé.

L'expression simultanée de plusieurs gènes a également été réalisée par PCR en utilisant des plaques 96 puits préparées à façon. Chaque échantillon a été déposé dans une plaque de 96 puits contenant les amorces et les sondes TaqMan spécifiques de chaque gène à amplifier. Le volume réactionnel a été fixé à 10 µL dans chaque puits (5 µL d'ADNc et 5 µL de TaqMan Gene Expression Master Mix, Life Technologies). L'amplification a été réalisée à partir de 20 ng d'ADNc, dans un thermocycleur StepOnePlus et dans les mêmes conditions que pour l'étude de l'expression de gène unique. Pour les plaques 96 puits, quatre gènes de référence ont été utilisés : 18S (petite sous-unité du ribosome), GAPDH (Glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase), HPRT et GUSB (β-glucuronidase), inclus par le fabricant dans chaque plaque.

Aucune étape de dégradation de l'ADN génomique n'a été nécessaire car l'ensemble des amorces TaqMan sélectionnées sont entre deux exons.

## 5) Puces génomiques à ADN

Après vérification de la qualité des ARNs, une étape de transcription inverse a été réalisée afin de synthétiser de l'ADNc, selon le protocole décrit dans le kit *GeneChip® WT Plus Reagent* (Affymetrix). A partir de l'ADNc, une étape de transcription *in vitro* a été réalisée avec la T7 ARN polymérase. Après purification et quantification de l'ARNc un second cycle de synthèse d'ADNc a été réalisé afin d'incorporer les deoxyuridine Triphosphate (dUTP) pour permettre la fragmentation ultérieure. L'ARN restant a ensuite été éliminé par la RNase H et le brin d'ADNc a été purifié, quantifié puis fragmenté. Les fragments ont ensuite été hybridés sur la puce *GeneChip® Human transcriptome Array 2.0* (Affymetrix) à 45°C pendant 17h. Les puces ont été lavées sur une station fluidique (FS450) et scannées. Les résultats ont été analysés par le logiciel *Expression Console™* (Affymetrix) et *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA).

### III. Dosage immunologique des cytokines/chimiokines

La détection et la quantification des cytokines dans le surnageant de culture des macrophages pulmonaires humains ont été évaluées par la méthode ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) sandwich (kits DuoSet, R&D Systems Europe, Lille, France). Cette technique est basée sur la reconnaissance d'une cytokine à doser par un anticorps de capture, fixé au fond des 96 puits d'une plaque ELISA pendant une nuit à température ambiante. Après incubation, les échantillons à doser et les standards ont été dilués puis déposés dans les puits de la plaque ELISA. Un anticorps de détection biotinylé a été déposé puis mis en présence de streptavidine conjuguée à la peroxydase de raifort (ou HRP pour *Horseradish peroxidase*). La révélation des complexes formés a été réalisée par le substrat H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/tetrabenzylbenzidine, et permet la quantification des cytokines recherchées par colorimétrie. La densité optique a été mesurée à 450 nm grâce au lecteur de plaque 96 puits (MRX II, Dynex Technologies, Saint Cloud, France). Les calculs de conversion de la densité optique en concentration ont été effectués avec le logiciel GraphPad Prism<sup>®</sup> en construisant une courbe de régression à partir des concentrations connues pour les standards. Les limites de détection pour les différentes cytokines sont : 2 pg.mL<sup>-1</sup> pour IL-1 $\beta$ , 4 pg.mL<sup>-1</sup> pour CCL3, CCL13, CCL18 et CCL22, 8 pg.mL<sup>-1</sup> pour TNF- $\alpha$ , CCL2, CCL4, CCL5 et CCL17 et 16 pg.mL<sup>-1</sup> pour CXCL1, CXCL8, CXCL10 et CCL24.

### IV. Dosage des métabolites lipidiques

#### A. PGE<sub>2</sub> et 15(S)-HETE

Le dosage de la PGE<sub>2</sub> et 15(S)-HETE a été effectué par méthode EIA (*Enzyme immunoassay*) (Cayman Chemical Company, USA). Chaque dosage repose sur la compétition entre chaque métabolite lipidique libre présent dans les surnageants de macrophages (PGE<sub>2</sub> et 15(S)-HETE) et ces mêmes métabolites conjugués à un traceur [acétylcholinestérase ou (AChE)] pour interagir avec un nombre limité d'anticorps de capture anti-PGE<sub>2</sub> ou anti-15(S)-HETE. Les échantillons, le standard et les anticorps spécifiques de chaque métabolite ainsi que les métabolites couplés au traceur AChE ont été déposés dans une plaque 96 puits et incubés pendant 1h à température ambiante pour le dosage de la PGE<sub>2</sub> et pendant 18h à 4°C pour celui de la 15(S)-HETE. La révélation des complexes formés est réalisée par l'ajout du substrat de l'AChE [acétylthiocholine et l'acide 5,5-dithio-*bis*-(2-nitrobenzoïque)]. Cette

réaction enzymatique induit une coloration dont l'intensité a été déterminée par spectrométrie. La densité optique est lue à 405-420 nm et est inversement proportionnelle à la quantité de PGE<sub>2</sub> et de 15(S)-HETE présente dans les échantillons. La limite de détection est de 36 pg.mL<sup>-1</sup> pour la PGE<sub>2</sub> et 170 pg.mL<sup>-1</sup> pour la 15(S)-HETE.

## **B. 13(S)-HODE**

Le dosage de la 13(S)-HODE dans les macrophages pulmonaires humains a été effectué à l'aide d'un kit ELISA par compétition (Enzo<sup>®</sup> Life Sciences, Suisse). Le principe de dosage de la 13(S)-HODE repose sur l'utilisation d'un anticorps anti-13(S)-HODE fixé au fond d'une plaque de 96 puits. Cet anticorps reconnaît, de manière compétitive, la 13(S)-HODE présent dans nos échantillons ainsi que la 13(S)-HODE liée de manière covalente à la phosphatase alcaline et dont on connaît la concentration. Après une incubation de 2h à température ambiante sous agitation, la révélation des complexes a été réalisée par l'addition de substrat de la phosphatase alcaline, le *para*-nitrophénylphosphate (pNpp) qui permet de quantifier la 13(S)-HODE par colorimétrie. La densité optique a été lue à 405 nm et est inversement proportionnelle à la quantité de 13(S)-HODE présente dans nos échantillons. La limite de détection est fixée à 1,6 ng.mL<sup>-1</sup>.

## **V. Phagocytose des macrophages pulmonaires humains**

L'activité de phagocytose des macrophages pulmonaires humains a été évaluée à l'aide de bioparticules. Dans notre étude, nous avons utilisé des bioparticules d'*E coli* couplées à l'Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 (Life technologie, USA). Au lendemain de l'isolation des macrophages pulmonaires, ces derniers ont été exposés au LPS, à l'IL-4 ou à l'IL-13 pendant 24h. Au terme de cette incubation, les macrophages ont été lavés deux fois avec du tampon PBS à 2% de SVF puis décollés et re-suspendus dans 500 µL de ce même tampons pour être ensuite incubés avec 5µl de bioparticules à 5.10<sup>6</sup> particules.ml<sup>-1</sup> pendant 30 min à l'obscurité à 37°C, 5%CO<sub>2</sub>. L'analyse de l'activité phagocytaire des macrophages a été réalisée par quantification de la fluorescence par cytométrie en flux FC500 (Beckman Coulter).

## VI. Phénotypage des macrophages polarisés

Afin de caractériser les marqueurs membranaires de la polarisation des macrophages pulmonaires, un phénotypage par cytométrie de flux a été réalisé sur des macrophages pulmonaires polarisés en phénotype M1 par du LPS ( $10 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) et M2 par de l'IL-4 ( $10 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) pendant 24h. Les cellules ont été récupérées, lavées avec du tampon de marquage (PBS 1X avec 2% de SVF) et perméabilisées si nécessaire. Les macrophages ont été ensuite incubés avec les différents anticorps marqués et dirigés contre CD23, CD38 et CD206 pendant 30 min à l'obscurité et  $4^{\circ}\text{C}$ . Le marquage des cellules a été analysé par cytométrie en flux FC500 (Beckman Coulter). Un contrôle isotypique a été réalisé pour chaque anticorps. L'expression membranaire du récepteur nicotinique  $\alpha 7$  a été également évaluée par cytométrie en flux selon le protocole détaillé ci-dessus. Les macrophages ont été incubés avec un antagoniste du récepteur  $\alpha 7$ , l' $\alpha$ -bungarotoxine couplé à un fluorochrome, la fluoresceine isothiocyanate (FITC), ( $\alpha$ -bungarotoxine-FITC).

## VII. Expression des résultats et statistiques

Les valeurs dans les figures sont exprimées en moyenne arithmétique  $\pm$  l'erreur standard à la moyenne (ou S.E.M pour *standard error mean*) du nombre ( $n$ ) d'expériences.

### A. Biologie moléculaire

Les données quantitatives obtenues à partir des expériences de RT-PCR en temps réel sont exprimées en quantification relative selon la méthode de Livak et al., 2001. Cette quantification relative peut s'exprimer en expression relative ( $2^{-(\Delta\text{Ct})}$ ), en facteur d'augmentation ( $2^{-\Delta(\Delta\text{Ct})}$ ) ou en facteur de diminution ( $-1/2^{-\Delta(\Delta\text{Ct})}$ ) ou  $\Delta\text{Ct}$  est la différence entre le Ct (*Cycle threshold*) du gène cible et le Ct du gène de référence.

### B. Dosage immunologique et lipidique

Les résultats des dosages de cytokines et des médiateurs lipidiques ( $\text{PGE}_2$  et 15(S)-HETE) sont exprimés en  $\text{pg}/10^6$  cellules et ceux de la 13(S)-HODE en  $\text{ng}/10^6$  cellules.

### **C. Test de phagocytose et phénotypage des macrophages**

Les résultats de l'activité phagocytaire et du phénotypage des macrophages pulmonaires ont été analysés par cytométrie en flux et sont exprimés en moyenne d'intensité de fluorescence (ou MFI pour *Mean Fluorescence Intensity*).

### **D. Analyse statistique des résultats**

L'évaluation statistique des données a été conduite à l'aide du logiciel GraphPad Prism<sup>®</sup> en utilisant une analyse de la variance (ANOVA pour *analysis of variance*) suivie d'un post-test approprié selon les conditions expérimentales (tests t de Student, test de Bonferroni ou test de Dunnett). Une différence a été considérée comme statistiquement significative quand la probabilité  $p$  était inférieure à 0,05 ( $p < 0,05$ ).

# **Travaux de recherche**

## *Article n°1*

# **Phenotypic characterization of polarized human lung macrophages**

**Short title:** polarization of human lung macrophages

Charlotte ABRIAL,<sup>1,2\*</sup> Stanislas GRASSIN-DELYLE,<sup>1,2\*</sup> Sonia HOLIFANJANIAINA,<sup>1,2</sup>  
Hélène SALVATOR,<sup>1,2</sup> Tatiana VICTONI,<sup>1</sup> Marion BROLLO,<sup>1</sup> Amparo BUENESTADO,<sup>1</sup>  
Sébastien JACQUES,<sup>3</sup> Florent DUMONT,<sup>3</sup> Emmanuel NALINE,<sup>1,2</sup> Philippe DEVILLIER.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Pharmacologie Respiratoire UPRES EA220, Hôpital Foch, Suresnes, France

<sup>2</sup>Université Versailles Saint-Quentin en Yvelines, UFR Sciences de la Santé Simone Veil,  
Montigny le Bretonneux, France

<sup>3</sup>INSERM U1016 Plate-forme génomique institut Cochin, Paris, France

\*both authors contributed equally to this work

## **Introduction**

De nombreuses études se sont intéressées à l'identification des marqueurs de la polarisation des macrophages, principalement dans des modèles cellulaires de macrophages murins, de monocytes et de macrophages dérivés de monocytes sanguins humains (Stein *et al.*, 1992; Mills *et al.*, 2000; Martinez *et al.*, 2006; Jaguin *et al.*, 2013; Martinez *et al.*, 2013; Gundra *et al.*, 2014; Italiani *et al.*, 2014; Xue *et al.*, 2014). Cependant des divergences inter-espèces entre les marqueurs de la polarisation ont été rapportées entre les macrophages murins et les macrophages dérivés de monocytes humains (Martinez *et al.*, 2013). L'expression de certaines enzymes telles que la iNOS et l'Arg1 est décrite comme marqueur de la polarisation M1 et M2 respectivement dans les macrophages murins mais n'est pas modulée dans les macrophages dérivés de monocytes humains (Murray *et al.*, 2011b; Shay *et al.*, 2013). Une hétérogénéité phénotypique est également observable entre les macrophages tissulaires chez l'Homme (Stout *et al.*, 2004). De plus, des études rapportent que certains marqueurs de la polarisation identifiés dans les macrophages dérivés de monocytes humains sont différents de ceux mis en évidence dans les macrophages tissulaires humains (Stout *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2007; Gundra *et al.*, 2014). Concernant les macrophages pulmonaires humains aucune étude à ce jour n'a étudié leur polarisation en phénotype M1 et M2.

L'objectif de cette étude a été de caractériser d'un point de vue transcriptomique et protéomique les marqueurs associés à la polarisation des macrophages pulmonaires humains. Deux phénotypes de la polarisation ont été étudiés. Le phénotype M1 obtenu par stimulation avec du LPS, un agoniste des TLR4 dont l'expression a été mise en évidence dans les macrophages pulmonaires humains (Données non présentées). Puis le phénotype M2a obtenu par exposition à deux cytokines de type Th2 (IL-4 et IL-13), ligands des récepteurs de type I et de type II, dont l'expression a aussi été mise en évidence dans notre modèle cellulaire (Données non présentées).

La caractérisation transcriptomique a été réalisée en deux temps. Un temps d'analyse transcriptomique large (screening par puce microarray) et un temps d'analyse transcriptomique (par RT-qPCR) sur les principaux marqueurs de la polarisation M1/M2 (marqueurs membranaires, cytokines, chimiokines, cyclooxygénases et lipoxygénases). L'analyse protéomique s'est concentrée sur les cytokines et les chimiokines.



## Phenotypic characterization of polarized human lung macrophages

**Short title:** polarization of human lung macrophages

Charlotte ABRIAL,<sup>1,2\*</sup> Stanislas GRASSIN-DELYLE,<sup>1,2\*</sup> Sonia HOLIFANJANIAINA,<sup>1,2</sup>  
Hélène SALVATOR,<sup>1,2</sup> Tatiana VICTONI,<sup>1</sup> Marion BROLLO,<sup>1</sup> Amparo BUENESTADO,<sup>1</sup>  
Sébastien JACQUES,<sup>3</sup> Florent DUMONT,<sup>3</sup> Emmanuel NALINE,<sup>1,2</sup> Philippe DEVILLIER.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Pharmacologie Respiratoire UPRES EA220, Hôpital Foch, Suresnes, France

<sup>2</sup>Université Versailles Saint-Quentin en Yvelines, UFR Sciences de la Santé Simone Veil,  
Montigny le Bretonneux, France

<sup>3</sup>INSERM U1016 Plate-forme génomique institut Cochin, Paris, France

\*both authors contributed equally to this work

CA: [abrial.charlotte@gmail.com](mailto:abrial.charlotte@gmail.com),

SGD: [s.grassindelyle@hopital-foch.org](mailto:s.grassindelyle@hopital-foch.org),

SH: [s.holifanjaniaina@hopital-foch.org](mailto:s.holifanjaniaina@hopital-foch.org),

HS: [hsalvator@yahoo.fr](mailto:hsalvator@yahoo.fr),

TV: [tatianavictoni@hotmail.com](mailto:tatianavictoni@hotmail.com),

MB: [marion.brollo@yahoo.fr](mailto:marion.brollo@yahoo.fr),

AB: [amparo.buenestado@gmail.com](mailto:amparo.buenestado@gmail.com),

SJ: [sebastien.jacques@inserm.fr](mailto:sebastien.jacques@inserm.fr),

FD: [florent.dumont@inserm.fr](mailto:florent.dumont@inserm.fr),

EN: [upresea220@orange.fr](mailto:upresea220@orange.fr),

PD: [p.devillier@hopital-foch.org](mailto:p.devillier@hopital-foch.org)

**Corresponding author:** Stanislas GRASSIN-DELYLE, Laboratoire de Pharmacologie  
Respiratoire UPRES EA220, Hôpital Foch, 11 rue Guillaume Lenoir, 92150 Suresnes, France.

Tel: +33.1.46.25.73.93, Fax: +33.1.46.25.24.22. E-mail: [s.grassindelyle@hopital-foch.org](mailto:s.grassindelyle@hopital-foch.org)

## Abstract

**Background:** Lung macrophages are the only macrophages of the body exposed to air, protecting the organism from allergens and inhaled pathogens. As described for other macrophages subtypes, they are likely to undergo a phenotypic differentiation to the proinflammatory M1 or the immunomodulatory M2 phenotype when exposed to Th1- or Th2-stimuli. The purpose of the study was to characterize the phenotypic differentiation of human lung macrophages exposed to lipopolysaccharide (LPS) or interleukin (IL) -4 or -13.

**Results:** Using a whole-transcriptome approach, we identified a set of 4067 genes involved in the polarization of human lung macrophages. These genes are linked to biological functions such as cellular movement, inflammatory response, immune cell trafficking and three cellular components (cytokines, lipid metabolism and membrane markers) were among the most affected. RT-qPCR experiments confirmed the microarray data for a set of 84 genes and protein expression was assessed with immunoassays. Following LPS exposure, lung macrophages undergo a M1 polarization defined by an increase in the production of cytokines (such as TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL1, CXCL8, CXCL10...), in prostaglandin E<sub>2</sub> signalling and in the expression of membrane proteins such as CD38 and CD197. On the other hand; M2 macrophages obtained after stimulation with IL-4/IL-13 display a signature including increased expression of some other cytokines (CCL13, CCL17, CCL22, CCL26...), 15-lipoxygenases or of the mannose receptor CD206.

**Conclusions:** Our findings demonstrate that human lung macrophages may undergo a M1 or M2 polarization after exposure to LPS or IL-4/IL-13. We identified three cellular components involved in this process, including a panel of genes and markers that may discriminate between M1 and M2 cells. Our results extend the scope of findings in murine tissues or in human monocyte-derived macrophages and may allow a better understanding of the role of macrophage polarization in the pathophysiology of human lung diseases.

**Keywords:** Human lung macrophages, polarization, whole transcriptome, cytokine, membrane marker, lipid metabolism.

## Background

Macrophages are key regulators of the innate and adaptive immune responses. They can be found in most of the major organs, but lung macrophages are unique in the way that they are the only macrophages of the body exposed to air, protecting the organism from allergens and inhaled pathogens. Lung macrophages also play a role in tissue homeostasis and are involved in the pathophysiology of pulmonary inflammatory diseases such as asthma or chronic obstructive pulmonary disease (COPD) (Barnes, 2008a; Holtzman, 2012; Yang *et al.*, 2012).

Macrophages can be committed to a continuum of functional phenotypes depending on various environmental cues. The two extremes of the spectrum are the well-established polarized phenotypes often referred to as M1 macrophages (or classically activated macrophages) and M2 macrophages (or alternatively activated macrophages) mirroring the Th1/Th2 dichotomy. M1 macrophages are induced by Th1-cytokines such as interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) or by exposure to microbial products such as bacterial lipopolysaccharide (LPS) and are involved in mounting effective responses against microorganisms and tumour cells. M2 macrophages are induced by the canonical Th2 cytokines interleukin (IL)-4 and IL-13 and are considered as wound healing macrophages, as illustrated by their role in regulating lung inflammation and tissue remodelling in mouse models of asthma (Byers *et al.*, 2011; Dasgupta *et al.*, 2012a). Other populations of M2 macrophages obtained with IL-10, immune complexes or glucocorticoids were also described (Mantovani *et al.*, 2004). The switch from the M1 to the M2 phenotype enables macrophages to actively participate in the onset of the inflammatory reaction and then the healing and repair processes (Stout *et al.*, 2004).

M1 and M2 polarized macrophages markedly differ in terms of expression of cytokines, membrane receptors, enzymatic content or transcription factors (Mantovani *et al.*, 2004; Gordon *et al.*, 2005; Martinez *et al.*, 2006; Martinez *et al.*, 2013; Gundra *et al.*, 2014; Italiani *et al.*, 2014; Xue *et al.*, 2014). Hence, TNF- $\alpha$ , CCL3 or CXCL8 are considered as M1 cytokines whereas CCL18, CCL22 or CCL26 are described of the M2-type; CD80 has greater expression in M1 macrophages while CD206 is upregulated in M2 macrophages and cyclooxygenases expression is induced in an M1 environment, in contrast to 15-lipoxygenases, more specific of M2 cells (Mantovani *et al.*, 2004; Martinez *et al.*, 2006). Such phenotypic traits have been essentially described in the THP-1 cell-line and in murine macrophages but interspecies differences must be taken into account against direct mouse-to-human translation of polarization markers, as illustrated with iNOS or arginases, markers of

the murine M2 polarization which are at least controversial for human cells (Kohro *et al.*, 2004; Martinez *et al.*, 2006; Daigneault *et al.*, 2010; Redente *et al.*, 2010; Murray *et al.*, 2011a; Shay *et al.*, 2013). In humans, blood monocytes or monocyte-derived macrophages have been used for the benchmarking of biomarkers of macrophage polarization (Martinez *et al.*, 2006; Ambarus *et al.*, 2012; Beyer *et al.*, 2012; Staples *et al.*, 2012a; Jaguin *et al.*, 2013; Italiani *et al.*, 2014; Vogel *et al.*, 2014; Xue *et al.*, 2014) but previous works identified a large number of genes differentially expressed between blood monocytes or monocyte-derived macrophages and alveolar macrophages, highlighting the differences between these cell-types, including for genes coding for cytokines, membrane markers or enzymes (Li *et al.*, 2007). Hence, few studies have tackled the characterization of human tissue macrophage polarization in the lung compartment. Available reports indicate that pneumonia may promote a M1 phenotype while macrophages from asthma, COPD or fibrotic patients rather exhibit markers of an M2 polarization (Kim *et al.*, 2008; Shaykhiev *et al.*, 2009; Gutierrez *et al.*, 2010; Pechkovsky *et al.*, 2010; Melgert *et al.*, 2011). Cigarette smoke also induces a reprogramming toward a M1-deactivated, partially M2-polarized phenotype (Shaykhiev *et al.*, 2009). However, the plasticity of these lung macrophages remains poorly known and whether exposure to M1- or M2-polarizing agents may alter the macrophage phenotype has to be further investigated.

The aim of the present study was to characterize the phenotypes of human lung macrophages polarized *in vitro* to M1 and M2 cells using a whole transcriptome approach, which was deepened by subsequent analysis at the transcript and protein level of three cellular components identified as involved in the polarization of lung macrophages.

## **Methods**

### **Isolation and culture of human lung macrophages**

Lung tissues were obtained from 59 patients (age:  $63 \pm 1$  years, sex ratio (M:F): 39:20 FEV<sub>1</sub>/FVC ratio:  $0.73 \pm 0.02$ , smokers/ex-smokers 32/20, pack years:  $41 \pm 2$  and 7 non-smokers) undergoing surgical resection for lung carcinoma. The use of resected lung tissues for research purposes was approved by the Regional Ethics Committee for Biomedical Research (CPP Île de France VIII, Boulogne-Billancourt, France).

Macrophages were isolated from finely minced peripheral tissues (distant from the tumor) by adherence as described previously (Buenestado *et al.*, 2010). Briefly, the collected fluid from

several washings of the minced peripheral lung tissues was centrifuged (2000 rpm, 10 min) and the cell pellet was resuspended in supplemented RPMI with 10% heat-inactivated foetal calf serum (FCS), 2 mM L-glutamine and antibiotics. Re-suspended viable cells were then distributed at  $10^6$  cells per mL in either a 12-well plate for transcriptional assays or 24-well plate for cytokine measurements. Following incubation for at least 1.5 hour at 37°C (5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere) non-adherent cells were removed by gentle washings and the remaining cells were maintained at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> overnight. The adherent population of cells (about  $198 \pm 7 \times 10^3$  cells and  $433 \pm 40 \times 10^3$  cells per well for 24-well and 12-well plates respectively) were > 95% pure macrophages. Cell viability exceeded 95% as assessed by Trypan blue dye exclusion.

### ***In vitro* polarization of human lung macrophages**

The culture plates with adherent lung macrophages were washed with warm medium and 1 mL of fresh medium supplemented with 1% FCS was added per well. LPS ( $10 \text{ ng.mL}^{-1}$ ), IL-4 ( $10 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) and IL-13 ( $50 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) were then added when necessary to the wells to polarize the cells towards the M1 or M2 phenotype. The LPS concentration ( $10 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) was selected according to previous concentration-response curves. The concentrations of IL-4 ( $10 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) or IL-13 ( $50 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) were chosen according to previous reports with similar models (Joshi *et al.*, 2010; Pechkovsky *et al.*, 2010; Staples *et al.*, 2012a). After 24h of stimulation, culture supernatants were harvested, centrifuged and frozen for subsequent cytokine measurements and adherent cells were harvested and frozen in TRIzol<sup>®</sup> reagent (Life Technologies, Saint Aubin, France) for RNA extraction and analysis.

### **Microarray-based transcriptional profiling and real-time PCR**

A genome-wide transcriptome analysis with subsequent validation of selected target genes with RT-qPCR was performed on lung macrophages obtained from 3 distinct patients and polarized *in vitro* to M1 or M2 macrophages. Briefly, RNA was extracted with TRIzol<sup>®</sup> and the quality was evaluated on a Experion microfluidics electrophoresis system using RNA Standard sensitivity kits (BioRad, Marnes-la-Coquette, France) as previously described (Grassin-Delyle *et al.*, 2014). The genome-wide transcriptional profiling was performed with GeneChip<sup>®</sup> Human Transcriptome Array 2.0 (Affymetrix, Wooburn Green, UK) according to manufacturer's instructions. Validation of some target genes identified in this large scale

analysis was performed with RT-qPCR using customized TaqMan<sup>®</sup> arrays (Life Technologies) as previously reported (Grassin-Delyle *et al.*, 2014). Genes were chosen on the basis of the profiling obtained by microarray experiments and/or on an extensive overview of the literature regarding polarization of human or murine monocytes/macrophages, with a special interest for genes coding for cytokines; mediators, receptors and enzymes of the eicosanoid pathway and membrane markers.

### **Cytokines measurements**

The concentrations of M1-type or M2-type cytokines were measured in culture supernatants with ELISA (Duoset Development System, R&D Systems Europe, Lille, France). The supernatants were diluted with RPMI as appropriate, and the optical density was determined at 450 nm with an MRX II microplate reader from Dynex Technologies (Saint-Cloud, France). The detection limits of these assays were 4 pg.mL<sup>-1</sup> for IL-1 $\beta$ , 8 pg.mL<sup>-1</sup> for CCL3, CCL13, CCL17 and CCL22, 16 pg.mL<sup>-1</sup> for TNF- $\alpha$  and CCL2, CCL4 and CCL5 and 32 pg.mL<sup>-1</sup> for CCL24, CXCL1, CXCL8 and CXCL10. Cytokine concentrations are expressed as pg per 10<sup>6</sup> lung macrophages.

### **Determination of prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)**

PGE<sub>2</sub> levels in lung macrophage culture supernatants were determined using a commercially available EIA kit according to the manufacturer's instructions (Cayman Chemical Europe, Tallinn, Estonia). The detection limit was 36 pg.mL<sup>-1</sup>. PGE<sub>2</sub> concentrations are expressed as pg per 10<sup>6</sup> cells.

### **Flow cytometry**

Lung macrophages were recovered from culture plates by scrapping and incubated for 10 minutes in PBS with 10% human serum to avoid nonspecific binding of monoclonal antibodies. Cells were stained in PBS with 2% FCS for 30 minutes at 4°C using the following monoclonal mouse antibodies: PE-CF594-CD38; PE-CD206 and PE-Cy7-CD23 or their respective isotype controls (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). Data were acquired on a FC500 flow cytometer (Beckman Coulter, Villepinte, France) and analyzed using FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR, USA).

## Materials

RPMI 1640 medium and PBS were from Eurobio Biotechnology (Les Ulis, France). Penicillin-streptomycin, L-glutamine, FCS, Trypan blue dye and LPS (from *Escherichia coli* serotype 0111:B4, batch 029K4022) were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Recombinant human IL-4 and IL-13 were from R&D Systems (Lille, France). Stock solutions were prepared in RPMI at  $0.5 \text{ ng.mL}^{-1}$  for LPS and  $50 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$  for IL-4 and IL-13. All subsequent dilutions were prepared daily in RPMI supplemented with 1% FCS. None of the compounds used in this study altered the viability of the macrophages. All other chemicals were of analytical grade and were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). All cell culture plastics were from CML (Nemours, France).

## Data Expression and Statistical Analysis

Gene expression differences were assessed by means of Student's *t* test, with false discovery rate correction for multiple testing. Genes with a false discovery rate  $\leq 0.05$  and a fold change  $\geq 1.2$  were considered to be differentially expressed.

Data of cytokine or PGE<sub>2</sub> production and flow cytometry are expressed as means  $\pm$  S.E.M. of experiments performed with LM obtained from *n* patients. Statistical analyses used one-way repeated measures ANOVA followed by Bonferroni's post-tests or Student's *t* test as appropriate. Significance was defined as  $p < 0.05$ . Statistical analyses were performed using GraphPad Prism<sup>®</sup> v5.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

## Results

### Whole transcriptome profiling of polarized human lung macrophages

Microarray transcriptome profiling was used to identify the genes that could be involved in the M1 and M2 polarization of lung macrophages. Comparison of macrophages cultured with LPS or medium only (control) revealed 3552 genes that were differentially expressed, 1610 up-regulated and 1942 down-regulated. Maximal fold-change was 178 for up-regulated genes and 15 for those down-regulated. Similarly, cells incubated with IL-4 exhibited differential expression of 591 genes, 281 up-regulated and 310 down-regulated. Maximal fold-change was 13.7 for up-regulated genes and 2.9 for those down-regulated. Only 76 genes were commonly modulated by both LPS and IL-4. Using a gene-ontology-based strategy, we

analyzed these sets of genes to identify the processes and functions involved in macrophage polarization. Cellular movement, inflammatory response, immune cell trafficking or lipid metabolism were among the biological functions the most affected during the polarization (Figure 1). According to the number of the genes differentially expressed or to the intensity of the change of expression, three cellular components appeared to be major players of this phenotypic differentiation that may discriminate M1 and M2 cells: cytokines, lipid metabolism and membrane proteins, in agreement with previous findings. Heatmap visualization of these three relevant components is shown in Figure 2 and further investigations were individually driven for each of those to confirm the observations of microarray data. For these new experiments, the effects of IL-4 and IL-13 on macrophage polarization were compared. IL-4 and IL-13 are indeed interleukins that shares overlapping biological functions, including in asthma pathogenesis and both signal via a similar network of receptors. IL-4 mediates its effects through either the type I IL-4 receptor or the type II IL-4R. In contrast, IL-13 signals solely through the type II IL-4R, which may drive to differences in the biological response of macrophages to IL-13 compared to IL-4 (Munitz *et al.*, 2008; Bhattacharjee *et al.*, 2013).

### **Cytokinome**

Numerous studies in related models (murine macrophages or human monocyte-derived macrophages) previously pointed out that cytokines may be differentially expressed by M1- or M2-macrophages, in line with our microarray data. Heatmap visualization indeed reveals a profile of M1-type cytokines distinct of that obtained in M2-cells (Figure 2A). We performed an extensive analysis of 55 genes with a TaqMan reference method to confirm the data observed with microarray. In line with this microarray experiments, RT-qPCR demonstrated an up-regulation of TNF- $\alpha$ , CC chemokines (CCL1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 13, 17, 19, 20, 22, 23, 24 and 26), CXC chemokines (CXCL1, 2, 3, 5, 6, 8, 10, 11, 13 and 16), interleukins (IL-1 $\alpha$ , 1 $\beta$ , 5, 6, 9, 10, 12b, 13, 18 and 23A), colony stimulating factor (CSF) (2 and 3) and interferon- $\gamma$  transcripts up to 9390-fold in LPS-stimulated cells and an increase of CCL4, 11, 13, 16, 17, 22, 23, 24, 25 and 26 and of IL-10 and -13 up to 1748-fold in IL-4-treated macrophages (Table 1). Several genes down-regulated with IL-4 in microarray experiments were also found down-regulated with RT-qPCR (CCL2 and 20, CXCL1, 2, 5 and 8), demonstrating good agreement between both techniques. The profile of regulation of cytokine gene expression



was almost identical for macrophages stimulated with IL-4 or IL-13, with a coefficient of correlation ( $r^2$ ) of 0.997 between results obtained for both (Table 1).

Then, we investigated how these changes at the transcript level translated at the protein level with performing quantification by immunoassays of 13 cytokines in culture cell supernatants (Table 2). Results were also in full agreement with RT-qPCR data, since LPS induced the release of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CCL2, 3, 4, 5, 22 and 24, CXCL1, 8 and 10. IL-4 and IL-13 both augmented the release of CCL4, 13, 17 and 22 as well as inhibited the production of CXCL1, as observed with transcripts.

### **Lipid metabolism**

The ability of macrophages to produce lipid mediators such as prostaglandins and leukotrienes is well-described. These cells possess the enzymatic machinery needed for the synthesis of lipid products from substrates such as arachidonic acid, originating from the cell membranes. Hence, the participation of the eicosanoid pathway in the differentiation of monocytes and activation of monocyte-derived macrophages has been previously described (Martinez *et al.*, 2006). Again, our microarray analysis revealed a pattern of genes coding for different enzymes or receptors of the eicosanoid pathway differentially expressed following incubation of macrophages with LPS or IL-4, even if changes in expression were less marked than for cytokines (Figure 2B). We performed a full RT-qPCR cartography of the genes coding for the proteins of the lipoxygenase and cyclooxygenase pathways, which was also in line with microarray data (Table 3). The genes the most affected for the cyclooxygenase pathway were those coding for cyclooxygenase-2 (*PTGS2*), prostaglandin E synthase (*PTGES*) and prostaglandin I<sub>2</sub> (prostacyclin) receptor (*PTGIR*), which were 494-, 2074- and 60-fold induced by LPS, respectively. In contrast, IL-4 and IL-13 had only modest impact on genes of this pathway, with mainly a downregulation of *PTGES* and *PTGIR* by 5- and 29-fold respectively. For the lipoxygenase pathway, the only up-regulated gene was the one coding for 15-lipoxygenase (*ALOX15*) which was 155- and 46-fold increased with IL-4 and IL-13 respectively, whereas genes coding for leukotriene C<sub>4</sub> synthase (*LTC4S*), leukotriene A<sub>4</sub> hydrolase (*LTA4H*) and cysteinyl leukotriene receptor 1 (*CYSLTR1*) were 5- to 10-fold down-regulated by LPS.

As mentioned above, the two genes the most affected were *PTGS2* and *PGES*, which code for the enzymes that catalyse the transformation of arachidonic acid into prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) in cells. Macrophages are a major source of PGE<sub>2</sub> during inflammation and PGE<sub>2</sub> is known to

regulate cytokine synthesis (Humes *et al.*, 1977; Williams *et al.*, 1997). We thus explored the production of PGE<sub>2</sub> by human lung macrophages cultured with LPS or IL-4. As shown in Figure 3, LPS induced a dramatic increase in the production of PGE<sub>2</sub> by human lung macrophages whereas IL-4 was devoid of effect, confirming the results of transcripts expression.

### Membrane markers

The plasticity of macrophages also involves the modulation of the expression of the membrane proteins, major players in the interactions between the cells and their environment. Previous reports demonstrated the alteration of the expression of phenotypic markers or G-protein coupled receptors during the differentiation of monocyte-derived cells (Martinez *et al.*, 2006; Ambarus *et al.*, 2012). Our microarray analysis also supports these data, as shown by the signatures obtained for LPS- or IL-4-cultured macrophages in Figure 2C. We selected 4 of these surface markers (CD38, CD197, CD200R1 and CD206) for analysis with the reference RT-qPCR method and the results confirmed the microarray's data (Table 4). Both CD38 and CD197 expression was up-regulated by 47-fold with LPS only whereas the expression of CD200R1 and CD206 was induced by IL-4/IL-13 (7- to 52-fold). Again, the results observed for IL-13 were highly similar to those with IL-4.

Experiments were carried out at the protein level with flow cytometric detection of CD38 and CD206 in LPS or IL-4 cultured cells. As observed in the transcriptome analysis, the expression of CD38 was enhanced in LPS-treated but not IL-4-treated macrophages, while the expression of CD206 was increased with IL-4 but not LPS (Figure 4). By contrast, membrane expression of CD23, another membrane marker reported in M2 macrophages (Beyer *et al.*, 2012), was unaffected either by LPS or IL-4.

### Discussion

This study addressed the phenotypic differentiation of human lung macrophages exposed to Th1-type (LPS) or Th2-type (IL-4/IL-13) stimuli. Previous works reported large-scale transcriptome analysis of murine tissue macrophages or human monocyte-derived macrophages, but the well-admitted species- or tissue-specificities make difficult the extrapolation of the data to the polarization of primary human lung macrophages (Murray *et al.*, 2011a; Shay *et al.*, 2013; Okabe *et al.*, 2014; Xue *et al.*, 2014). In particular, mouse

macrophages do not express CCL26 or 15-lipoxygenase, two of the most upregulated genes in our M2 macrophages (Huang *et al.*, 1999; Pope *et al.*, 2005). Monocytes or monocyte-derived macrophages are also used extensively as models to study macrophage biology, but consistent evidences in mice and humans show fundamentally different molecular signatures between monocytes, monocyte-derived macrophages and tissue or alveolar macrophages, including for genes coding for cytokines, membrane markers, enzymes and transcription factors themselves involved in the regulation of the expression of cytokine genes (Li *et al.*, 2007; Gundra *et al.*, 2014; Vogel *et al.*, 2014). For example, LTA4H was not upregulated in our M2 macrophages, whereas it was increased in M2 monocyte-derived macrophages (Martinez *et al.*, 2006). Furthermore, lung macrophages are more likely exposed to exogenous Th1- or Th2-type stimuli than macrophages from other organs since these are the only macrophages of the body directly exposed to ambient air-borne allergens and pathogens. Thus, knowledge on human lung macrophages phenotypic plasticity and reactivity to such stimuli is of particular relevance for a better understanding of the pathophysiology of allergic, inflammatory or infectious lung diseases.

Our results first show that human primary lung macrophages may undergo a phenotypic differentiation when exposed to Th1- or Th2-type stimuli. This differentiation is accompanied by a substantial regulation of the cell transcriptome, with a total of more than 4000 genes differentially expressed in one or the other condition. There are about as much genes up-regulated as genes down-regulated for each condition (LPS or IL-4), but there are less than 80 common genes regulated by both LPS and IL-4. The main biological functions affected during the polarization are those involved in major cell functions such as metabolism, movement, growth, proliferation or survival but also in the immune response or in intercellular signaling. These data reflect the plasticity of macrophages as their adaptability and their capacity to acquire different phenotypes in regard to their.

Autocrine or paracrine signaling of macrophages can occur through their production of cytokines. We found that M1-polarized macrophages produce a significant number of cytokines, including chemokines, interleukins, interferons, colony stimulating factors or tumour necrosis factors. CCL2, through CCR2 receptor, and CCL3, 5, 8, through CCR1, 3 or 5 receptors, are chemotactic for monocytes, macrophages and T cells associated with strong microbicidal and tumoricidal activities. CXCL1, 5 and 8 are ligands of CXCR1 or CXCR2 receptors expressed at the surface of neutrophils, and are involved in the recruitment of these polynuclear cells (Mantovani *et al.*, 2004). On the other hand, the cytokines produced in

higher amounts in M2-cells essentially belong to the CC chemokine and interleukin families. CCL13, 17, 22 and 26, increased by IL-4/IL-13, stimulate CCR2, 3 and 4 receptors to recruit T cells, B cells, basophils or eosinophils (Mantovani *et al.*, 2004). CCL26 was highly up-regulated at the transcript level by IL-4/IL-13, while it is unaffected by IL-13 in monocyte-derived cells (Xue *et al.*, 2014) and not expressed in rodents (Pope *et al.*, 2005). However, we were unable to detect the protein of CCL26 both in the extra- or intracellular compartment after incubation times up to 48 hrs despite our attempts with kits from two distinct manufacturers (data not shown). Such observations might be related to a post-transcriptional mechanism involved in the regulation of cytokine production, as already described in similar models (Zhang *et al.*, 1997).

Most cytokines in Tables 2 and 3 were selectively induced by LPS or IL-4/IL-13 in our experimental conditions, with some exceptions. CCL4 was mostly increased by LPS but also weakly increased by IL-4/IL-13 (<1% of the increase by LPS). We also found differences with previous reports in related models. Hence, CCL13, 17, 18, 22 and 24 are often described as specific of the M2 phenotype (Mantovani *et al.*, 2004; Martinez *et al.*, 2006; Benoit *et al.*, 2008). However in our study, CCL18 transcripts were not regulated by LPS, IL-4 or IL-13. Similarly, CCL17 and CCL24 transcripts were affected at similar levels by the three stimuli. However, CCL17 protein production was only increased by IL-4/IL-13 and CCL24 protein production was affected by LPS only. CCL22 production was increase of 5 fold by IL-4/IL-13, but also 1.5-fold augmented by LPS. This may reflect of a lack of specificity of these markers.

Macrophages are also able to communicate with other cells by their production of lipid mediators such as eicosanoids derived from membrane arachidonic acid. We showed herein that the pathways involved in PGE<sub>2</sub> biosynthesis and signalling were overexpressed in cells treated with LPS, in agreement with previous findings (Hempel *et al.*, 1994; Martinez *et al.*, 2006). The expression of transcripts of EP<sub>2</sub> and EP<sub>4</sub> receptors, the major receptors in the signal transduction of PGE<sub>2</sub>, was also about 3-fold increased by LPS, likely enhancing the production of PGE<sub>2</sub>. PGE<sub>2</sub> possesses anti-inflammatory properties, including the downregulation of cytokine production in lung macrophages (Williams *et al.*, 1997; Buenestado *et al.*, 2012). PGE<sub>2</sub> potently suppresses Th1 effector mechanisms and allows to shift the pattern of immune cells response toward Th2, especially in the lungs (Kalinski, 2012). This prostaglandin may thus be an important mediator in the response of macrophages to pathogens, allowing deactivation of the M1 phenotype, thus facilitating the switch toward

the M2 phenotype (Rodriguez *et al.*, 2014). Moreover, the expression of prostaglandin E synthase (PGES), the terminal enzyme for the biosynthesis of PGE<sub>2</sub> which isomerizes COX-derived PGH<sub>2</sub> specifically to PGE<sub>2</sub> was reduced in IL-4/IL-13-treated macrophages. This result comes in support of the data with LPS and of the observed deficient production of PGE<sub>2</sub> in patients with asthma (Pierzchalska *et al.*, 2003). In IL-4/IL-13-treated macrophages, 15-lipoxygenase was the major up-regulated component of the eicosanoid pathway, in line with previous findings in monocytes (Chaitidis *et al.*, 2005) or alveolar macrophages (Levy *et al.*, 1993) and supporting data of an increased activity of this enzyme in asthma patients (Chu *et al.*, 2002; Sachs-Olsen *et al.*, 2010; Lundstrom *et al.*, 2012). 15-HETE, the product of 15-lipoxygenase, is involved in the modulation of the inflammatory response in the macrophages and in the lung (Levy *et al.*, 1993; Huang *et al.*, 1999), which is line with a polarization of macrophages towards the M2 phenotype. IL-4-induced 15-lipoxygenase were also shown to modulate the expression of the scavenger receptor CD36, an M2 membrane markers involved in oxLDL uptake in mouse macrophages (Huang *et al.*, 1999).

In this regard, membrane receptors and proteins were the third category of molecules explored in the present study. Macrophages interact with their environment through the membrane proteins and receptors. CD206 is a mannose receptor involved in the endocytosis of pathogens-associated carbohydrate structures which was identified in the first report of an alternative activation state of mouse macrophages and which expression and activity were increased by IL-4 (Stein *et al.*, 1992). This mannose receptor is essentially involved in the recognition of fungal pathogens, associated with a Th2 response (Gazi *et al.*, 2011). Accordingly, we found an increased expression of CD206 transcripts and protein in IL-4/IL-13-stimulated human lung macrophages. By contrast, macrophages exposed to LPS exhibited an increase in the membrane expression of CD38 (adenosine-5'-diphosphate-ribosyl cyclase 1). CD38 cleaves NAD<sup>+</sup> and NADP<sup>+</sup>, generating ADP ribose involved in the migration of leukocytes to inflammatory sites (Partida-Sanchez *et al.*, 2007; Malavasi *et al.*, 2008). CD38 expression was found increased by interferon- $\gamma$  but not LPS in human monocytes, where it plays a role in the adhesion process (Musso *et al.*, 2001). A proinflammatory role of CD38 in the production of cytokines has also been demonstrated in other models (Choe *et al.*, 2011). Similarly, macrophages M2 membrane markers such as CD206 were associated with asthma or COPD (Hattori *et al.*, 2009; Melgert *et al.*, 2011; Kaku *et al.*, 2014) whereas CD38 is an important effector in the response of macrophages to infection (Lischke *et al.*, 2013).

However, contrasting with observations in monocyte-derived cells, we did not observe any modulation in the membrane expression of CD23 after IL-4 stimulation (Beyer *et al.*, 2012).

Consistent with allergic, inflammatory or infectious lung disease pathophysiology, the markers identified in the present study were previously found involved or associated with pulmonary affections. The CC and CXC chemokines characteristic of M1 macrophages play an important role in the initiation and control of inflammation such as observed in lung microbial infections (Strieter *et al.*, 2003; Benoit *et al.*, 2008). The M2 cytokines increased by the Th2 stimuli IL-4/IL-13 rather reflect the M2 environment such as in the lungs of patients with asthma (Garcia *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2008; Perros *et al.*, 2009; Melgert *et al.*, 2011; Staples *et al.*, 2012b; Provost *et al.*, 2013), COPD (Kim *et al.*, 2008; Shaykhiev *et al.*, 2009) or fibrosis (Pechkovsky *et al.*, 2010) patients. Several studies indicate also a role of 15-LOX's mediators in the physiopathology of asthma and COPD (Profita *et al.*, 2000; Chu *et al.*, 2002; Sachs-Olsen *et al.*, 2010; Lundstrom *et al.*, 2012; Mabalirajan *et al.*, 2013b). Incubation of THP-1-derived macrophages with sputum from patients with acute exacerbations of COPD was shown to induce M2-like phenotype (Gutierrez *et al.*, 2010), while a M1 phenotype, was observed with sputum from pneumonia patients (Gutierrez *et al.*, 2010).

IL-4 and IL-13 are the two prototypic stimuli inducing M2 macrophage polarization. IL-4 mediates its effect through the type I IL-4R (IL-4R $\alpha$  and IL-2R $\gamma$ ) or the type II IL-4R (IL-4R $\alpha$  and IL-13R $\alpha$ 1), while IL-13 exerts its effect via the type II IL-4R only (Munitz *et al.*, 2008; Bhattacharjee *et al.*, 2013). In our study, no difference has been found between IL-4 and IL-13 on the expression of M2 markers, as illustrated by the high correlation between fold changes observed for both interleukins in cytokine RT-qPCR data. Previous findings in mouse alveolar macrophages identified also IL-33 as an enhancer of the M2 macrophage polarization (Kurowska-Stolarska *et al.*, 2009). However, IL-33 was devoid of any effect on the polarization of human lung macrophages in the present study (data not shown).

We used RT-qPCR to confirm the microarray data. Quantitative differences between results of microarray and RT-qPCR experiments were expected since i) the technologies are not the same, RT-qPCR is the reference method for quantitative data which involves the amplification of the target sequence while microarrays use signal amplification and ii) the analysis level is the whole gene for microarrays whereas TaqMan probes only amplify a sequence located on 1 or 2 exons. Nevertheless, results were highly comparable between the two methods.

Our study has strengths and limitations. The strengths are i) the use of primary human lung macrophages providing a relevant model for the study of macrophages plasticity in the human lung compartment; ii) the use of a whole transcriptome approach with confirmation for 87 selected target genes with RT-qPCR, iii) some results at the transcript level were confirmed at the protein/mediator level and iv) identification of cellular components that are relevant for lung diseases. The main limitation consists in the study of a single time-point, as in previous reports (Martinez *et al.*, 2006; Ambarus *et al.*, 2012; Beyer *et al.*, 2012; Jaguin *et al.*, 2013; Martinez *et al.*, 2013), preventing the observation of the kinetics of evolution and the stability in the expression of M1 and M2 markers.

## **Conclusions**

Taken as a whole, our data define a specific pattern of gene and protein expression in human lung macrophages polarized *in vitro* by LPS and IL-4/IL-13. This study extended previous findings in mouse macrophages and human monocyte-derived macrophages and identified three cellular components mainly involved in the polarization of human lung macrophages. These results allow a better understanding of macrophage polarization and their associated markers may be useful for studies on the pathophysiology of human lung diseases.

## **List of abbreviations**

COPD: Chronic obstructive pulmonary disease

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

FCS: Fetal calf serum

IL: Interleukin

IFN- $\gamma$ : Interferon- $\gamma$

LPS: Lipopolysaccharide

PBS: Phosphate-buffered saline

RT-qPCR: Reverse Transcriptase - quantitative polymerase chain reaction

FEV<sub>1</sub>: Force expiratory volume in 1 second

FVC: Forced vital capacity

**Competing interests**

The authors declare to have no competing interests.

**Authors' contributions**

CA carried out the macrophage cultures, molecular genetic studies, immunoassays and flow cytometry experiments, analyzed the data, performed the statistical analyses and drafted the manuscript, SGD conceived and designed the study, participated in flow cytometry experiments, analyzed the data and drafted the manuscript, SH participated in flow cytometry experiments, data analysis and revised the manuscript, HS was involved in macrophage cultures and immunoassays and revised the manuscript, TV participated in immunoassays and revised the manuscript, MB participated in macrophage cultures, immunoassays and RT-qPCR experiments and revised the manuscript, AB was involved in macrophage cultures and immunoassays and revised the manuscript, SJ participated in microarray experiments and revised the manuscript, FD performed the analysis of microarray data and revised the manuscript, EN obtained tissue samples, coordinated the study and revised the manuscript, PD conceived and designed the study and drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

**Acknowledgments**

The authors wish to acknowledge David Fraser (Biotech Communication, Dannery, France) for providing copy editing services.



## References

1. Barnes PJ: The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest* 2008, 118(11):3546-3556.
2. Holtzman MJ: Asthma as a chronic disease of the innate and adaptive immune systems responding to viruses and allergens. *J Clin Invest* 2012, 122(8):2741-2748.
3. Yang M, Kumar RK, Hansbro PM, Foster PS: Emerging roles of pulmonary macrophages in driving the development of severe asthma. *J Leukoc Biol* 2012, 91(4):557-569.
4. Byers DE, Holtzman MJ: Alternatively activated macrophages and airway disease. *Chest* 2011, 140(3):768-774.
5. Dasgupta P, Keegan AD: Contribution of alternatively activated macrophages to allergic lung inflammation: a tale of mice and men. *J Innate Immun* 2012, 4(5-6):478-488.
6. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M: The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 2004, 25(12):677-686.
7. Stout RD, Suttles J: Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J Leukoc Biol* 2004, 76(3):509-513.
8. Gordon S, Taylor PR: Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2005, 5(12):953-964.
9. Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A: Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J Immunol* 2006, 177(10):7303-7311.
10. Xue J, Schmidt SV, Sander J, Draffehn A, Krebs W, Quester I, De Nardo D, Gohel TD, Emde M, Schmidleithner L *et al*: Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. *Immunity* 2014, 40(2):274-288.
11. Italiani P, Mazza EM, Lucchesi D, Cifola I, Gemelli C, Grande A, Battaglia C, Bicciano S, Boraschi D: Transcriptomic profiling of the development of the inflammatory response in human monocytes in vitro. *PloS one* 2014, 9(2):e87680.
12. Martinez FO, Helming L, Milde R, Varin A, Melgert BN, Draijer C, Thomas B, Fabbri M, Crawshaw A, Ho LP *et al*: Genetic programs expressed in resting and IL-4 alternatively activated mouse and human macrophages: similarities and differences. *Blood* 2013, 121(9):e57-69.
13. Gundra UM, Girgis NM, Ruckerl D, Jenkins S, Ward LN, Kurtz ZD, Wiens KE, Tang MS, Basu-Roy U, Mansukhani A *et al*: Alternatively activated macrophages derived from monocytes and tissue macrophages are phenotypically and functionally distinct. *Blood* 2014, 123(20):e110-122.
14. Kohro T, Tanaka T, Murakami T, Wada Y, Aburatani H, Hamakubo T, Kodama T: A comparison of differences in the gene expression profiles of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiated THP-1 cells and human monocyte-derived macrophage. *J Atheroscler Thromb* 2004, 11(2):88-97.
15. Daigneault M, Preston JA, Marriott HM, Whyte MK, Dockrell DH: The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS One* 2010, 5(1):e8668.
16. Redente EF, Higgins DM, Dwyer-Nield LD, Orme IM, Gonzalez-Juarrero M, Malkinson AM: Differential polarization of alveolar macrophages and bone marrow-derived monocytes following chemically and pathogen-induced chronic lung inflammation. *J Leukoc Biol* 2010, 88(1):159-168.

17. Murray PJ, Wynn TA: Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. *J Leukoc Biol* 2011, 89(4):557-563.
18. Shay T, Jojic V, Zuk O, Rothamel K, Puyraimond-Zemmour D, Feng T, Wakamatsu E, Benoist C, Koller D, Regev A *et al*: Conservation and divergence in the transcriptional programs of the human and mouse immune systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, 110(8):2946-2951.
19. Ambarus CA, Krausz S, van Eijk M, Hamann J, Radstake TR, Reedquist KA, Tak PP, Baeten DL: Systematic validation of specific phenotypic markers for in vitro polarized human macrophages. *J Immunol Methods* 2012, 375(1-2):196-206.
20. Beyer M, Mallmann MR, Xue J, Staratschek-Jox A, Vorholt D, Krebs W, Sommer D, Sander J, Mertens C, Nino-Castro A *et al*: High-resolution transcriptome of human macrophages. *PLoS One* 2012, 7(9):e45466.
21. Staples KJ, Hinks TS, Ward JA, Gunn V, Smith C, Djukanovic R: Phenotypic characterization of lung macrophages in asthmatic patients: overexpression of CCL17. *J Allergy Clin Immunol* 2012, 130(6):1404-1412 e1407.
22. Jaguin M, Houlbert N, Fardel O, Lecreur V: Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. *Cell Immunol* 2013, 281(1):51-61.
23. Vogel DY, Glim JE, Stavenuiter AW, Breur M, Heijnen P, Amor S, Dijkstra CD, Beelen RH: Human macrophage polarization in vitro: Maturation and activation methods compared. *Immunobiology* 2014, 219(9):695-703.
24. Li J, Pritchard DK, Wang X, Park DR, Bumgarner RE, Schwartz SM, Liles WC: cDNA microarray analysis reveals fundamental differences in the expression profiles of primary human monocytes, monocyte-derived macrophages, and alveolar macrophages. *J Leukoc Biol* 2007, 81(1):328-335.
25. Gutierrez P, Closa D, Piner R, Bulbena O, Menendez R, Torres A: Macrophage activation in exacerbated COPD with and without community-acquired pneumonia. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 2010, 36(2):285-291.
26. Kim EY, Battaile JT, Patel AC, You Y, Agapov E, Grayson MH, Benoit LA, Byers DE, Alevy Y, Tucker J *et al*: Persistent activation of an innate immune response translates respiratory viral infection into chronic lung disease. *Nat Med* 2008, 14(6):633-640.
27. Shaykhiev R, Krause A, Salit J, Strulovici-Barel Y, Harvey BG, O'Connor TP, Crystal RG: Smoking-dependent reprogramming of alveolar macrophage polarization: implication for pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *J Immunol* 2009, 183(4):2867-2883.
28. Melgert BN, ten Hacken NH, Rutgers B, Timens W, Postma DS, Hylkema MN: More alternative activation of macrophages in lungs of asthmatic patients. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2011, 127(3):831-833.
29. Pechkovsky DV, Prasse A, Kollert F, Engel KM, Dentler J, Luttmann W, Friedrich K, Muller-Quernheim J, Zissel G: Alternatively activated alveolar macrophages in pulmonary fibrosis-mediator production and intracellular signal transduction. *Clinical immunology* 2010, 137(1):89-101.
30. Munitz A, Brandt EB, Mingler M, Finkelman FD, Rothenberg ME: Distinct roles for IL-13 and IL-4 via IL-13 receptor alpha1 and the type II IL-4 receptor in asthma pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, 105(20):7240-7245.
31. Bhattacharjee A, Shukla M, Yakubenko VP, Mulya A, Kundu S, Cathcart MK: IL-4 and IL-13 employ discrete signaling pathways for target gene expression in

- alternatively activated monocytes/macrophages. *Free radical biology & medicine* 2013, 54:1-16.
32. Humes JL, Bonney RJ, Pelus L, Dahlgren ME, Sadowski SJ, Kuehl FA, Jr., Davies P: Macrophages synthesis and release prostaglandins in response to inflammatory stimuli. *Nature* 1977, 269(5624):149-151.
  33. Williams JA, Shacter E: Regulation of macrophage cytokine production by prostaglandin E2. Distinct roles of cyclooxygenase-1 and -2. *J Biol Chem* 1997, 272(41):25693-25699.
  34. Okabe Y, Medzhitov R: Tissue-specific signals control reversible program of localization and functional polarization of macrophages. *Cell* 2014, 157(4):832-844.
  35. Huang JT, Welch JS, Ricote M, Binder CJ, Willson TM, Kelly C, Witztum JL, Funk CD, Conrad D, Glass CK: Interleukin-4-dependent production of PPAR-gamma ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. *Nature* 1999, 400(6742):378-382.
  36. Pope SM, Fulkerson PC, Blanchard C, Akei HS, Nikolaidis NM, Zimmermann N, Molkentin JD, Rothenberg ME: Identification of a cooperative mechanism involving interleukin-13 and eotaxin-2 in experimental allergic lung inflammation. *J Biol Chem* 2005, 280(14):13952-13961.
  37. Zhang M, Caragine T, Wang H, Cohen PS, Botchkina G, Soda K, Bianchi M, Ulrich P, Cerami A, Sherry B *et al*: Spermine inhibits proinflammatory cytokine synthesis in human mononuclear cells: a counterregulatory mechanism that restrains the immune response. *J Exp Med* 1997, 185(10):1759-1768.
  38. Benoit M, Desnues B, Mege JL: Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol* 2008, 181(6):3733-3739.
  39. Hempel SL, Monick MM, Hunninghake GW: Lipopolysaccharide induces prostaglandin H synthase-2 protein and mRNA in human alveolar macrophages and blood monocytes. *The Journal of clinical investigation* 1994, 93(1):391-396.
  40. Buenestado A, Grassin-Delyle S, Guitard F, Naline E, Faisy C, Israel-Biet D, Sage E, Bellamy JF, Tenor H, Devillier P: Roflumilast inhibits the release of chemokines and TNF-alpha from human lung macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *British journal of pharmacology* 2012, 165(6):1877-1890.
  41. Kalinski P: Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *J Immunol* 2012, 188(1):21-28.
  42. Rodriguez M, Domingo E, Municio C, Alvarez Y, Hugo E, Fernandez N, Sanchez Crespo M: Polarization of the innate immune response by prostaglandin E2: a puzzle of receptors and signals. *Mol Pharmacol* 2014, 85(1):187-197.
  43. Pierzchalska M, Szabo Z, Sanak M, Soja J, Szczeklik A: Deficient prostaglandin E2 production by bronchial fibroblasts of asthmatic patients, with special reference to aspirin-induced asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2003, 111(5):1041-1048.
  44. Chaitidis P, O'Donnell V, Kuban RJ, Bermudez-Fajardo A, Ungethuen U, Kuhn H: Gene expression alterations of human peripheral blood monocytes induced by medium-term treatment with the TH2-cytokines interleukin-4 and -13. *Cytokine* 2005, 30(6):366-377.
  45. Levy BD, Romano M, Chapman HA, Reilly JJ, Drazen J, Serhan CN: Human alveolar macrophages have 15-lipoxygenase and generate 15(S)-hydroxy-5,8,11-cis-13-trans-eicosatetraenoic acid and lipoxins. *The Journal of clinical investigation* 1993, 92(3):1572-1579.
  46. Chu HW, Balzar S, Westcott JY, Trudeau JB, Sun Y, Conrad DJ, Wenzel SE: Expression and activation of 15-lipoxygenase pathway in severe asthma: relationship to eosinophilic phenotype and collagen deposition. *Clinical and experimental allergy* :

- journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 2002, 32(11):1558-1565.
47. Lundstrom SL, Yang J, Kallberg HJ, Thunberg S, Gafvelin G, Haeggstrom JZ, Gronneberg R, Grunewald J, van Hage M, Hammock BD *et al*: Allergic asthmatics show divergent lipid mediator profiles from healthy controls both at baseline and following birch pollen provocation. *PLoS One* 2012, 7(3):e33780.
  48. Sachs-Olsen C, Sanak M, Lang AM, Gielicz A, Mowinckel P, Lodrup Carlsen KC, Carlsen KH, Szczeklik A: Eoxins: a new inflammatory pathway in childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2010, 126(4):859-867 e859.
  49. Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S: Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *The Journal of experimental medicine* 1992, 176(1):287-292.
  50. Gazi U, Rosas M, Singh S, Heinsbroek S, Haq I, Johnson S, Brown GD, Williams DL, Taylor PR, Martinez-Pomares L: Fungal recognition enhances mannose receptor shedding through dectin-1 engagement. *J Biol Chem* 2011, 286(10):7822-7829.
  51. Malavasi F, Deaglio S, Funaro A, Ferrero E, Horenstein AL, Ortolan E, Vaisitti T, Aydin S: Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology. *Physiological reviews* 2008, 88(3):841-886.
  52. Partida-Sanchez S, Gasser A, Fliegert R, Siebrands CC, Dammermann W, Shi G, Mousseau BJ, Sumoza-Toledo A, Bhagat H, Walseth TF *et al*: Chemotaxis of mouse bone marrow neutrophils and dendritic cells is controlled by adp-ribose, the major product generated by the CD38 enzyme reaction. *J Immunol* 2007, 179(11):7827-7839.
  53. Musso T, Deaglio S, Franco L, Calosso L, Badolato R, Garbarino G, Dianzani U, Malavasi F: CD38 expression and functional activities are up-regulated by IFN-gamma on human monocytes and monocytic cell lines. *J Leukoc Biol* 2001, 69(4):605-612.
  54. Choe CU, Lardong K, Gelderblom M, Ludewig P, Leyboldt F, Koch-Nolte F, Gerloff C, Magnus T: CD38 exacerbates focal cytokine production, postischemic inflammation and brain injury after focal cerebral ischemia. *PLoS One* 2011, 6(5):e19046.
  55. Kaku Y, Imaoka H, Morimatsu Y, Komohara Y, Ohnishi K, Oda H, Takenaka S, Matsuoka M, Kawayama T, Takeya M *et al*: Overexpression of CD163, CD204 and CD206 on alveolar macrophages in the lungs of patients with severe chronic obstructive pulmonary disease. *PloS one* 2014, 9(1):e87400.
  56. Hattori T, Konno S, Hizawa N, Isada A, Takahashi A, Shimizu K, Shimizu K, Gao P, Beaty TH, Barnes KC *et al*: Genetic variants in the mannose receptor gene (MRC1) are associated with asthma in two independent populations. *Immunogenetics* 2009, 61(11-12):731-738.
  57. Lischke T, Heesch K, Schumacher V, Schneider M, Haag F, Koch-Nolte F, Mittrucker HW: CD38 controls the innate immune response against *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 2013, 81(11):4091-4099.
  58. Strieter RM, Belperio JA, Keane MP: Host innate defenses in the lung: the role of cytokines. *Current opinion in infectious diseases* 2003, 16(3):193-198.
  59. Provost V, Larose MC, Langlois A, Rola-Pleszczynski M, Flamand N, Laviolette M: CCL26/eotaxin-3 is more effective to induce the migration of eosinophils of asthmatics than CCL11/eotaxin-1 and CCL24/eotaxin-2. *J Leukoc Biol* 2013, 94(2):213-222.

60. Staples KJ, Hinks TS, Ward JA, Gunn V, Smith C, Djukanovic R: Phenotypic characterization of lung macrophages in asthmatic patients: Overexpression of CCL17. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2012.
61. Perros F, Hoogsteden HC, Coyle AJ, Lambrecht BN, Hammad H: Blockade of CCR4 in a humanized model of asthma reveals a critical role for DC-derived CCL17 and CCL22 in attracting Th2 cells and inducing airway inflammation. *Allergy* 2009, 64(7):995-1002.
62. Garcia G, Godot V, Humbert M: New chemokine targets for asthma therapy. *Current allergy and asthma reports* 2005, 5(2):155-160.
63. Mabalirajan U, Rehman R, Ahmad T, Kumar S, Singh S, Leishangthem GD, Aich J, Kumar M, Khanna K, Singh VP *et al*: Linoleic acid metabolite drives severe asthma by causing airway epithelial injury. *Scientific reports* 2013, 3:1349.
64. Profita M, Sala A, Riccobono L, Paterno A, Mirabella A, Bonanno A, Guerrera D, Pace E, Bonsignore G, Bousquet J *et al*: 15-Lipoxygenase expression and 15(S)-hydroxyeicoisatetraenoic acid release and reincorporation in induced sputum of asthmatic subjects. *J Allergy Clin Immunol* 2000, 105(4):711-716.
65. Kurowska-Stolarska M, Stolarski B, Kewin P, Murphy G, Corrigan CJ, Ying S, Pitman N, Mirchandani A, Rana B, van Rooijen N *et al*: IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. *J Immunol* 2009, 183(10):6469-6477.
66. Buenestado A, Grassin Delyle S, Arnould I, Besnard F, Naline E, Blouquit-Laye S, Chapelier A, Bellamy JF, Devillier P: The role of adenosine receptors in regulating production of tumour necrosis factor-alpha and chemokines by human lung macrophages. *British journal of pharmacology* 2010, 159(6):1304-1311.
67. Joshi AD, Oak SR, Hartigan AJ, Finn WG, Kunkel SL, Duffy KE, Das A, Hogaboam CM: Interleukin-33 contributes to both M1 and M2 chemokine marker expression in human macrophages. *BMC Immunol* 2010, 11:52.
68. Grassin-Delyle S, Naline E, Buenestado A, Faisy C, Alvarez JC, Salvator H, Abrial C, Advenier C, Zemoura L, Devillier P: Cannabinoids inhibit cholinergic contraction in human airways through prejunctional CB1 receptors. *Br J Pharmacol* 2014, 171(11):2767-2777.

## Tables

**Table 1: Effect of LPS, IL-4 and IL-13 on cytokine transcripts expression in human lung macrophages**

Gene symbol	Microarray		RT-qPCR		
	Fold change		Fold change		
	LPS vs Control	IL-4 vs Control	LPS vs Control	IL-4 vs control	IL-13 vs control
CCL1	1.9	-	11.4	-	-
CCL2	6.2	-1.9	36.2	-3.4	-4.0
CCL3	10.9	-	40.6	-	-1.5
CCL4	32.5	1.8	108.8	2.0	1.4
CCL5	9.6	-	63.2	-1.7	-
CCL7	13	-1.2	70.2	-	-
CCL8	15	1.2	587.1	-	-
CCL11	-	-	-	7.7	-
CCL13	1.2	2.4	5.1	68.2	60.5
CCL16	-	-	-	2.0	-
CCL17	-	-	43.0	33.7	21.7
CCL18	-	-	-	-	-
CCL19	-	-	8.2	-18.4	-12.1
CCL20	30.9	-1.6	286.1	-3.9	-4.1
CCL21	-	-	-	-	1.6
CCL22	2.3	4.3	8.3	7.7	10.5
CCL23	3.4	1.3	2778.9	1748.2	875.8
CCL24	2.1	1.6	3.4	2.2	3.4
CCL25	-	-	-	2.8	1.7
CCL26	-	3.0	3.0	691.1	312.2
CCL27	-	-	-	-	-
CCL28	-1.3	-	-2.2	1.2	-
CSF2	-	-	97.3	-	-
CSF3	2.9	-	1093.1	-1.7	-2.8
CX3CL1	-	-	-	-	2.7
CXCL1	33	-1.3	436.7	-14.0	-16.1
CXCL2	9.8	-1.6	20.3	-6.1	-4.0
CXCL3	13.6	-1.3	233.1	-	-1.7
CXCL5	8.3	-2.4	96.8	-10.8	-7.9
CXCL6	5.3	-	181.2	-	-
CXCL9	7.7	-1.7	-	-	-
CXCL8	-1.3	-	108.8	-2.4	-3.0
CXCL10	1.2	-1.2	9.1	-	-2.0
CXCL11	-	-	68.8	-	1.3
CXCL12	-	-	-	-11.1	-
CXCL13	-	-	3.5	-1.1	-
CXCL14	-	-	-	-	-
CXCL16	1.4	-	2.1	-	-
IFN- $\gamma$	1.5	1.2	4.1	-	-
IFN- $\kappa$	1.2	-	-	-	-
IL1A	12.1	-1.5	93.5	-2.3	-2.0
IL1B	13.4	-1.8	874.6	-3.9	-2.5
IL2	-	-	-	-	1.7
IL4	-	-	-	-	-
IL5	-	-	1484.0	1.7	1.5
IL6	85.4	1.2	9389.8	-	-
IL9	7.7	-1.7	108.8	-2.4	-3.0
IL10	-	-	8.0	-	-
IL12A	3.3	-1.4	46.6	3.4	3.1
IL12B	-	-	-1.6	-1.9	-
IL13	5.6	-	1943.5	-	-

---

<b>IL16</b>		-	-		13.0	7.4	3.1
<b>IL18</b>		-	-		-2.6	1.2	-
<b>IL23A</b>		16.6	-		1244.7	-1.3	-
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>		2.8	-1.5		7.8	-1.7	-1.5

*Transcriptome analysis was realized with microarrays and RT-qPCR. Cells were treated with LPS (10 ng.mL-1), IL-4 (10 ng.mL-1) or IL-13 (50 ng.mL-1) for 24 hrs. Values are means of fold change from experiments with macrophages from three different donors. The results of genes for which the absolute fold change was lower than 1.2 were replaced with a dash.*

**Table 2: Effect of LPS, IL-4 and IL-13 on cytokine production in culture supernatants of human lung macrophages.**

Cytokines	Control	LPS	Control	IL-4	Control	IL-13
TNF- $\alpha$	121 $\pm$ 22 (42)	<b>27759 <math>\pm</math> 3198</b> ***	54 $\pm$ 9 (6)	70 $\pm$ 19	74 $\pm$ 15 (8)	100 $\pm$ 24
IL-1 $\beta$	45 $\pm$ 18 (6)	<b>67 <math>\pm</math> 15</b> *	12 $\pm$ 8 (6)	17 $\pm$ 8	15 $\pm$ 7 (7)	25 $\pm$ 8
CCL2	2379 $\pm$ 584 (32)	<b>23071 <math>\pm</math> 3689</b> ***	1763 $\pm$ 1053 (6)	1534 $\pm$ 987	2182 $\pm$ 1027 (6)	2061 $\pm$ 1227
CCL3	1147 $\pm$ 191 (41)	<b>148882 <math>\pm</math> 13342</b> ***	568 $\pm$ 151 (6)	741 $\pm$ 147	737 $\pm$ 218 (6)	696 $\pm$ 152
CCL4	2521 $\pm$ 425 (34)	<b>282849 <math>\pm</math> 38930</b> ***	1989 $\pm$ 274 (10)	<b>3173 <math>\pm</math> 507</b> **	1809 $\pm$ 231 (9)	<b>2991 <math>\pm</math> 524</b> *
CCL5	109 $\pm$ 63 (15)	<b>5256 <math>\pm</math> 1230</b> ***	66 $\pm$ 21 (6)	103 $\pm$ 35	49 $\pm$ 16 (9)	55 $\pm$ 16
CCL13	52 $\pm$ 13 (8)	97 $\pm$ 29	35 $\pm$ 10 (14)	<b>266 <math>\pm</math> 45</b> ***	35 $\pm$ 8 (19)	<b>415 <math>\pm</math> 74</b> ***
CCL17	19 $\pm$ 6 (8)	26 $\pm$ 6	5 $\pm$ 2 (11)	<b>70 <math>\pm</math> 20</b> **	6 $\pm$ 2 (9)	<b>71 <math>\pm</math> 22</b> *
CCL22	619 $\pm$ 119 (15)	<b>959 <math>\pm</math> 176</b> **	1419 $\pm$ 231 (12)	<b>7606 <math>\pm</math> 1282</b> ***	1221 $\pm$ 158 (22)	<b>5879 <math>\pm</math> 967</b> ***
CCL24	12040 $\pm$ 2364 (19)	<b>26698 <math>\pm</math> 6349</b> **	12040 $\pm$ 2364 (19)	11653 $\pm$ 2465	12040 $\pm$ 2364 (19)	11977 $\pm$ 2235
CXCL1	1371 $\pm$ 533 (8)	<b>246476 <math>\pm</math> 31805</b> ***	371 $\pm$ 100 (5)	<b>174 <math>\pm</math> 81</b> *	312 $\pm$ 91 (5)	<b>170 <math>\pm</math> 67</b> *
CXCL8	21470 $\pm$ 2671 (46)	<b>910698 <math>\pm</math> 92460</b> ***	11456 $\pm$ 3924 (6)	9811 $\pm$ 3290	20216 $\pm$ 8683 (7)	14378 $\pm$ 4517
CXCL10	13 $\pm$ 3 (10)	<b>979 <math>\pm</math> 368</b> *	2 $\pm$ 2 (6)	36 $\pm$ 21	8 $\pm$ 5 (6)	10 $\pm$ 6

Macrophages were treated for 24 hrs with LPS (10 ng.mL<sup>-1</sup>), IL-4 (10 ng.mL<sup>-1</sup>) or IL-13 (50 ng.mL<sup>-1</sup>) and supernatants were harvested and analyzed for cytokine with ELISA. Results are expressed in pg per 10<sup>6</sup> cells. Numbers of experiments are indicated in parenthesis. Asterisks indicate significant effect of LPS, IL-4 or IL-13 on cytokine production as compared to unstimulated macrophages (control) with paired Student's t test (\*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001).



**Table 3: Effect of LPS, IL-4 and IL-13 on transcript expression of enzymes and receptors involved in lipid metabolism in human lung macrophages.**

Gene symbol			Microarray		RT-qPCR		
			Fold change		Fold change		
			LPS vs Control	IL-4 vs Control	LPS vs Control	IL-4 vs Control	IL-13 vs control
Lipoxygenase pathway	Enzyme	PLA2G6	-1.4	-	-7.0	-1.5	-3.0
		ALOX5	-1.3	-1.2	-1.5	-	-4.0
		ALOX5AP	-	-1.3	-	-	-3.4
		ALOX12	-	-	-	-	-
		ALOX15	-	1.3	-3.0	155.4	46.1
		LTC4S	-11	-	-10.2	-1.2	-4.6
		LTA4H	-1.9	-1.2	-4.5	-1.9	-4.6
	Receptor	LTB4R	-	-	-2.9	-3.0	-3.0
		LTB4R2	-	-	-1.9	-1.7	-4.7
		CYSLTR1	-1.7	-	-5.1	1.6	-1.5
		CYSLTR2	-1.3	-	-2.8	-3.9	-8.8
Cyclo-oxygenase pathway	Enzyme	PTGS1	-1.3	2.6	-2.6	2.4	-
		PTGS2	100.6	1.2	494.1	-	-2.7
		PTGES	9.3	-	2074.4	-14	-16
		PTGIS	-	-	-	-1.3	-
		AKR1C3	-1.2	-1.7	-	-1.4	-
		HPGDS	-4.9	1.4	-4.1	2.1	-
		TBXAS1	-1.3	-	-1.9	-	-
	Receptor	PTGER1	2.9	-	-	-	-
		PTGER2	1.4	-	2.7	-	-
		PTGER3	-	-	8.4	-8.4	-
		PTGER4	1.9	-1.4	2.9	-2.3	-3.7
		PTGDR	-	-	-	-	-3.3
		PTGDR2	-	-	-	-	-
		PTGFR	1.2	-	-	-	-
		PTGIR	1.2	-	59.8	-28.8	-5.0
TBXA2R	-	-	-1.7	-1.6	-5.6		

*Transcriptome analysis was realized with microarrays and RT-qPCR. Cells were treated with LPS (10 ng.mL-1), IL-4 (10 ng.mL-1) or IL-13 (50 ng.mL-1) for 24 hrs. Values are means of fold change from experiments with macrophages from three different donors. The results of genes for which the absolute fold change was lower than 1.2 were replaced with a dash.*

**Table 4: Effect of LPS, IL-4 and IL-13 on surface marker transcripts expression in human lung macrophages.**

Gene symbol	Microarray		RT-qPCR		
	Fold change		Fold change		
	LPS vs Control	IL-4 vs Control	LPS vs Control	IL-4 vs control	IL-13 vs control
CD38	12.5	-1.2	46.8	-0.7	-2.9
CD197	3.9	-	46.8	-	-
CD200R1	-	4.0	-3.1	52	41.4
CD206	-1.2	2.4	-1.6	7.2	7.0

*Transcriptome analysis was realized with microarrays and RT-qPCR. Cells were treated with LPS (10 ng.mL-1), IL-4 (10 ng.mL-1) or IL-13 (50 ng.mL-1) for 24 hrs. Values are means of fold change from experiments with macrophages from three different donors. The results of genes for which the absolute fold change was lower than 1.2 were replaced with a dash.*

## Figure legends

**Figure 1: Biological processes affected during human lung macrophage polarization by LPS or IL-4, identified by gene ontology analysis.**

**Figure 2: Heatmap visualization of cellular components involved in human lung macrophages polarization.** Hierarchical clustering of the cytokine (A), lipid metabolism (B) and membrane protein (C) cellular components that were found differentially expressed between control, LPS-treated and IL-4-treated human lung macrophages. Results were obtained with macrophages from three independent donors cultured for 24 hrs. A red-green colour scale depicts normalized expression levels (red: high, green: low).

**Figure 3: Production of PGE<sub>2</sub> in culture supernatants of human lung macrophages.** Lung macrophages were incubated with medium (control), LPS (10 ng.mL<sup>-1</sup>) or IL-4 (10 ng.mL<sup>-1</sup>) for 24 hrs. Data are expressed in pg per 10<sup>6</sup> cells. Results are shown as mean ± S.E.M. of four independent experiments. \* indicates a significant difference versus LPS (\*P<0.05).

**Figure 4: Flow cytometry analysis of CD38, CD206 and CD23 in polarized human lung macrophages.** Lung macrophages were incubated with medium (control), LPS (10 ng.mL<sup>-1</sup>) or IL-4 (10 ng.mL<sup>-1</sup>) for 24 hrs and stained with antibodies raised against CD38 (A) CD206 (B) or CD23 (C). Results are shown as mean fluorescence intensity ± S.E.M. of 3-6 independent experiments. \* indicates a significant difference versus control (\*P<0.05; \*\*P<0.01). # indicates significant difference between LPS- and IL-4-treated lung macrophages (#P<0.05; ##P<0.01).

# Figures

Figure 1.

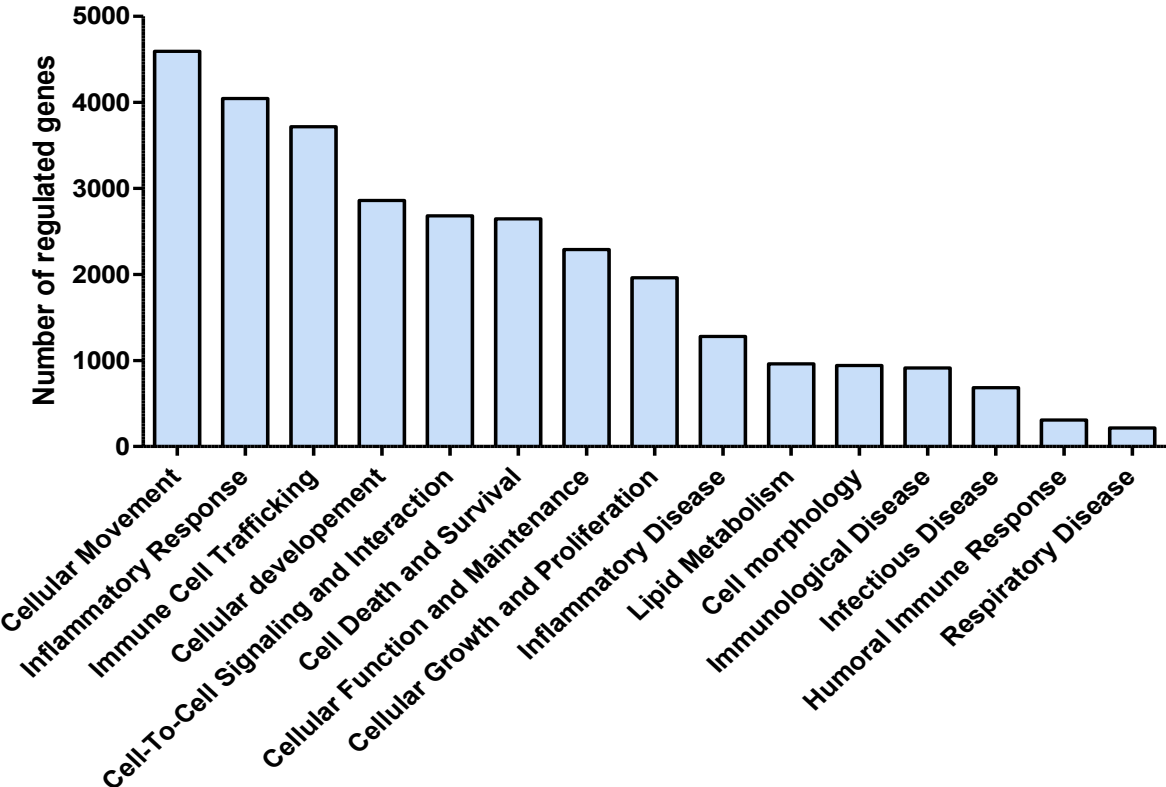


Figure 2.

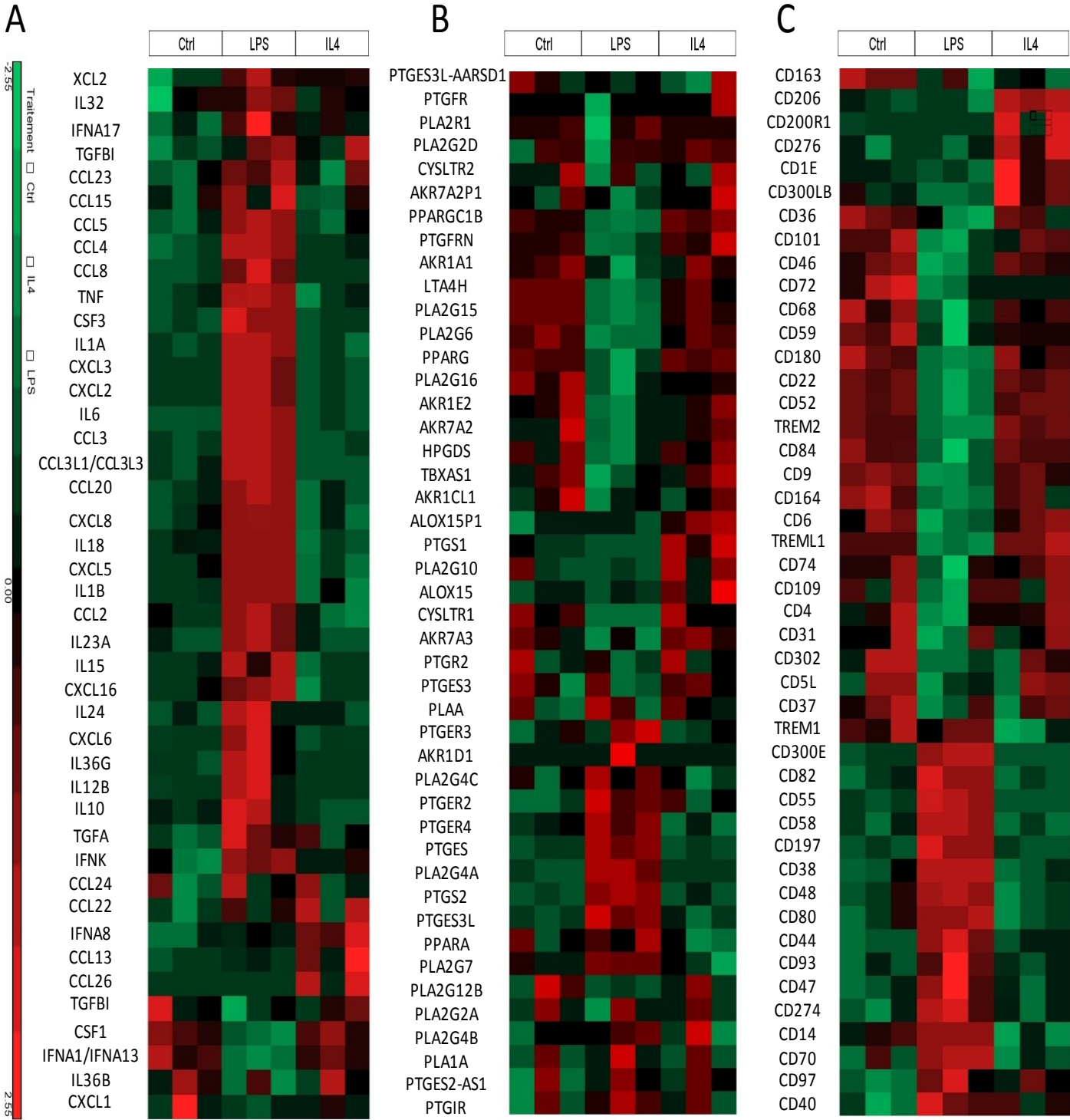


Figure 3.

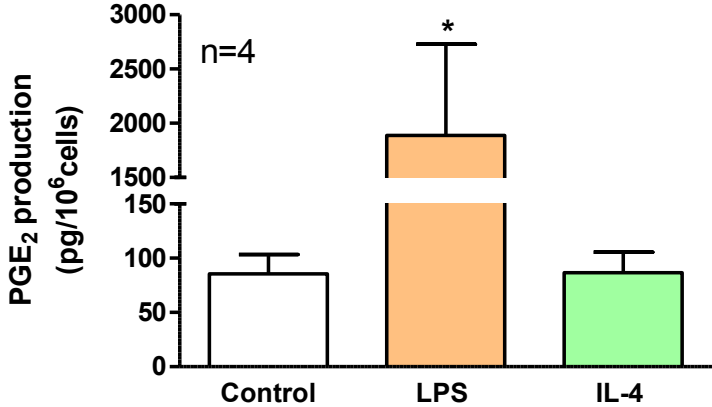
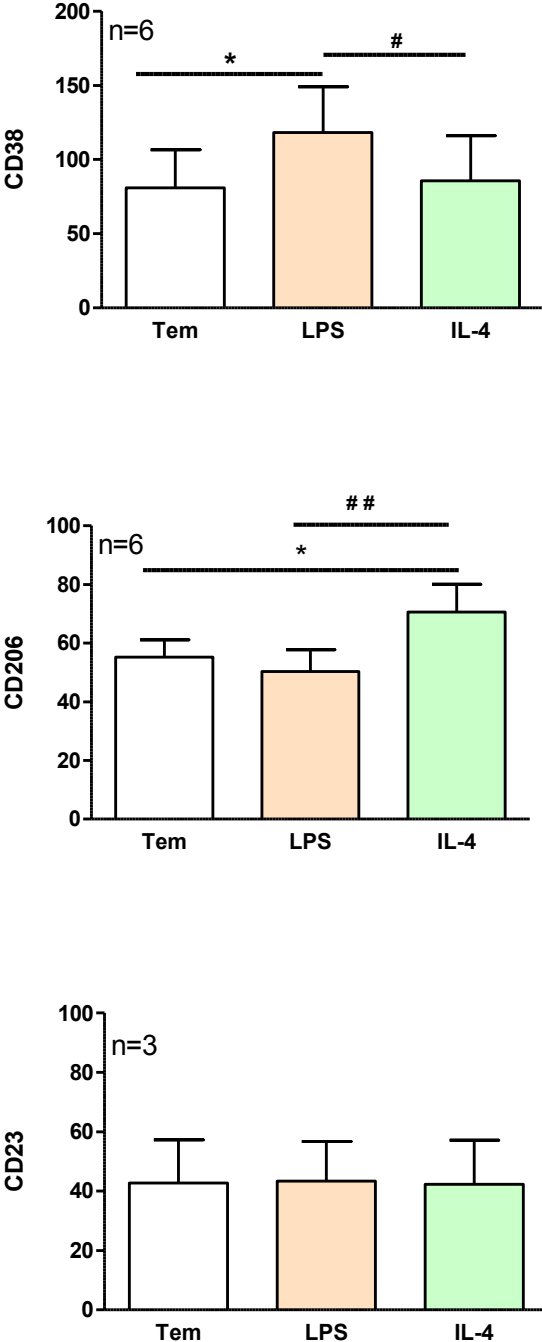


Figure 4.







**Résultats complémentaires****Effet de la polarisation M1/M2a des macrophages pulmonaires humains sur d'autres marqueurs**

Notre analyse transcriptomique à large spectre nous a permis d'identifier d'autres marqueurs de la polarisation M1/M2a des macrophages pulmonaires humains. Parmi les marqueurs M1 induit par le LPS, l'expression du CD80, du CD300e et de l'IDO1 (Indoléamine 2,3 Dioxygénase 1) est augmentée alors que l'expression du CD180, de TREM2 (*Triggering Receptor Express on Myeloid cells 2*) et de HPGDS (*Hematopoietic Prostaglandin D Synthase*) est diminuée (Tableau 2). Dans la polarisation M2a induite par l'IL-4, on observe une augmentation de l'expression du CD200R et de HPGDS alors que l'expression du CD14 est diminuée (Tableau 2).

Gènes	Facteur de variation	
	LPS versus Témoin	IL-4 versus Témoin
<i>CD14</i>	2.1 (ns)	-3 ( <i>p</i> <0.05)
<i>CD80</i>	5 ( <i>p</i> <0.01)	-1.5 (ns)
<i>CD180</i>	-7.3 ( <i>p</i> <0.001)	-1.4 (ns)
<i>CD200R</i>	-1 (ns)	4 ( <i>p</i> =0.06)
<i>CD300e</i>	11 ( <i>p</i> <0.001)	-1.1 (ns)
<i>TREM2</i>	-7 ( <i>p</i> <0.001)	1.3 (ns)
<i>HPGDS</i>	-5 ( <i>p</i> <0.001)	1.4 ( <i>p</i> <0.05)
<i>IDO1</i>	178 ( <i>p</i> <0.001)	1.3 (ns)

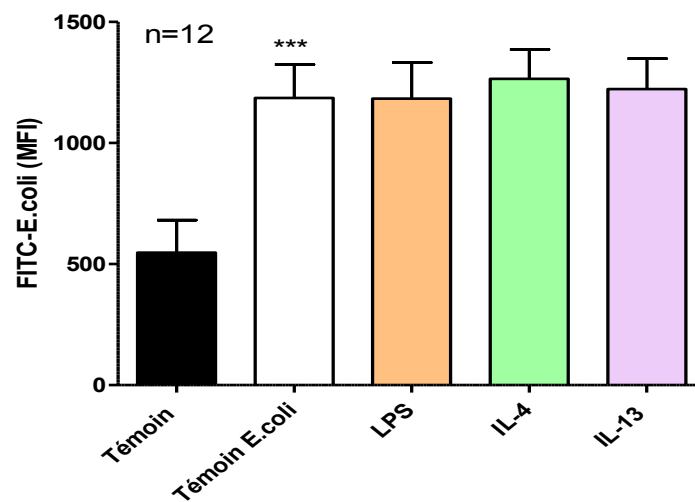
(ns : non significatif)

**Tableau 2 : Effet de la polarisation M1 (LPS) et M2a (IL-4) des macrophages pulmonaires humains sur l'expression d'autres marqueurs**

Les macrophages pulmonaires ont été traités avec du LPS (10 ng.mL<sup>-1</sup>) et de l'IL-4 (10 ng.mL<sup>-1</sup>) pendant 24h. L'expression de chaque gène a été évaluée par microarray et est exprimée en facteur de variation par rapport à la condition témoin. Les résultats sont représentés sous forme de moyenne de 3 expériences indépendantes et les statistiques ont été effectuées par un test t de Student.

## Effet de la polarisation des macrophages pulmonaires humains sur leur activité phagocytaire

L'activité phagocytaire participe à l'élimination de nombreux agents pathogènes mais également de débris cellulaires participant au maintien de l'homéostasie tissulaire. Nous nous sommes intéressés à l'activité phagocytaire des macrophages pulmonaires humains au cours de la polarisation M1 et M2a. Cette activité phagocytaire a été évaluée par l'utilisation de bioparticules couplées à une bactérie gram négatif (*E.coli*). Nos résultats ont montré que les macrophages pulmonaires humains phagocytent les bioparticules couplées à *E.coli*. Cependant, la polarisation des macrophages M1 et M2a ne module pas cette activité phagocytaire (**Figure 18**).



**Figure 17: Effet de la polarisation M1 (LPS) et M2a (IL-4/IL-13) des macrophages pulmonaires humains sur la phagocytose de *E.coli***

Les macrophages pulmonaires ont été exposés au LPS ( $10 \text{ ng.mL}^{-1}$ ), IL-4 ( $10 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) et IL-13 ( $50 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) pendant 24h. Au terme de cette incubation, les macrophages sont incubés avec des bioparticules de *E.coli* ( $5.10^6 \text{ particules.mL}^{-1}$ ) couplées au FITC pendant 30 min à l'obscurité. L'activité phagocytaire des macrophages est analysée par quantification de la fluorescence par cytométrie en flux. Les résultats sont exprimés en moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) et représentés sous forme de moyenne  $\pm$  s.e.m de 9 expériences indépendantes. Les statistiques ont été effectuées par la méthode ANOVA suivie d'un test t de student. \* indique une différence significative avec le témoin (\*\*\*) $p < 0.005$ .

## **Discussion**

Nous avons montré que les macrophages pulmonaires humains s'activent de manière distincte. Sous l'effet du LPS, les macrophages pulmonaires humains s'orientent vers un phénotype M1 et sous celui des cytokines Th2 (IL-4/IL-13) s'orientent vers un phénotype M2a. L'analyse transcriptomique à large spectre des marqueurs de la polarisation des macrophages pulmonaires humains a mis en évidence qu'un nombre élevé de gènes (4067) étaient régulés au cours de la polarisation M1/M2a des macrophages pulmonaires humains. Parmi ces gènes notre analyse s'est concentrée sur l'étude des marqueurs membranaires, des cytokines et chimiokines et des gènes du métabolisme lipidique. Nous avons montré que sous l'influence du LPS, la polarisation M1 des macrophages pulmonaires humains se définit par une augmentation des marqueurs membranaires CD38, CD197, une augmentation de la production des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CCL2, 3, 4, 5, 24, CXCL1, 8, 10) et une induction de la voie des cyclooxygénases *via* l'expression de la COX-2 et la production de PGE<sub>2</sub>. La polarisation M2a des macrophages pulmonaires induite par l'IL-4 et l'IL-13 est quant à elle définie par une augmentation de l'expression du récepteur au mannose CD206, une induction de la production des cytokines immunorégulatrices (CCL13, CCL17, CCL22) et une augmentation de la voie des lipoxigénases *via* l'induction de l'expression de la 15-LOX-1.

Pour ce qui concerne les marqueurs cytokiniques, nous avons montré que l'expression des transcrits d'autres chimiokines CC (CCL1, 7, 8, 19, 20, 23) et CXC (CXCL2, 3, 5, 6, 11, 13, 16) est augmentée dans les macrophages pulmonaires humains polarisés M1. Parmi ces chimiokines, l'induction de l'expression de CCL8, CCL19, CCL20, CXCL11 et CXCL13 a déjà été observée dans les macrophages dérivés de monocytes humains polarisés M1 (Martinez *et al.*, 2006). Les chimiokines CCL1, 7, 23 et CXCL2, 3, 5, 6, 16 pourraient quant à elles constituer de nouveaux marqueurs de la polarisation M1 des macrophages pulmonaires humains. L'expression de certaines cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 $\alpha$ , l'IL-12, l'IL-18, l'IL-23 et l'IFN- $\gamma$ , impliquées dans la réponse immunitaire Th1 (Striz *et al.*, 2014) est aussi augmentée dans nos macrophages pulmonaires humains polarisés M1. De manière inattendue mais intéressante, l'expression de cytokines Th2 comme l'IL-5, l'IL-9, l'IL-10 et l'IL-13 est également augmentée dans les macrophages pulmonaires humains polarisés M1 par le LPS. Ces résultats pourraient s'expliquer par une possible réorientation du phénotype M1 vers un phénotype M2 au terme de 24 heures d'incubation avec le LPS. Par ailleurs, l'induction de la production de PGE<sub>2</sub> dans les macrophages M1 pourrait participer à cette

réorientation du phénotype M1 vers un phénotype M2a des macrophages (Rodriguez *et al.*, 2014). Concernant la polarisation M2a des macrophages pulmonaires nous avons observé que très peu de marqueurs sont spécifiques de ce phénotype. Seul la production des chimiokines CCL13, CCL17 et CCL22 s'est avérée augmentée par l'IL-4 et l'IL-13. Concernant l'expression de CCL18 celle-ci n'est pas retrouvée modulée en présence de LPS, d'IL-4 ou d'IL-13, mais des données obtenues au sein de notre laboratoire ont montré que sa production était augmentée de manière significative en présence de LPS (10 ng.ml<sup>-1</sup>), d'IL-4 (10 ng.ml<sup>-1</sup>) et d'IL-13 (50 ng.ml<sup>-1</sup>) dans nos macrophages pulmonaires humains (Données non présentées). Notre analyse transcriptomique a aussi révélé que les chimiokines CCL11, CCL16 et CCL25 pourraient constituer de nouveaux marqueurs de la polarisation M2a induite par l'IL-4 et l'IL-13 dans les macrophages pulmonaires humains.

Les gènes du métabolisme lipidique sont également régulés au cours de la polarisation M1/M2 des macrophages pulmonaires. En plus d'une régulation de la voie de la cyclooxygénase-2 et de la 15-lipoxygénase-1 dans la polarisation M1/M2a, l'expression du gène HPGDS apparaît modulée de manière distincte entre les macrophages M1 et M2a. En effet, nous avons observé que l'expression de cette enzyme est diminuée dans les macrophages pulmonaires M1 et augmentée dans les macrophages pulmonaires M2a. Dans la littérature, l'expression de cette enzyme est majoritairement retrouvée dans les lymphocytes humains Th2 par rapport aux lymphocytes Th1 (Tanaka *et al.*, 2000). Cette enzyme participe à la synthèse de prostaglandine D<sub>2</sub> qui contribue au développement de la réponse immunitaire de type Th2 et à l'inhibition de la réponse Th1 (Tanaka *et al.*, 2004). Dans les macrophages de rats stimulés par LPS, le métabolite de la PGD<sub>2</sub>, la 15-Deoxy-delta(12,14)-prostaglandine J<sub>2</sub> est responsable d'une diminution de la production d'IL-12 (Azuma *et al.*, 2001). L'HPGDS et ses métabolites (PGD<sub>2</sub> et 15-Deoxy-delta(12,14)-prostaglandine J<sub>2</sub>) pourraient participer à la régulation de la polarisation des macrophages pulmonaires.

Par ailleurs notre analyse transcriptomique à large spectre a permis de révéler que d'autres marqueurs étaient régulés au cours de la polarisation M1/M2a des macrophages pulmonaires humains. En effet, parmi les marqueurs membranaires nous avons observé que l'expression du CD80 et du CD300e est augmentée dans les macrophages pulmonaires M1. La mise en évidence du CD80 comme marqueur de la polarisation M1 des macrophages a déjà été observée dans les macrophages dérivés de monocytes humains (Ambarus *et al.*, 2012; Jaguin *et al.*, 2013). Le CD80 est une molécule de co-stimulation impliquée dans la présentation des antigènes aux lymphocytes T pour induire leur activation. Concernant le CD300e, il n'existe

aucune donnée dans la littérature sur son rôle dans les macrophages. Le CD300e se lie aux protéines transmembranaires DAP10 et DAP12 impliquée dans l'activation ou l'inhibition des leucocytes (Lanier, 2009). Dans les monocytes et les cellules dendritiques, le CD300e est un récepteur actif aux propriétés pro-inflammatoires *via* la synthèse de ROI, de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-6, CXCL8) et des molécules de co-stimulation des lymphocytes T (Breckalo *et al.*, 2010). Nos résultats ont aussi montré que la stimulation des macrophages pulmonaires par le LPS diminue fortement l'expression du CD180, un récepteur impliqué dans l'inhibition de la signalisation intracellulaire du TLR4 (Divanovic *et al.*, 2005). L'expression du récepteur TREM2 est également diminuée dans les macrophages pulmonaires humains stimulés par le LPS. Ce récepteur TREM2 joue un rôle inhibiteur sur l'inflammation induite par les agonistes du TLR4. En effet, un *Knock Out* du gène codant pour TREM2, entraîne une augmentation de la réponse inflammatoire des macrophages alvéolaires murins stimulés par le LPS (Gao *et al.*, 2013).

Concernant la polarisation M2a des macrophages pulmonaires humains, nos résultats montrent une augmentation de l'expression des transcrits du récepteur CD200 (CD200R). Le CD200R est une glycoprotéine de surface, essentiellement exprimée par les cellules du système immunitaire. Une augmentation de l'expression de ce récepteur est observée dans les macrophages dérivés de monocytes humains polarisés M2a par l'IL-4 et l'IL-13 (Koning *et al.*, 2010; Ambarus *et al.*, 2012; Jaguin *et al.*, 2013). De récentes études soulignent l'intérêt du CD200R dans les voies aériennes de par son expression dans les macrophages alvéolaires murins et son rôle anti-inflammatoire permettant de limiter l'amplitude de la réponse pro-inflammatoire (Snelgrove *et al.*, 2008; Hussell *et al.*, 2014). Le CD14, un co-récepteur du TLR4 qui interagit avec la LBP pour permettre la reconnaissance du LPS, est lui aussi impliqué dans la polarisation M2a des macrophages. En effet, une diminution de son expression est observée dans les macrophages dérivés de monocytes humains de type M2 (Martinez *et al.*, 2009; Ambarus *et al.*, 2012; Beyer *et al.*, 2012) et dans nos macrophages pulmonaires humains polarisés M2a en présence d'IL-4 et d'IL-13.

Au cours de la polarisation M1 des macrophages pulmonaires par le LPS, notre analyse transcriptomique a montré que l'expression de l'IDO1 est fortement induite. L'IDO1 est une enzyme impliquée dans le catabolisme du tryptophane, un acide aminé essentiel qui participe à la croissance des pathogènes (Murakami *et al.*, 2013). L'induction de l'expression de cette enzyme a déjà été mise en évidence dans les macrophages dérivés de monocytes humains exposés au LPS (Jaguin *et al.*, 2013). Cette enzyme pourrait constituer une nouvelle cible de

régulation de la polarisation des macrophages. En effet, des données préliminaires non publiées au sein de notre laboratoire ont montré que les kynurénines produites par le métabolisme du tryptophane *via* l'IDO1 diminuent la production des cytokines M1 dans les macrophages pulmonaires humains.

L'ensemble de ces travaux montre que la polarisation M1/M2a des macrophages pulmonaires humains module l'expression de nombreux gènes impliqués dans la réponse inflammatoire des macrophages. Nous avons également voulu déterminer si la polarisation M1/M2a pouvait réguler l'activité majeure des macrophages qu'est la phagocytose. Contrairement à ce qui est décrit dans la littérature sur l'activité phagocytaire des macrophages polarisés M1, nos résultats n'ont pas montré d'augmentation de la production de la phagocytose d'*E coli* par les macrophages pulmonaires exposés au LPS. Néanmoins, nos résultats pourraient s'expliquer par la forte production de PGE<sub>2</sub> observée au cours de la polarisation M1 des macrophages pulmonaires humains. En effet, dans les macrophages alvéolaires, la PGE<sub>2</sub> est responsable d'une diminution de l'activité bactéricide *via* l'inhibition de la NADPH oxydase et de l'activité phagocytaire (Aronoff *et al.*, 2004; Serezani *et al.*, 2007). De plus, la PGE<sub>2</sub> diminue l'expression protéique du TLR4 dans les macrophages alvéolaires murins (Degraaf *et al.*, 2014). Ces travaux suggèrent que la PGE<sub>2</sub> pourrait être impliquée dans l'inhibition de l'activité phagocytaire des macrophages pulmonaires humains stimulés par le LPS. De plus les bactéries *E.coli* sont des bacilles à Gram négatif, composées de LPS qui activer la polarisation M1 des macrophages pulmonaires humains.

## *Article n°2*

### **15-Lipoxygenases regulate the production of chemokines in human lung macrophages**

C Abrial,<sup>1,2</sup>S Grassin-Delyle,<sup>1,2</sup> H Salvator,<sup>1,2</sup>M Brollo<sup>1</sup>,  
E Naline,<sup>1,2</sup>P Devillier<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Pharmacologie UPRES EA220, Hôpital Foch, Suresnes, France

<sup>2</sup>Université Versailles Saint Quentin, UFR Sciences de la santé, Saint Quentin en Yvelines, France

**Corresponding author:** P. Devillier, Laboratoire de Pharmacologie UPRES EA220, Hôpital Foch, 11 rue Guillaume Lenoir, F-92150 Suresnes, France. Tel: +33 146 252791, Fax: +33146252422. E-mail: p.devillier@hopital-foch.org

## **Introduction**

Les résultats de l'article 1 montrent que la polarisation M1/M2a des macrophages pulmonaires humains module l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la réponse inflammatoire. Parmi ces gènes, l'expression d'une enzyme du métabolisme lipidique, la 15-lipoxygénase-1, est fortement augmentée au cours de la polarisation M2a des macrophages par l'IL-4 et l'IL-13.

Dans la littérature, cette enzyme existe sous deux isoformes, la 15-lipoxygénase-1 (15-LOX-1) et la 15-lipoxygénase-2 (15-LOX-2) (Dobrian *et al.*, 2011). Dans le poumon, l'activité enzymatique et les métabolites issus de ces deux 15-lipoxygénases exercent des effets pro-inflammatoires (15(S)-HETE et 13(S)-HODE) (Liu *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2009) mais aussi des effets anti-inflammatoires (lipoxines A4 et résolvines D1) (Back *et al.*, 2014; Levy *et al.*, 2014). Les transcrits et métabolites de ces 15-lipoxygénases sont augmentés dans le LBA (Chu *et al.*, 2002; Lundstrom *et al.*, 2012), les expectorations (Profita *et al.*, 2000) et dans l'épithélium bronchique des patients asthmatiques sévères (Bradding *et al.*, 1995; Zhao *et al.*, 2009; Gras *et al.*, 2012; Mabalirajan *et al.*, 2013). Dans les cellules épithéliales, l'IL-4 et l'IL-13 induisent l'expression de la 15-LOX-1 (Jayawickreme *et al.*, 1999; Profita *et al.*, 1999; Brown *et al.*, 2001). L'induction de l'expression de la 15-LOX-1 est notamment associée à une augmentation des chimiokines dans la lignée de cellules épithéliales alvéolaires A549 (Liu *et al.*, 2009). Une augmentation de l'expression de la 15-LOX-1 est également observée dans les macrophages alvéolaires humains (Profita *et al.*, 2000). Dans les macrophages dérivés de monocytes humains, l'expression de la 15-LOX-1 est induite en présence des cytokines Th2 (IL-4 et IL-13) alors que l'expression de la 15-LOX-2 est augmentée en présence de LPS et d'IL-4/IL-13 (Wuest *et al.*, 2012). Dans les macrophages dérivés de monocytes humains, l'expression de la 15-LOX-2 est impliquée dans l'augmentation de la sécrétion de chimiokines (Danielsson *et al.*, 2008).

Cependant, l'expression et le rôle des ces deux isoformes n'ont jamais été évalués dans les macrophages pulmonaires humains et pourraient représenter une voie de régulation de la polarisation des macrophages. Ainsi, l'objectif initial de cette étude a été d'évaluer l'effet de la polarisation M1 (par le LPS) et M2a (par l'IL4/l'IL-3) des macrophages pulmonaires humains sur l'expression des deux isoformes de la 15-lipoxygénase. Puis, dans un second temps, d'étudier le rôle ces deux isoenzymes sur la régulation de la polarisation des macrophages par l'étude du chimiokinome caractéristique du phénotype M1 et M2a, préalablement décrit dans l'article 1.



**Title page:**

**15-Lipoxygenases regulate the production of chemokines in human lung macrophages**

C Abrial,<sup>1,2</sup> S Grassin-Delyle,<sup>1,2</sup> H Salvator,<sup>1,2</sup> M Brollo<sup>1</sup>,  
E Naline,<sup>1,2</sup> P Devillier<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Pharmacologie UPRES EA220, Hôpital Foch, Suresnes, France

<sup>2</sup>Université Versailles Saint Quentin, UFR Sciences de la santé, Saint Quentin en Yvelines, France

**Corresponding author:** P. Devillier, Laboratoire de Pharmacologie UPRES EA220, Hôpital Foch, 11 rue Guillaume Lenoir, F-92150 Suresnes, France. Tel: +33 146 252791, Fax: +33 146 252422. E-mail: p.devillier@hopital-foch.org

**Authorship contribution statement**

- CA, HS and MB prepared the lung macrophages and carried out immunoassays, the 15-lipoxygenase activity assay and RT-qPCRs.
- EN provided the human tissues and was also involved in preparation of the lung macrophages.
- CA analyzed the results, prepared the figures, performed the statistical analysis and drafted the manuscript.
- PD and SGD conceived the study, participated in its design, managed the work in the laboratory, analyzed the results, and drafted the manuscript.

## ABSTRACT

**Background and purpose.** 15-Lipoxygenase (15-LOX) activity is associated with inflammation and immune regulation. The objectives of the present study were to investigate the expression of 15-LOX-1 and 15-LOX-2 and evaluate their roles in regulating the polarization of human lung macrophages (LMs) in response to lipopolysaccharide (LPS) and Th2 cytokines (interleukins (IL)-4 and -13).

**Experimental approach.** Lung macrophages were isolated from patients undergoing surgery for carcinoma. The cells were cultured with PD146176 (1-10  $\mu\text{M}$ ), indomethacin (1  $\mu\text{M}$ ), MK 886 (1  $\mu\text{M}$ ) or vehicle and then stimulated with LPS (10  $\text{ng.mL}^{-1}$ ), IL-4 (10  $\text{ng.mL}^{-1}$ ) or IL-13 (50  $\text{ng.mL}^{-1}$ ) for 24 hrs. Levels of *ALOX15* (15-LOX-1) and *ALOX15B* (15-LOX-2) transcript expression were determined by RT-qPCR. Immunoassays were used to measure levels of M1 cytokines (TNF- $\alpha$ , CCL2, CCL3, CCL4, CXCL1, CXCL8 and CXCL10) and M2 cytokines (CCL13, CCL18 and CCL22) in the culture supernatants.

**Key results.** Stimulation of LMs with LPS was associated with greater expression of *ALOX15B*, whereas stimulation with IL-4/IL-13 induced the expression of *ALOX15*. PD146176 (10  $\mu\text{M}$ ) reduced the LPS-stimulated release of CCL2, CCL3, CCL4, CXCL1, CXCL8 and CXCL10 and the IL-4/IL-13-induced release of CCL13, CCL18 and CCL22. Furthermore, indomethacin revealed the inhibitory effect of PD146176 on TNF- $\alpha$  release.

**Conclusions and Implications.** Inhibition of the 15-LOX pathways is involved in down-regulation of the *in vitro* production of M1 and M2 chemokines in LMs. Our results suggest that the 15-LOX pathways have a role in the pathogenesis of inflammatory lung disorders and thus constitute a potential drug target.

**KEY WORDS.** 15-Lipoxygenase, lung macrophages, chemokines, macrophages polarization

**ABBREVIATIONS.** COX, cyclooxygenase; DMSO, dimethyl sulfoxide; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FCS, foetal calf serum; HPRT, hypoxanthine phosphoribosyltransferase; IL, interleukin; IFN- $\gamma$ , interferon- $\gamma$ ; LDH, lactate dehydrogenase; LM, lung macrophage; LOX, lipoxygenase; LPS, lipopolysaccharide; MDM, monocyte-derived macrophage; PCR, polymerase chain reaction; RT-qPCR, reverse transcriptase-quantitative polymerase chain reaction; RPMI, Roswell Park Memorial Institute; 15-HETE, 15-Hydroxyeicosatetraenoic acid; 13-HODE, 13-Hydroxy octadecadienoic acid.

## INTRODUCTION

Human lipoxygenases (LOXs) catalyze the stereoselective dioxygenation of 1,4-cis, cis-pentadiene-containing polyunsaturated fatty acids (such as arachidonic acid), with the formation of hydroperoxy fatty acids. The human LOXs include 5-LOX, two 12-LOXs and two 15-LOXs (15-LOX-1 and 15-LOX-2, respectively encoded by the *15ALOX*, and *15ALOXB* genes) (Dobrian *et al.*, 2011). In the lung, the different products of 15-LOX's enzymatic activity can stimulate inflammation and mucus secretion (e.g. 15-HETE and 13-HODE) or resolve inflammation and stimulate tissue repair (e.g. lipoxin A4, resolving D1, and protectin D1) (Back *et al.*, 2014; Levy *et al.*, 2014).

Greater activity of the 15-LOX inflammatory pathway in both childhood and adult asthma has been evidenced by high levels of 15-LOX transcripts and 15-LOX metabolites in exhaled breath condensates (Sachs-Olsen *et al.*, 2010), bronchoalveolar lavage fluids (Chu *et al.*, 2002; Ono *et al.*, 2009; Lundstrom *et al.*, 2012) and in induced-sputum (Profita *et al.*, 2000; Thomson *et al.*, 2014).

15-LOXs are strongly expressed in the bronchial epithelium, especially in severe asthmatics (Bradding *et al.*, 1995; Zhao *et al.*, 2009; Gras *et al.*, 2012; Mabalirajan *et al.*, 2013). In the epithelial cells, the Th2 cytokines interleukin (IL)-4 and IL-13 are potent inducers of 15-LOX expression (Profita *et al.*, 1999; Brown *et al.*, 2001, Jayawickreme *et al.*, 1999; Chaitidis *et al.*, 2005; Kuhn *et al.*, 2006; Jakiela *et al.*, 2013). In the human alveolar epithelial cell line A549, the overexpression of 15-LOX-1 is associated with greater chemokine release (Liu *et al.*, 2009). 15-LOX-1 is also expressed in eosinophils and macrophages from asthmatic patients (Bradding *et al.*, 1995; Profita *et al.*, 2000; Chu *et al.*, 2002; Mabalirajan *et al.*, 2013).

In pulmonary inflammatory diseases such as asthma and chronic obstructive pulmonary disease, macrophages orchestrate inflammatory reactions by releasing chemokines and cytokines (Barnes, 2008). Macrophages are essential regulators of both innate and adaptive immune responses and the resolution of inflammation. In response to environmental signals, macrophages exhibit a phenotypic polarization that mirrors the Th1/Th2 polarization of T lymphocytes. Upon exposure to microbial products such as bacterial lipopolysaccharide (LPS), macrophages undergo M1 polarization (the classical activation state, associated with microbicidal and tumoricidal activities) (Mantovani *et al.*, 2004; Benoit *et al.*, 2008). In contrast, Th2 cytokines induce M2 polarization, which is associated with immunoregulation, the dampening of inflammation, and the promotion of tissue remodelling. These two activation states involve the production of different cytokines and (especially) chemokines (Martinez *et al.*, 2006; Sica *et al.*, 2012). *In vitro*, the expression of *ALOX15B* increases as monocytes differentiate into macrophages. In monocyte-derived macrophages (MDMs), the *ALOX15* expression increased in response to the Th2 cytokines and the *ALOX15B* expression increased in response to the Th2 cytokines and LPS (Wuest *et al.*, 2012). In human MDMs, overexpression of 15-LOX-2 resulted in increased secretion of two chemokines (CCL2 and CXCL10) (Danielsson *et al.*, 2008). However, the 15-LOX's expression levels and functions in human LMs have yet to be characterized in detail. The objective of the present study was to assess the respective effects of LPS, IL-4 and IL-13 on the expression of 15-LOX-1 and 15-LOX-2 in human LMs and to investigate the role of 15-LOXs in the production of M1 and M2 chemokines.

## METHODS

### Materials

PD146176 (6,11-dihydro[1]benzothiopyrano[4,3-b]indole) and MK 886 were obtained from Tocris Biosciences (Bristol, UK). RPMI 1640 medium and bovine serum albumin were acquired from Eurobio Biotechnology (Les Ulis, France). Indomethacin, penicillin-streptomycin, dimethyl sulfoxide (DMSO), L-glutamine, trypan blue dye, foetal calf serum (FCS) and lipopolysaccharide (from *Escherichia coli* serotype 0111:B4) were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Human recombinant IL-4 and IL-13 were obtained from R&D Systems (Lille, France).

### Isolation and culture of human LMs

Experiments with human tissues were approved by the regional independent ethics committee (*Comité de Protection des Personnes Île de France VIII*, Boulogne-Billancourt, France). Lung tissues were obtained from 34 patients (mean  $\pm$  standard error mean (SEM) age:  $64 \pm 2$  years; gender (M:F): 26:8; mean  $\pm$  SEM FEV<sub>1</sub>/FVC ratio:  $0.83 \pm 0.03$ ; non-smokers: 7; smokers and ex-smokers: 10 and 17; pack years:  $45 \pm 4$ ) undergoing surgical resection for lung carcinoma and who had not received chemotherapy or radiotherapy. The LMs were isolated from lung parenchyma, as previously described (Buenestado *et al.*, 2010; Buenestado *et al.*, 2012). In culture, the mean  $\pm$  SEM number of adherent macrophages was  $191 \pm 13 \times 10^3$  cells per well for 24-well plates and  $486 \pm 36 \times 10^3$  cells per well for 12-well plates. More than 95% of the adherent cells were macrophages, as determined by May–Grünwald–Giemsa staining and CD68 immunocytochemistry. Cell viability exceeded 90%, as assessed by trypan blue dye exclusion. The experiments were performed in RPMI medium supplemented with 1% FCS. Classically activated macrophages (M1 macrophages) were obtained by exposure to LPS. Alternatively activated macrophages (M2 macrophages) were induced by *in vitro* exposure to the canonical Th2 cytokines IL-4 and IL-13. The LPS concentration ( $10 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) was selected as being suboptimal on the basis of previous data on time-response and concentration curves (Buenestado *et al.*, 2012). The concentration of IL-4 ( $10 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) was chosen on the basis of prior reports on human macrophage models (Joshi *et al.*, 2010; Pechkovsky *et al.*, 2010; Staples *et al.*, 2012). The concentration of IL-13 ( $50 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) was chosen on the basis of previous experiments in our laboratory (data not shown).

### Reverse transcriptase-quantitative polymerase chain reaction

Lung macrophages were stimulated for 24 hrs with LPS ( $10 \text{ ng.mL}^{-1}$ ), IL-4 ( $10 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) and IL-13 ( $50 \text{ ng.mL}^{-1}$ ). Total RNA was prepared using TRIzol<sup>®</sup> reagent (Life Technologies, Saint Aubin, France) and RNA was extracted according to the manufacturer's instructions. The RNA's intactness was determined by running an aliquot of each sample on an Experion<sup>™</sup> automated electrophoresis station (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Next, 1  $\mu\text{g}$  of total RNA was reverse-transcribed using SuperScript<sup>®</sup> III First-strand SuperMix kit (Life Technologies).

Specific TaqMan<sup>®</sup> arrays based on predesigned reagents (Life Technologies) were used for the analysis of lipoxygenase and cyclooxygenase transcripts: *ALOX5* (5-lipoxygenase), *ALOX5AP* (5-lipoxygenase activating protein), *ALOX12* (12-lipoxygenase), *ALOX15* (15-LOX-1), *ALOX15B* (15-LOX-2), *PTGS1* (cyclooxygenase 1) and *PTGS2* (cyclooxygenase 2). Reverse transcriptase - quantitative PCR was performed using Gene Expression Master Mix (Life Technologies) with 20 ng of cDNA in a StepOnePlus thermocycler (Life Technologies). The thermal cycling conditions were as follows: initial denaturation at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 sec and 60°C for 1 min. The housekeeping gene hypoxanthine phosphoribosyltransferase (*HPRT1*) was used for signal normalization.

### Assay of 15-LOX activity

Lung macrophages were pre-incubated with PD146176 (10  $\mu\text{M}$ ) or vehicle for 1 hour prior to incubation with LPS or IL-4 for 24 hrs. No arachidonic acid was added to the preparation. 15(S)-HETE concentrations were measured in culture supernatants using a commercially available enzyme immunoassay kit (Cayman Chemical Europe, Tallinn, Estonia), according to the manufacturer's instructions. The detection limit was 170  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . 15(S)-HETE concentrations were expressed in  $\text{pg}$  per  $10^6$  LMs.

### Effect of the inhibition of 15-LOX, 5-LOX and cyclooxygenases on the production of M1 and M2 cytokine

The day after isolation from lung parenchyma, macrophages were washed twice with RPMI medium. Next, 1 mL of RPMI medium supplemented with 1% FCS was added to each well. Lung macrophages were treated with the specific 15-LOX inhibitor PD146176 (1-10  $\mu\text{M}$  (Gregus *et al.*, 2013)) or DMSO vehicle for 1 hr prior to stimulation with 10  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  LPS, 10  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  IL-4 or 50  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  IL-13 for 24 hrs.

In order to investigate 15-LOX's involvement in the release of M1 and M2 cytokines, a non-selective COX inhibitor (indomethacin, 1  $\mu\text{M}$  (Buenestado *et al.*, 2012)) and a 5-LOX-activating protein inhibitor (MK 886, 1  $\mu\text{M}$  (Menard *et al.*, 1990)) or the corresponding vehicles were added to the culture 30 min before addition of the 15-LOX inhibitor PD146176 (10  $\mu\text{M}$ ) or its vehicle and exposure of the macrophages to LPS, IL-4 or IL-13 for 24 hrs.

Stock solutions (10 mM) of PD146176, MK 886 and indomethacin were prepared in DMSO. All subsequent dilutions were prepared daily in complete medium. The DMSO concentration applied to cells in culture did not exceed 0.12% and did not alter the production of cytokines. Cytotoxicity of PD146176, indomethacin and MK 886 was determined by measuring lactate dehydrogenase (LDH) activity in LM supernatants (using the LDH cytotoxicity assay from Cayman Chemical Europe). Neither the vehicles nor the compounds used in this work altered the viability of LMs. All wells were run in duplicate. After 24 hrs of incubation, LM supernatants were collected, stored at  $-20^\circ\text{C}$  and subsequently assayed for cytokines.

### Cytokine measurements

Cytokine levels in the culture supernatants were measured with specific ELISAs (the Duoset Development System from R&D Systems), according to the manufacturer's instructions. The supernatants were diluted with RPMI medium as appropriate and the optical density was determined at 450 nm with an MRX II microplate reader (Dynex Technologies, Saint-Cloud, France). Cytokine concentrations are expressed as  $\text{pg}$  per  $10^6$  LMs. The detection limits of these assays were 4  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  for CCL3, CCL13, CCL18, CCL22, 8  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  for TNF- $\alpha$ , CCL2, CCL4 and 32  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  for CXCL1, CXCL8 and CXCL10.

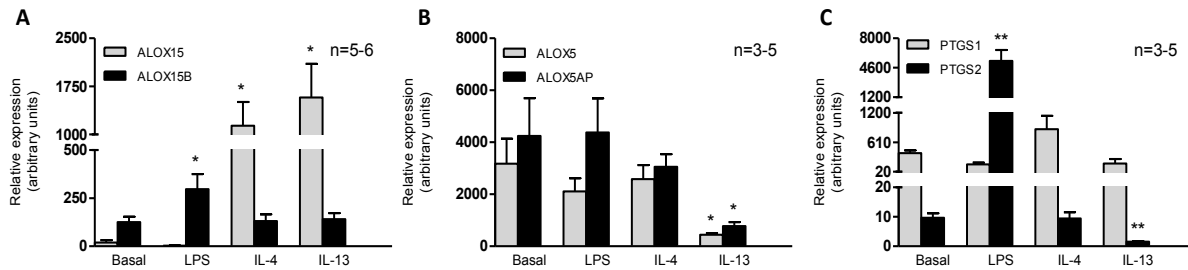
### Data analysis and statistical procedures

Data are expressed as the mean  $\pm$  the standard error of the mean (SEM) from experiments performed with LMs obtained from  $n$  patients. The concentration-effect curves were analyzed using GraphPad Prism<sup>®</sup> software (version 5.01, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). The relative expression of mRNAs was calculated according to the  $2^{-(\Delta\text{Ct})}$  method (Livak *et al.*, 2001). Statistical analysis of mRNA expression levels was performed with a paired or unpaired  $t$ -test, as appropriate. Other analyses were performed with a one-way, repeated-measures analysis of variance followed by Bonferroni's post-tests. The threshold for statistical significance was defined as  $p < 0.05$ .

## RESULTS

### Expression of 15-LOX isoenzyme transcripts and other enzymes of the eicosanoid pathways in polarized human LMs.

We investigated the expression and regulation of *ALOX15* (15-LOX-1) and *ALOX15B* (15-LOX-2) transcripts in human LMs in the presence or absence of LPS, IL-4 or IL-13. In unstimulated macrophages, the *ALOX15B* transcript was expressed at a higher level than the *ALOX15* transcript (Figure 1 A).



**Figure 1. mRNA expression of *ALOX15*, *ALOX15B*, *ALOX5*, *ALOX5AP*, *PTGS1* and *PTGS2* in polarized human LMs.** Lung macrophages were incubated with LPS ( $10 \text{ ng.mL}^{-1}$ ), IL-4 ( $10 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) or IL-13 ( $50 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) for 24 hrs. Levels of *ALOX15*, *ALOX15B*, *ALOX5*, *ALOX5AP*, *PTGS1* and *PTGS2* transcripts were determined by RT-qPCR and normalized against the expression of a housekeeping gene (*HPRT1*). Data correspond to the mean  $\pm$  SEM of three to six independent experiments. \* indicates a significant difference relative to the baseline condition (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

Quantitative analysis revealed that a 24-hr incubation with IL-4 and IL-13 was associated with greater expression of *ALOX15* transcripts (but not *ALOX15B* transcripts) in LMs. Conversely, incubation with LPS was associated with greater expression of *ALOX15B* transcripts but not *ALOX15* transcripts (Figure 1A).

We also investigated the mRNA expression of other enzymes in eicosanoid pathways in human LMs. Unstimulated macrophages expressed transcripts of *ALOX5*, *ALOX5AP*, *PTGS1* and *PTGS2* (Figure 1B and 1C). Exposure to LPS was associated with greater mRNA expression of *PTGS2* but did not alter expression of *ALOX5*, *ALOX5AP* and *PTGS1* (Figure 1B and 1C). Stimulation with IL-4 did not alter the expression of *ALOX5*, *ALOX5AP*, *PTGS1* and *PTGS2*. However, exposure of LMs to IL-13 was associated with lower mRNA expression of *ALOX5*, *ALOX5AP* and *PTGS2* but did not alter expression of *PTGS1* (Figure 1B and 1C). Transcripts of *ALOX12* were not detected under any conditions (data not shown).

In order to assess the relationship between the upregulation of *ALOX15B* transcripts (by LPS) and *ALOX15* transcripts (by IL-4 and IL-13) on one hand and the activity of the 15-LOXs on the other, we measured the production of the arachidonic acid metabolite 15(S)-HETE produced by both 15-LOX-1 and 15-LOX-2. Exposure to LPS was associated with greater 15(S)-HETE production by LMs. This relative increase was abrogated by the presence of PD146176. Incubation with IL-4 was not associated with greater 15(S)-HETE production (Table 1).

**Table 1. 15-LOX activity in polarized human LMs**

	Baseline	PD 10 $\mu$ M	LPS only	LPS+PD 10 $\mu$ M	IL-4 only	IL-4+PD 10 $\mu$ M
15-HETE (pg/10 <sup>6</sup> LMs)	176 $\pm$ 47	167 $\pm$ 38	420 $\pm$ 95 ##	191 $\pm$ 15 **	183 $\pm$ 34	222 $\pm$ 39

Lung macrophages were incubated for 1 hr in the presence or absence of PD146176 prior to the addition of LPS (10 ng.mL<sup>-1</sup>) or IL-4 (10 ng.mL<sup>-1</sup>). 15(S)-HETE levels were determined in the LM culture supernatants collected after 24 hrs of incubation. The data are reported as the mean  $\pm$  SEM of seven independent experiments. # indicates a significant difference relative to the baseline condition (##*p*<0.01). \* indicates a significant difference relative to the LPS condition (\*\**p*< 0.01).

### Inhibition of 15-LOX activity by PD146176 reduces the release of both M1 and M2 chemokines by human LMs.

#### Effects of LPS, IL-4 and IL-13 on the production of M1 and M2 cytokines by LMs

Incubation with LPS was associated with significant greater production of the M1 chemokines CCL2, CCL3, CCL4, CXCL1, CXCL8 and CXCL10 (Table 2).

**Table 2. Inhibitory effect of PD146176 on the LPS-induced release of M1 chemokines in human LMs.**

Cytokines (ng/10 <sup>6</sup> LMs)	Baseline	LPS only	PD 1 $\mu$ M + LPS	PD 10 $\mu$ M + LPS
CCL2	1.50 $\pm$ 0.58 n=8	17.57 $\pm$ 3.49 ## n=8	21.05 $\pm$ 4.50 n=8	9.13 $\pm$ 3.66 * n=8
CCL3	0.95 $\pm$ 0.40 n=6	233.38 $\pm$ 24.88 ### n=6	230.71 $\pm$ 27.45 n=6	164.45 $\pm$ 14.96 * n=6
CCL4	1.67 $\pm$ 0.17 n=10	353.26 $\pm$ 42.85 ## n=10	319.16 $\pm$ 38.10 n=10	236.25 $\pm$ 48.50 **** n=10
CXCL1	0.19 $\pm$ 0.06 n=7	208.17 $\pm$ 28.68 ### n=7	190.02 $\pm$ 21.01 n=7	95.20 $\pm$ 26.88 ** n=7
CXCL8	12.24 $\pm$ 2.77 n=6	920.67 $\pm$ 182.02 ## n=6	949.28 $\pm$ 162.56 n=6	491.97 $\pm$ 138.92 ** n=6
CXCL10	0 (LD) n=6	11.90 $\pm$ 4.62 # n=6	ND n=0	5.23 $\pm$ 2.44 * n=6

Lung macrophages were incubated for 1 hr in the presence or absence (the baseline condition) PD146176 (1-10  $\mu$ M) or vehicle before being stimulated with LPS (10 ng.mL<sup>-1</sup>) for 24 hrs. The concentrations of the chemokines in culture supernatants were measured in ELISAs. The data are reported as the mean  $\pm$  SEM of six to ten independent experiments. # indicates a significant

difference relative to the baseline condition (<sup>#</sup> $p < 0.05$ ; <sup>##</sup> $p < 0.01$ ; <sup>###</sup> $p < 0.001$ ) and \* indicates a significant difference relative to LPS alone (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ). Data for the vehicle is not shown because 0.1% DMSO had no effect on cytokine production.

Incubation with IL-4 or IL-13 was associated with significantly greater production of M2 cytokines (CCL13 and CCL22), whereas the production of CCL18 was unchanged (Table 3).

**Table 3. Inhibitory effect of PD146176 on the IL-4- and IL-13-induced release of M2 chemokines in human LMs.**

Cytokines (ng/10 <sup>6</sup> LMs)	Baseline	IL-4 only	With IL-4	
			PD 1 $\mu$ M	PD 10 $\mu$ M
CCL13	0.04 $\pm$ 0.01 n=6	0.23 $\pm$ 0.06 # n=6	0.025 $\pm$ 0.08 n=6	0.09 $\pm$ 0.04** n=6
CCL18	96.02 $\pm$ 22.41 n=7	101.73 $\pm$ 16.75 n=7	99.69 $\pm$ 22.79 n=7	59.32 $\pm$ 20.17 * n=7
CCL22	1.12 $\pm$ 0.30 n=9	4.73 $\pm$ 1.00 ## n=9	5.93 $\pm$ 1.22 n=9	2.27 $\pm$ 0.63 * n=9

Cytokine	Baseline	IL-13 only	With IL-13	
			PD 1 $\mu$ M	PD 10 $\mu$ M
CCL13	0.04 $\pm$ 0.01 n=6	0.56 $\pm$ 0.14# n=6	0.40 $\pm$ 0.17 n=6	0.18 $\pm$ 0.10 ** n=6
CCL18	91.68 $\pm$ 23.00 n=7	112.97 $\pm$ 19.05 n=7	118.31 $\pm$ 22.02 n=7	78.96 $\pm$ 22.83 n=7
CCL22	1.12 $\pm$ 0.3 n=9	4.75 $\pm$ 1.18 ## n=9	5.42 $\pm$ 1.10 n=9	3.37 $\pm$ 0.88 * n=9

Lung macrophages were incubated for 1 hr in the presence or absence (the baseline condition) of PD146176 (1-10  $\mu$ M) or vehicle before being stimulated with (IL-4 10 ng.mL<sup>-1</sup>) or IL-13 (50 ng.mL<sup>-1</sup>) for 24 hrs. The concentrations of chemokines in the culture supernatants were measured in ELISAs. The data are reported as the mean  $\pm$  SEM of six to nine independent experiments. <sup>#</sup> indicates a significant difference relative to the baseline condition (<sup>#</sup> $p < 0.05$ ; <sup>##</sup> $p < 0.01$ ) and \* indicates a significant difference relative to IL-4 or IL-13 (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ). Data for the vehicle is not shown because 0.1% DMSO had no effect on cytokine production.

### Effect of 15-LOX inhibition on the production of M1 and M2 cytokines by LMs

Since *ALOX15* and *ALOX15B* were expressed in human LMs and were respectively up-regulated by IL-4/IL-13 and LPS, we next assessed the effect of a 15-LOX inhibitor (PD146176, with activity against 15-LOX-1 and 15-LOX-2) on the LPS-induced M1 cytokines and the IL-4/IL-13-induced M2 cytokines. Inhibition of 15-LOX isoenzymes by 10  $\mu$ M PD146176 was



associated with lower LPS-induced production of the M1 chemokines CCL2, CCL3, CCL4, CXCL1, CXCL8 and CXCL10, with relative reductions of 48%, 29%, 33%, 54%, 46% and 56%, respectively (Table 2). Similarly, levels of the IL-4- and IL-13-induced M2 chemokines CCL13, CCL22 and CCL18 (at least with IL-4) were significantly lower in the presence of 10  $\mu$ M PD146176, with relative reductions of 58%, 37% and 52% with IL-4 and 67%, 28% and 29% with IL-13, respectively (Table 3). Lastly, TNF- $\alpha$  secretion was not significantly lower (relative reduction: 6%) after incubation with PD146176 (Table 4).

**Table 4. The inhibitory effect of PD146176, indomethacin and MK 886 on the LPS-induced release of TNF- $\alpha$  in human LMs.**

Cytokine (ng per 10 <sup>6</sup> LMs)	Basal	PD 10 $\mu$ M	LPS		+ Indomethacin 1 $\mu$ M		+ MK 886 1 $\mu$ M		+ Indomethacin 1 $\mu$ M + MK 886 1 $\mu$ M	
			LPS	LPS + PD 10 $\mu$ M	LPS	LPS + PD 10 $\mu$ M	LPS	LPS + PD 10 $\mu$ M	LPS	LPS + PD 10 $\mu$ M
TNF- $\alpha$	0.20 $\pm$ 0.05	0.18 $\pm$ 0.07	19.7 $\pm$ 6.2 ##	18.2 $\pm$ 5.5	31.1 $\pm$ 9 ++	18 $\pm$ 5.5 **	17.3 $\pm$ 5.6	20.1 $\pm$ 6.5	31.5 $\pm$ 9.3 ++	19.2 $\pm$ 4.5 **

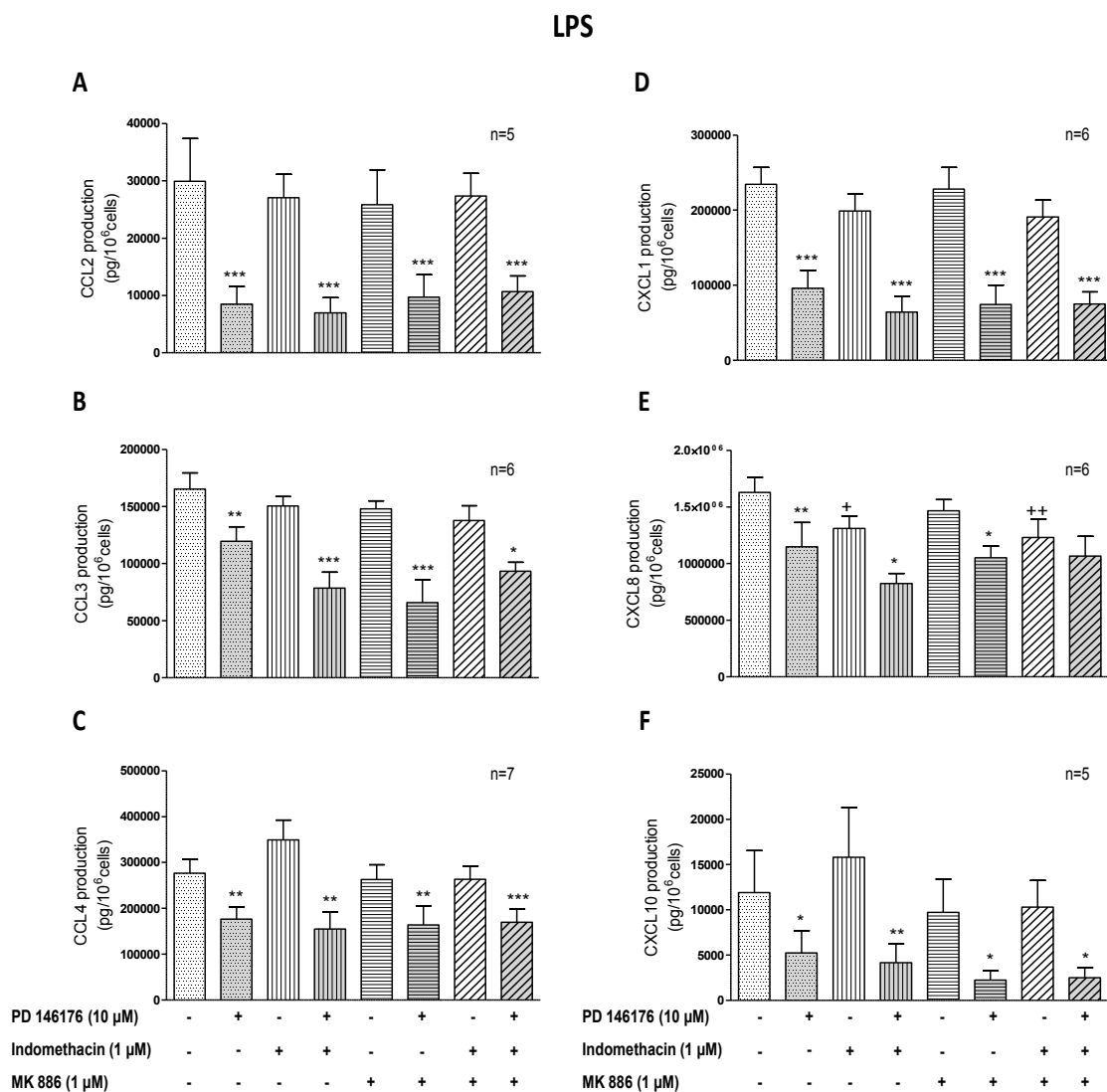
Lung macrophages were exposed to medium alone (the baseline condition) or medium supplemented with indomethacin (1  $\mu$ M) or MK 886 (1  $\mu$ M) or vehicles for 30 min before being pre-incubated for 1 hr with PD146176 (10  $\mu$ M) or vehicle prior to stimulation with LPS (10 ng.mL<sup>-1</sup>). Levels of TNF- $\alpha$  in the culture supernatant were determined after 24 hrs of incubation. Data are reported as the mean  $\pm$  SEM of four independent experiments. # indicates a significant difference relative to the baseline condition (<sup>##</sup> $p < 0.01$ ), + indicates a significant difference relative to LPS alone (<sup>++</sup> $p < 0.01$ ) and \* indicates a significant difference relative to the corresponding controls (<sup>\*\*</sup> $p < 0.01$ ). Data for the vehicle is not shown because 0.12% DMSO had no effect on cytokine production.

In unstimulated LMs, PD146176 did not modulate the production of the M1 chemokines (CCL2, CCL3, CCL4, CXCL1, CXCL8 and CXCL10), M2 chemokines (CCL13, CCL18 and CCL22) or TNF- $\alpha$ .

#### **Validation of the 15-LOX pathway's specific involvement in the production of M1 and M2 cytokines by LMs.**

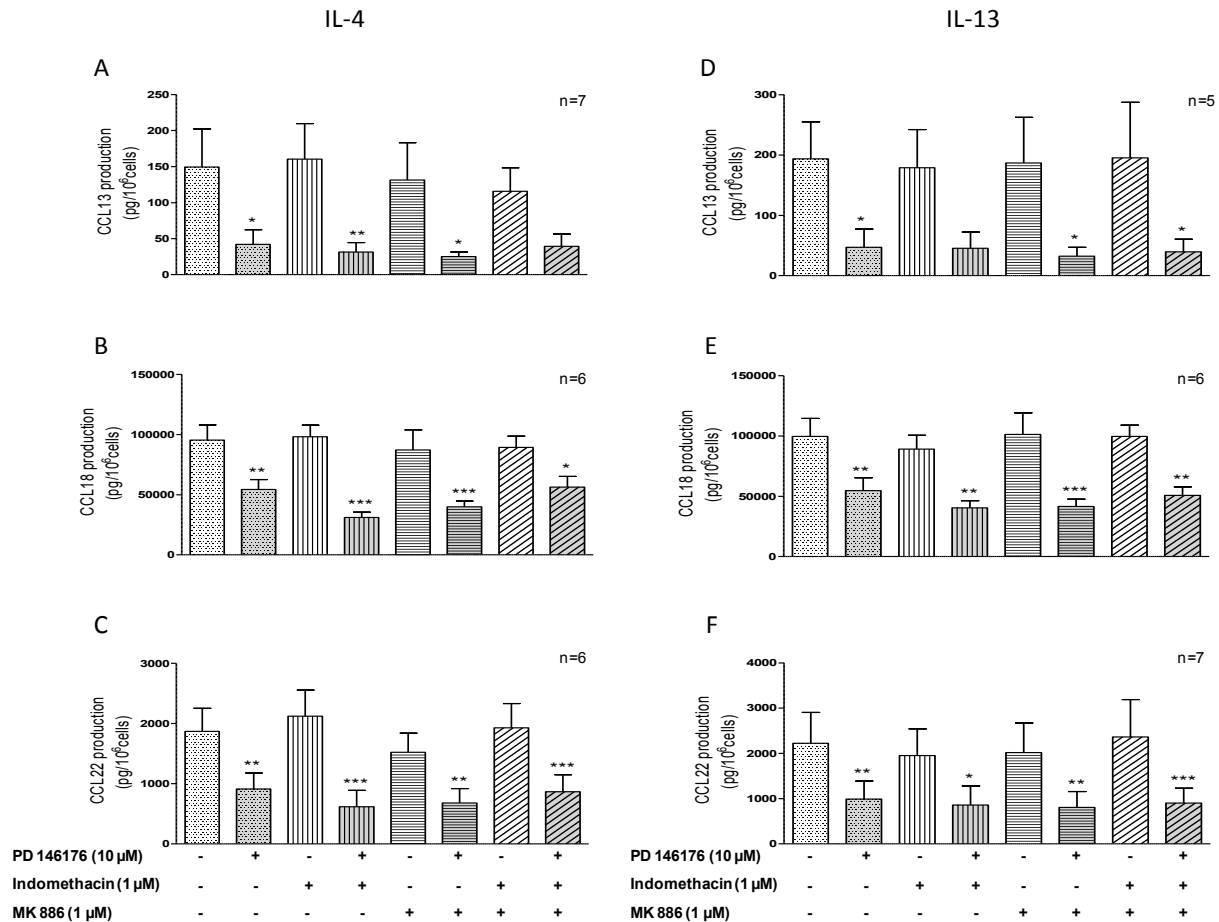
The *ALOX5*, *ALOX5AP*, *PTGS1* and *PTGS2* genes are expressed and modulated in polarized human LMs and share a common substrate (arachidonic acid) with *ALOX15* and *ALOX15B*. We hypothesized that inhibition of 15-LOXs with PD146176 might deviate the arachidonic acid towards other eicosanoid pathways. To ascertain the role of the 15-LOX pathway, human LMs were pretreated with an inhibitor of 5-lipoxygenase-activating protein (MK 886) and a non-selective COX inhibitor (indomethacin) before addition of the 15-LOX inhibitor (PD146176). Neither indomethacin nor MK 886 (whether added alone or together) was associated with differences in the production of M1 and M2 cytokines (other than CXCL8) and TNF- $\alpha$ . Production of CXCL8 was lower after incubation with indomethacin alone and with

indomethacin + MK 886 (Figure 2E). However, TNF- $\alpha$  production was higher with indomethacin alone and with indomethacin + MK 886 (Table 4). Inhibition of the production of M1 chemokines (CCL2, CCL3, CCL4, CXCL1 and CXCL10) and M2 chemokines (CCL13, CCL18 and CCL22) by PD146176 was maintained in presence of indomethacin and MK 886 (whether added alone or together) (Figures 2A to 2F and 3A to 3F). PD146176 still inhibited CXCL8 production when the LMs were pre-treated with indomethacin (Figure 2E) or MK 886 alone. However, the inhibitory effect of PD146176 on CXCL8 production was not observed when LM was incubated with indomethacin and MK 886 together (Figure 2E). Inhibition of COXs by indomethacin revealed the inhibitory effect of PD146176 on LPS-induced TNF- $\alpha$  production (Table 4).



**Figure 2. The roles of indomethacin and MK 886 in the suppression of LPS-induced M1 chemokine release from human LMs by PD146176.** Human LMs were exposed to medium alone (the baseline condition) or medium supplemented with indomethacin (1  $\mu$ M), MK 886 (1  $\mu$ M) or vehicles for 30 min before being pre-incubated for 1 hrs with PD146176 (10  $\mu$ M) or vehicle. The cells were then stimulated with LPS (10 ng.mL<sup>-1</sup>). M1 chemokine release was determined in culture supernatants after 24 hrs of incubation time. Data are reported as the mean  $\pm$  SEM of five to seven independent experiments. \* indicates a significant difference relative

to the corresponding controls ( $*p<0.05$ ;  $**p<0.01$ ;  $***p<0.001$ ) and  $^+$  indicates a significant difference relative to LPS ( $^+p<0.05$ ,  $^{++}p<0.01$ ). Data for the vehicle is not shown because 0.12% DMSO had no effect on cytokine production.



**Figure 3. The roles of indomethacin and MK 886 in the suppression of IL-4- or IL-13-induced M2 chemokine release from human LMs by PD146176.** Human LMs were exposed to medium alone (the baseline condition) or medium supplemented with indomethacin (1 μM), MK 886 (1 μM) or vehicles for 30 min before being pre-incubated for 1 hrs with PD146176 (10 μM) or vehicle. The cells were then stimulated with IL-4 (10 ng.mL<sup>-1</sup>) or IL-13 (50 ng.mL<sup>-1</sup>). M2 chemokine release was determined in culture supernatants collected after 24 hrs of incubation time. Data are reported as the mean ± SEM of five to seven independent experiments. \* indicates a significant difference relative to the corresponding controls ( $*p<0.05$ ;  $**p<0.01$ ;  $***p<0.001$ ). Data for the vehicle is not shown because 0.12% DMSO had no effect on cytokine production.

## DISCUSSION AND CONCLUSIONS

Our results demonstrate that *ALOX15* and *ALOX15B* transcripts are expressed in human LMs and are up-regulated by IL-4/IL-13 and by LPS, respectively. The inhibition of 15-LOX by PD146176 was associated with reductions in the LPS-induced release of the M1 cytokines CCL2, CCL3, CCL4, CXCL1, CXCL8 and CXCL10 and the IL-4/IL-13-induced release of the M2 cytokines CCL13, CCL18 and CCL22. This observation suggests that the 15-LOXs have a modulatory role in the polarization of human LMs.

In human blood monocytes, IL-4 and IL-13 strongly up-regulate the expression of *ALOX15* (Chaitidis *et al.*, 2005). During the *in vitro* differentiation of human monocytes to macrophages, markedly greater *ALOX15B* expression has been reported, whereas *ALOX15* and *ALOX12* expression remained low (Wuest *et al.*, 2012). *ALOX15B* was also found to be strongly expressed in unstimulated human LMs (the present study). The stimulation of human MDMs with the two canonical Th2 cytokines was associated with greater expression of *ALOX15B*, whereas greater *ALOX15* expression was observed with IL-4 and (to a much lesser degree) IL-13 (Wuest *et al.*, 2012). In contrast, IL-4 and IL-13 were only associated with greater *ALOX15* expression in human LMs. Incubation with LPS is thus associated with greater expression of *ALOX15B* in both human MDMs (Wuest *et al.*, 2012) and human LMs (the present study). Our data suggest that M1 polarization of human LMs led specifically to the expression of *ALOX15B*, whereas M2 polarization led to the expression of *ALOX15*.

In transfected human HEK-293T cells overexpressing 15-LOXs, (i) 15-LOX-2 was the principal 15-LOX and was associated with significant production of 15-HETE, and (ii) 15-LOX-1-mediated production of 15-HETE was not significant (Gregus *et al.*, 2013). The enzymatic activity of 15-LOX-1 is rapidly auto-inactivated during the conversion of arachidonic acid into 15-HETE, whereas 15-LOX-2 is enzymatically active for a longer period (Kilty *et al.*, 1999). This difference probably explains the greater production of 15-HETE observed after stimulation with LPS but not with IL-4 or IL-13. However, stimulation of permeabilized human alveolar macrophages with IL-4 and exogenous arachidonic acid is associated with greater production of 15-HETE (Levy *et al.*, 1993).

The overexpression of 15-LOX-2 in macrophages derived from human monocyte THP-1 cells was associated with greater CXCL10 and CCL2 production (Danielsson *et al.*, 2008). Conversely, knockdown of *ALOX15B* expression in human MDMs was associated with lower spontaneous production of CXCL8 (Magnusson *et al.*, 2012) and lower hypoxia-induced production of CXCL10, whereas levels of CCL2, CCL5 and CXCL8 did not vary (Danielsson *et al.*, 2008). In the present study in human LMs, inhibition of the two 15-LOX isoenzymes by PD146176 was associated with marked inhibition of the production of LPS-induced M1 chemokines (including CCL2, CCL5, CXCL8 and CXCL10) and the production of IL-4/IL-13-induced M2 cytokines - suggesting the involvement of the 15-LOXs-pathways. Involvement of the 12-LOX-pathway can be ruled out, since human macrophages do not express 12-LOX (the present study and Wuest *et al.*, 2012). Arachidonic acid is a common substrate for lipoxygenases and cyclooxygenases. Hence, inhibition of 15-LOX by PD146176 can cause the shunting of arachidonic acid metabolism to the 5-LOX- and PTGS1/2-pathways, with a potential increase in the levels of associated eicosanoids (e.g. prostaglandins E<sub>2</sub> and I<sub>2</sub>, and cysteinyl leukotrienes). In turn, these eicosanoids can modulate chemokine production in monocytes and macrophages (Hashimoto *et al.*, 2009; Ichiyama *et al.*, 2009; Kuo *et al.*, 2011; Buenestado *et al.*, 2012; Tsai *et al.*, 2014). Furthermore, 15-HETE can be also produced via cyclooxygenase-dependent pathways (Levy *et al.*, 1993). Since (i) human LMs expressed the 5-LOX- and PTGS1/2-pathways, (ii) LPS was primarily associated with greater *PTGS2* expression, and (iii) IL-13 was

associated with lower expression of *PTGS2*, *ALOX5* and *ALOX5AP*, we decided to ascertain the role of the 15-LOX pathways in the LPS- and IL-4/IL-13-induced production of M1 and M2 chemokines by assessing the effect of 15-LOX inhibition by PD146176 after blockade of the 5-LOX- and PTGS1/2-pathways. Our results confirmed that 15-LOX has a regulatory role in the production of M1 chemokines (CCL2, CCL3, CCL4, CXCL1, CXCL8 and CXCL10) and M2 chemokines (CCL13, CCL18 and CCL22).

The 15-LOX pathway is a major metabolic pathway for arachidonic acid in human lung homogenates and airway epithelial cells. In human bronchial epithelial cells, both 15-LOX isoforms are present and are expressed even more strongly in patients with severe asthma (Brown *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2002; Gras *et al.*, 2012; Jakiela *et al.*, 2013; Mabalirajan *et al.*, 2013). Exposure of human bronchial epithelial cells to IL-4 or IL-13 is associated with greater expression of *ALOX15* but not *ALOX15B* (Brown *et al.*, 2001; Jakiela *et al.*, 2013), as observed in human LMs in the present study. In the work on bronchial epithelial cells, the induction of *ALOX15* expression by Th2 cytokines was associated with greater expression of two chemokines (CCL24 and CCL26). In the A549 epithelial alveolar cell line, the expression of chemokines (CCL3, CCL4, CCL5, CCL20, CXCL3, CXCL10, CXCL11, and CX3CL1) was upregulated by 15-LOX-1 overexpression and downregulated by inhibition of 15-LOX-1 activity (Liu *et al.*, 2009). Taken as a whole, these data show that 15-LOXs are involved in the regulation of chemokine expression by both human LMs (present study) and airway epithelial cells.

Conversely, inhibition of 15-LOXs did not alter LPS-induced TNF- $\alpha$  production in human LMs, as previously shown in thioglycollate-elicited peritoneal murine macrophages (Middleton *et al.*, 2006). We and others have previously reported that LPS-induced release of TNF- $\alpha$  was potently inhibited by PGE<sub>2</sub> and PGI<sub>2</sub> (Raychaudhuri *et al.*, 2002; Aronoff *et al.*, 2007; Ratcliffe *et al.*, 2007; Buenestado *et al.*, 2012), and we have previously shown that substantial amounts of PGE<sub>2</sub> and 6-ketoPGF<sub>1 $\alpha$</sub>  accumulated in culture supernatants of human LMs exposed to LPS (Buenestado *et al.*, 2012). Inhibition of prostanoid synthesis with indomethacin not only increases the LPS-induced production of TNF- $\alpha$  (the present study, and as also shown with alveolar macrophages (Hempel *et al.*, 1996)) by eliminating the predominant downregulatory role of prostaglandins but also reveals the inhibitory effect of PD146176 and the role of the 15-LOXs.

Furthermore, our results indicate that inhibition of the 5-LOX pathway had no effect on M1 and M2 chemokine production by human LMs; this fits with similar results in human alveolar macrophages for CXCL8 (Parker *et al.*, 1990) and on human peritoneal macrophages for the pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and IL-6 (Pruimboom *et al.*, 1994).

In conclusion, the *in vitro* polarization of human LMs towards M1 or M2 activation states is associated with greater expression of *ALOX15B* and *ALOX15*, respectively. Specific inhibition of the 15-LOXs was associated with lower production of M1 and M2 chemokines. These results in LMs suggest that the 15-LOX pathways have a role in the pathogenesis of inflammatory lung disorders and thus constitute a potential drug target.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank David Fraser (Biotech Communication SARL, Damery, France) for copy-editing services.

## CONFLICTS OF INTEREST STATEMENT

Any conflict of interest must be declared

**LIST OF REFERENCES**

- Aronoff DM, Peres CM, Serezani CH, Ballinger MN, Carstens JK, Coleman N, *et al.* (2007). Synthetic prostacyclin analogs differentially regulate macrophage function via distinct analog-receptor binding specificities. *J Immunol* 178: 1628-1634.
- Back M, Powell WS, Dahlen SE, Drazen JM, Evans JF, Serhan CN, *et al.* (2014). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. Update on Leukotriene, Lipoxin and Oxoeicosanoid Receptors: IUPHAR Review 7. *Br J Pharmacol*.
- Barnes PJ (2008). Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol* 8: 183-192.
- Benoit M, Desnues B, Mege JL (2008). Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol* 181: 3733-3739.
- Bradding P, Feather IH, Wilson S, Holgate ST, Howarth PH (1995). Cytokine immunoreactivity in seasonal rhinitis: regulation by a topical corticosteroid. *Am J Respir Crit Care Med* 151: 1900-1906.
- Brown CD, Kilty I, Yeadon M, Jenkinson S (2001). Regulation of 15-lipoxygenase isozymes and mucin secretion by cytokines in cultured normal human bronchial epithelial cells. *Inflamm Res* 50: 321-326.
- Buenestado A, Grassin Delyle S, Arnould I, Besnard F, Naline E, Blouquit-Laye S, *et al.* (2010). The role of adenosine receptors in regulating production of tumour necrosis factor-alpha and chemokines by human lung macrophages. *Br J Pharmacol* 159: 1304-1311.
- Buenestado A, Grassin-Delyle S, Guitard F, Naline E, Faisy C, Israel-Biet D, *et al.* (2012). Roflumilast inhibits the release of chemokines and TNF-alpha from human lung macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *Br J Pharmacol* 165: 1877-1890.
- Chaitidis P, O'Donnell V, Kuban RJ, Bermudez-Fajardo A, Ungethuem U, Kuhn H (2005). Gene expression alterations of human peripheral blood monocytes induced by medium-term treatment with the TH2-cytokines interleukin-4 and -13. *Cytokine* 30: 366-377.
- Chu HW, Balzar S, Westcott JY, Trudeau JB, Sun Y, Conrad DJ, *et al.* (2002). Expression and activation of 15-lipoxygenase pathway in severe asthma: relationship to eosinophilic phenotype and collagen deposition. *Clin Exp Allergy* 32: 1558-1565.

Danielsson KN, Rydberg EK, Ingelsten M, Akyurek LM, Jirholt P, Ullstrom C, *et al.* (2008). 15-Lipoxygenase-2 expression in human macrophages induces chemokine secretion and T cell migration. *Atherosclerosis* 199: 34-40.

Dobrian AD, Lieb DC, Cole BK, Taylor-Fishwick DA, Chakrabarti SK, Nadler JL (2011). Functional and pathological roles of the 12- and 15-lipoxygenases. *Progress in lipid research* 50: 115-131.

Gras D, Bourdin A, Vachier I, de Senneville L, Bonnans C, Chanez P (2012). An ex vivo model of severe asthma using reconstituted human bronchial epithelium. *J Allergy Clin Immunol* 129: 1259-1266 e1251.

Gregus AM, Dumlao DS, Wei SC, Norris PC, Catella LC, Meyerstein FG, *et al.* (2013). Systematic analysis of rat 12/15-lipoxygenase enzymes reveals critical role for spinal eLOX3 hepoxilin synthase activity in inflammatory hyperalgesia. *FASEB J* 27: 1939-1949.

Hashimoto K, Ichiyama T, Hasegawa M, Hasegawa S, Matsubara T, Furukawa S (2009). Cysteinyl leukotrienes induce monocyte chemoattractant protein-1 in human monocyte/macrophages via mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappaB pathways. *Int Arch Allergy Immunol* 149: 275-282.

Hempel SL, Monick MM, Hunninghake GW (1996). Effect of hypoxia on release of IL-1 and TNF by human alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 14: 170-176.

Ichiyama T, Hasegawa M, Hashimoto K, Matsushige T, Hirano R, Furukawa S (2009). Cysteinyl leukotrienes induce macrophage inflammatory protein-1 in human monocytes/macrophages. *Int Arch Allergy Immunol* 148: 147-153.

Jakiela B, Gielicz A, Plutecka H, Hubalewska M, Mastalerz L, Bochenek G, *et al.* (2013). Eicosanoid biosynthesis during mucociliary and mucous metaplastic differentiation of bronchial epithelial cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 106: 116-123.

Jayawickreme SP, Gray T, Nettesheim P, Eling T (1999). Regulation of 15-lipoxygenase expression and mucus secretion by IL-4 in human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol* 276: L596-603.

Joshi AD, Oak SR, Hartigan AJ, Finn WG, Kunkel SL, Duffy KE, *et al.* (2010). Interleukin-33 contributes to both M1 and M2 chemokine marker expression in human macrophages. *BMC Immunol* 11: 52.

Kilty I, Logan A, Vickers PJ (1999). Differential characteristics of human 15-lipoxygenase isozymes and a novel splice variant of 15S-lipoxygenase. *Eur J Biochem* 266: 83-93.

Kuhn H, O'Donnell VB (2006). Inflammation and immune regulation by 12/15-lipoxygenases. *Progress in lipid research* 45: 334-356.

Kuo CH, Ko YC, Yang SN, Chu YT, Wang WL, Huang SK, *et al.* (2011). Effects of PGI<sub>2</sub> analogues on Th1- and Th2-related chemokines in monocytes via epigenetic regulation. *Journal of molecular medicine* 89: 29-41.

Levy BD, Serhan CN (2014). Resolution of acute inflammation in the lung. *Annual review of physiology* 76: 467-492.

Levy BD, Romano M, Chapman HA, Reilly JJ, Drazen J, Serhan CN (1993). Human alveolar macrophages have 15-lipoxygenase and generate 15(S)-hydroxy-5,8,11-cis-13-trans-eicosatetraenoic acid and lipoxins. *J Clin Invest* 92: 1572-1579.

Liu C, Xu D, Liu L, Schain F, Brunnstrom A, Bjorkholm M, *et al.* (2009). 15-Lipoxygenase-1 induces expression and release of chemokines in cultured human lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297: L196-203.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> method. *Methods* 25: 402-408.

Lundstrom SL, Yang J, Kallberg HJ, Thunberg S, Gafvelin G, Haeggstrom JZ, *et al.* (2012). Allergic asthmatics show divergent lipid mediator profiles from healthy controls both at baseline and following birch pollen provocation. *PLoS One* 7: e33780.

Mabalirajan U, Rehman R, Ahmad T, Kumar S, Singh S, Leishangthem GD, *et al.* (2013). Linoleic acid metabolite drives severe asthma by causing airway epithelial injury. *Sci Rep* 3: 1349.

Magnusson LU, Lundqvist A, Karlsson MN, Skalen K, Levin M, Wiklund O, *et al.* (2012). Arachidonate 15-lipoxygenase type B knockdown leads to reduced lipid accumulation and inflammation in atherosclerosis. *PLoS One* 7: e43142.

Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 25: 677-686.

Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A (2006). Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J Immunol* 177: 7303-7311.

Menard L, Pilote S, Naccache PH, Laviolette M, Borgeat P (1990). Inhibitory effects of MK-886 on arachidonic acid metabolism in human phagocytes. *Br J Pharmacol* 100: 15-20.



- Middleton MK, Rubinstein T, Pure E (2006). Cellular and molecular mechanisms of the selective regulation of IL-12 production by 12/15-lipoxygenase. *J Immunol* 176: 265-274.
- Ono E, Mita H, Taniguchi M, Higashi N, Hasegawa M, Miyazaki E, *et al.* (2009). Concentration of 14,15-leukotriene C4 (eoxin C4) in bronchoalveolar lavage fluid. *Clin Exp Allergy* 39: 1348-1352.
- Parkar BA, McCormick ME, Foster SJ (1990). Leukotrienes do not regulate interleukin 1 production by activated macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 169: 422-429.
- Pechkovsky DV, Prasse A, Kollert F, Engel KM, Dentler J, Luttmann W, *et al.* (2010). Alternatively activated alveolar macrophages in pulmonary fibrosis-mediator production and intracellular signal transduction. *Clin Immunol* 137: 89-101.
- Profita M, Vignola AM, Sala A, Mirabella A, Siena L, Pace E, *et al.* (1999). Interleukin-4 enhances 15-lipoxygenase activity and incorporation of 15(S)-HETE into cellular phospholipids in cultured pulmonary epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20: 61-68.
- Profita M, Sala A, Riccobono L, Paterno A, Mirabella A, Bonanno A, *et al.* (2000). 15-Lipoxygenase expression and 15(S)-hydroxyeicoisatetraenoic acid release and reincorporation in induced sputum of asthmatic subjects. *J Allergy Clin Immunol* 105: 711-716.
- Pruimboom WM, van Dijk JA, Tak CJ, Garrelds I, Bonta IL, Wilson PJ, *et al.* (1994). Interactions between cytokines and eicosanoids: a study using human peritoneal macrophages. *Immunol Lett* 41: 255-260.
- Ratcliffe MJ, Walding A, Shelton PA, Flaherty A, Dougall IG (2007). Activation of E-prostanoid4 and E-prostanoid2 receptors inhibits TNF-alpha release from human alveolar macrophages. *Eur Respir J* 29: 986-994.
- Raychaudhuri B, Malur A, Bonfield TL, Abraham S, Schilz RJ, Farver CF, *et al.* (2002). The prostacyclin analogue treprostinil blocks NFkappaB nuclear translocation in human alveolar macrophages. *J Biol Chem* 277: 33344-33348.
- Sachs-Olsen C, Sanak M, Lang AM, Gielicz A, Mowinckel P, Lodrup Carlsen KC, *et al.* (2010). Eoxins: a new inflammatory pathway in childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 126: 859-867 e859.
- Sica A, Mantovani A (2012). Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* 122: 787-795.
- Staples KJ, Hinks TS, Ward JA, Gunn V, Smith C, Djukanovic R (2012). Phenotypic characterization of lung macrophages in asthmatic patients: overexpression of CCL17. *J Allergy Clin Immunol* 130: 1404-1412 e1407.

Thomson NC, Chaudhuri R, Spears M, Messow CM, Jelinsky S, Miele G, *et al.* (2014). Arachidonic acid metabolites and enzyme transcripts in asthma are altered by cigarette smoking. *Allergy* 69: 527-536.

Tsai MK, Hsieh CC, Kuo HF, Yang SN, Kuo CH, Huang MY, *et al.* (2014). Effect of prostaglandin I<sub>2</sub> analogs on macrophage inflammatory protein 1alpha in human monocytes via I prostanoïd receptor and cyclic adenosine monophosphate. *J Investig Med* 62: 332-339.

Wuest SJ, Crucet M, Gemperle C, Loretz C, Hersberger M (2012). Expression and regulation of 12/15-lipoxygenases in human primary macrophages. *Atherosclerosis* 225: 121-127.

Zhao J, Maskrey B, Balzar S, Chibana K, Mustovich A, Hu H, *et al.* (2009). Interleukin-13-induced MUC5AC is regulated by 15-lipoxygenase 1 pathway in human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med* 179: 782-790.

Zhao L, Cuff CA, Moss E, Wille U, Cyrus T, Klein EA, *et al.* (2002). Selective interleukin-12 synthesis defect in 12/15-lipoxygenase-deficient macrophages associated with reduced atherosclerosis in a mouse model of familial hypercholesterolemia. *J Biol Chem* 277: 35350-35356.

**Table 1. 15-LOX activity in polarized human LMs**

	<i>Baseline</i>	<i>PD 10<math>\mu</math>M</i>	<i>LPS only</i>	<i>LPS+PD 10<math>\mu</math>M</i>	<i>IL-4 only</i>	<i>IL-4+PD 10<math>\mu</math>M</i>
15-HETE (pg/10 <sup>6</sup> LMs)	176 $\pm$ 47	167 $\pm$ 38	420 $\pm$ 95 ##	191 $\pm$ 15 **	183 $\pm$ 34	222 $\pm$ 39

*Lung macrophages were incubated for 1 hr in the presence or absence of PD146176 prior to the addition of LPS (10 ng.mL<sup>-1</sup>) or IL-4 (10 ng.mL<sup>-1</sup>). 15(S)-HETE levels were determined in the LM culture supernatants collected after 24 hrs of incubation. The data are reported as the mean  $\pm$  SEM of seven independent experiments. # indicates a significant difference relative to the baseline condition (## $p$ <0.01).\* indicates a significant difference relative to the LPS condition (\*\* $p$ < 0.01).*

**Table 2. Inhibitory effect of PD146176 on the LPS-induced release of M1 chemokines in human LMs.**

<i>Cytokines (pg/10<sup>6</sup> LMs)</i>	<i>Baseline</i>	<i>LPS only</i>	<i>PD 1<math>\mu</math>M + LPS</i>	<i>PD 10<math>\mu</math>M + LPS</i>
CCL2	1503 $\pm$ 577	17568 $\pm$ 3492 ##	21050 $\pm$ 4504	9134 $\pm$ 3656 *
CCL3	948 $\pm$ 384	233376 $\pm$ 24885 ###	230714 $\pm$ 27451	164450 $\pm$ 14961 *
CCL4	1668 $\pm$ 167	353261 $\pm$ 42849 ##	319162 $\pm$ 38097	236255 $\pm$ 48500 ***
CXCL1	193 $\pm$ 56	208169 $\pm$ 28678 ###	190022 $\pm$ 21010	95204 $\pm$ 26885 **
CXCL8	12242 $\pm$ 2772	920671 $\pm$ 182020 ##	949280 $\pm$ 162563	491975 $\pm$ 138923 **
CXCL10	0 (LD)	11908 $\pm$ 4621 #	ND	5234 $\pm$ 2442 *

*Lung macrophages were incubated for 1 hr in the presence or absence (the baseline condition) PD146176 (1-10  $\mu$ M) or vehicle before being stimulated with LPS (10 ng.mL<sup>-1</sup>) for 24 hrs. The concentrations of the chemokines in culture supernatants were measured in ELISAs. The data are reported as the mean  $\pm$  SEM of six to ten independent experiments. # indicates a significant difference relative to the baseline condition (<sup>#</sup> $p < 0.05$ ; <sup>##</sup> $p < 0.01$ ; <sup>###</sup> $p < 0.001$ ) and \* indicates a significant difference relative to LPS alone (<sup>\*</sup> $p < 0.05$ ; <sup>\*\*</sup> $p < 0.01$ ; <sup>\*\*\*</sup> $p < 0.001$ ). Data for the vehicle is not shown because 0.1% DMSO had no effect on cytokine production.*

**Table 3. Inhibitory effect of PD146176 on the IL-4- and IL-13-induced release of M2 chemokines in human LMs.**

Cytokines (pg/10 <sup>6</sup> LMs)	Baseline	IL-4 only	With IL-4	
			PD 1 $\mu$ M	PD 10 $\mu$ M
CCL13	38 $\pm$ 11	227 $\pm$ 56 #	250 $\pm$ 78	95 $\pm$ 39**
CCL18	96023 $\pm$ 22410	101703 $\pm$ 16752	99691 $\pm$ 22787	59323 $\pm$ 20166 *
CCL22	1122 $\pm$ 298	4733 $\pm$ 1002 ##	5931 $\pm$ 1217	2271 $\pm$ 630 *
Cytokine	Baseline	IL-13 only	With IL-13	
			PD 1 $\mu$ M	PD 10 $\mu$ M
CCL13	37 $\pm$ 11	561 $\pm$ 141#	402 $\pm$ 169	182 $\pm$ 106 **
CCL18	91678 $\pm$ 23001	112972 $\pm$ 19050	118311 $\pm$ 22022	78962 $\pm$ 22828
CCL22	1122 $\pm$ 298	4748 $\pm$ 1182 ##	5420 $\pm$ 1097	3369 $\pm$ 876 *

Lung macrophages were incubated for 1 hr in the presence or absence (the baseline condition) of PD146176 (1-10  $\mu$ M) or vehicle before being stimulated with (IL-4 10 ng.mL<sup>-1</sup>) or IL-13 (50 ng.mL<sup>-1</sup>) for 24 hrs. The concentrations of chemokines in the culture supernatants were measured in ELISAs. The data are reported as the mean  $\pm$  SEM of five to eight independent experiments. # indicates a significant difference relative to the baseline condition (# $p$ <0.05; ## $p$ <0.01) and \* indicates a significant difference relative to IL-4 or IL-13 (\* $p$ < 0.05; \*\* $p$ < 0.01). Data for the vehicle is not shown because 0.1% DMSO had no effect on cytokine production.

**Table 4. The inhibitory effect of PD146176, indomethacin and MK 886 on the LPS-induced release of TNF- $\alpha$  in human LMs.**

Cytokine (ng per $10^6$ LMs)			+ Indomethacin 1 $\mu$ M		+ MK 886 1 $\mu$ M		+ Indomethacin 1 $\mu$ M + MK 886 1 $\mu$ M	
	LPS	LPS + PD 10 $\mu$ M	LPS	LPS + PD 10 $\mu$ M	LPS	LPS + PD 10 $\mu$ M	LPS	LPS + PD 10 $\mu$ M
TNF- $\alpha$	19.7 $\pm$ 6.2 ##	18.2 $\pm$ 5.5	31.1 $\pm$ 9 ++	18 $\pm$ 5.5 **	17.3 $\pm$ 5.6	20.1 $\pm$ 6.5	31.5 $\pm$ 9.3 ++	19.2 $\pm$ 4.5 **

Lung macrophages were exposed to medium alone (the baseline condition) or medium supplemented with indomethacin (1  $\mu$ M) or MK 886 (1  $\mu$ M) or vehicles for 30 min before being pre-incubated for 1 hr with PD146176 (10  $\mu$ M) or vehicle prior to stimulation with LPS (10 ng.mL<sup>-1</sup>). Levels of TNF- $\alpha$  in the culture supernatant were determined after 24 hrs of incubation. Data are reported as the mean  $\pm$  SEM of four independent experiments. # indicates a significant difference relative to the baseline condition ( $0.2 \pm 0.05$  ng per  $10^6$  LMs ( $^{##}p < 0.01$ ), + indicates a significant difference relative to LPS alone ( $^{++}p < 0.01$ ) and \* indicates a significant difference relative to the corresponding controls ( $^{**}p < 0.01$ ). Data for the vehicle is not shown because 0.12% DMSO had no effect on cytokine production.

**FIGURE LEGENDS**

**Figure 1. mRNA expression of *ALOX15*, *ALOX15B*, *ALOX5*, *ALOX5AP*, *PTGS1* and *PTGS2* in polarized human LMs.** Lung macrophages were incubated with LPS ( $10 \text{ ng.mL}^{-1}$ ), IL-4 ( $10 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) or IL-13 ( $50 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) for 24 hrs. Levels of *ALOX15*, *ALOX15B*, *ALOX5*, *ALOX5AP*, *PTGS1* and *PTGS2* transcripts were determined by RT-qPCR and normalized against the expression of a housekeeping gene (*HPRT1*). Data correspond to the mean  $\pm$  SEM of three to six independent experiments. \* indicates a significant difference relative to the baseline condition (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

**Figure 2. The roles of indomethacin and MK 886 in the suppression of LPS-induced M1 chemokine release from human LMs by PD146176.** Human LMs were exposed to medium alone (the baseline condition) or medium supplemented with indomethacin ( $1 \mu\text{M}$ ), MK 886 ( $1 \mu\text{M}$ ) or vehicles for 30 min before being pre-incubated for 1 hrs with PD146176 ( $10 \mu\text{M}$ ) or vehicle. The cells were then stimulated with LPS ( $10 \text{ ng.mL}^{-1}$ ). M1 chemokine release was determined in culture supernatants after 24 hrs of incubation time. Data are reported as the mean  $\pm$  SEM of five to seven independent experiments. \* indicates a significant difference relative to the corresponding controls (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ) and + indicates a significant difference relative to LPS (+ $p < 0.05$ , ++ $p < 0.01$ ). Data for the vehicle is not shown because 0.12% DMSO had no effect on cytokine production.

**Figure 3. The roles of indomethacin and MK 886 in the suppression of IL-4- or IL-13-induced M2 chemokine release from human LMs by PD146176.** Human LMs were exposed to medium alone (the baseline condition) or medium supplemented with indomethacin ( $1 \mu\text{M}$ ), MK 886 ( $1 \mu\text{M}$ ) or vehicles for 30 min before being pre-incubated for 1 hrs with PD146176 ( $10 \mu\text{M}$ ) or vehicle. The cells were then stimulated with IL-4 ( $10 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) or IL-13 ( $50 \text{ ng.mL}^{-1}$ ). M2 chemokine release was determined in culture supernatants collected after 24 hrs of incubation time. Data are reported as the mean  $\pm$  SEM of five to seven independent experiments. \* indicates a significant difference relative to the corresponding controls (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ). Data for the vehicle is not shown because 0.12% DMSO had no effect on cytokine production.

FIGURES

Figure 1.

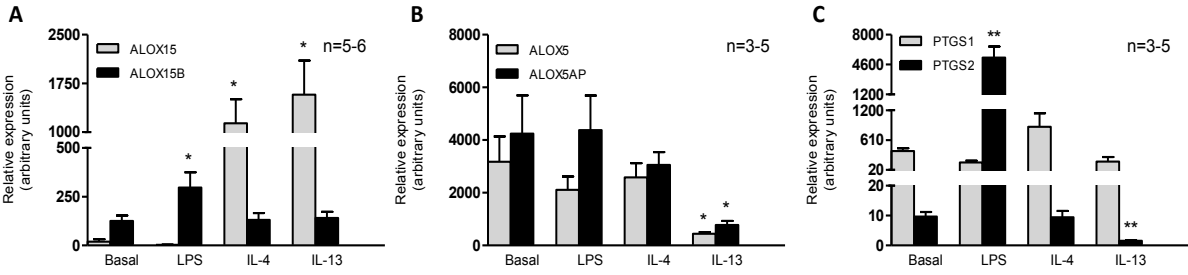




Figure 2.

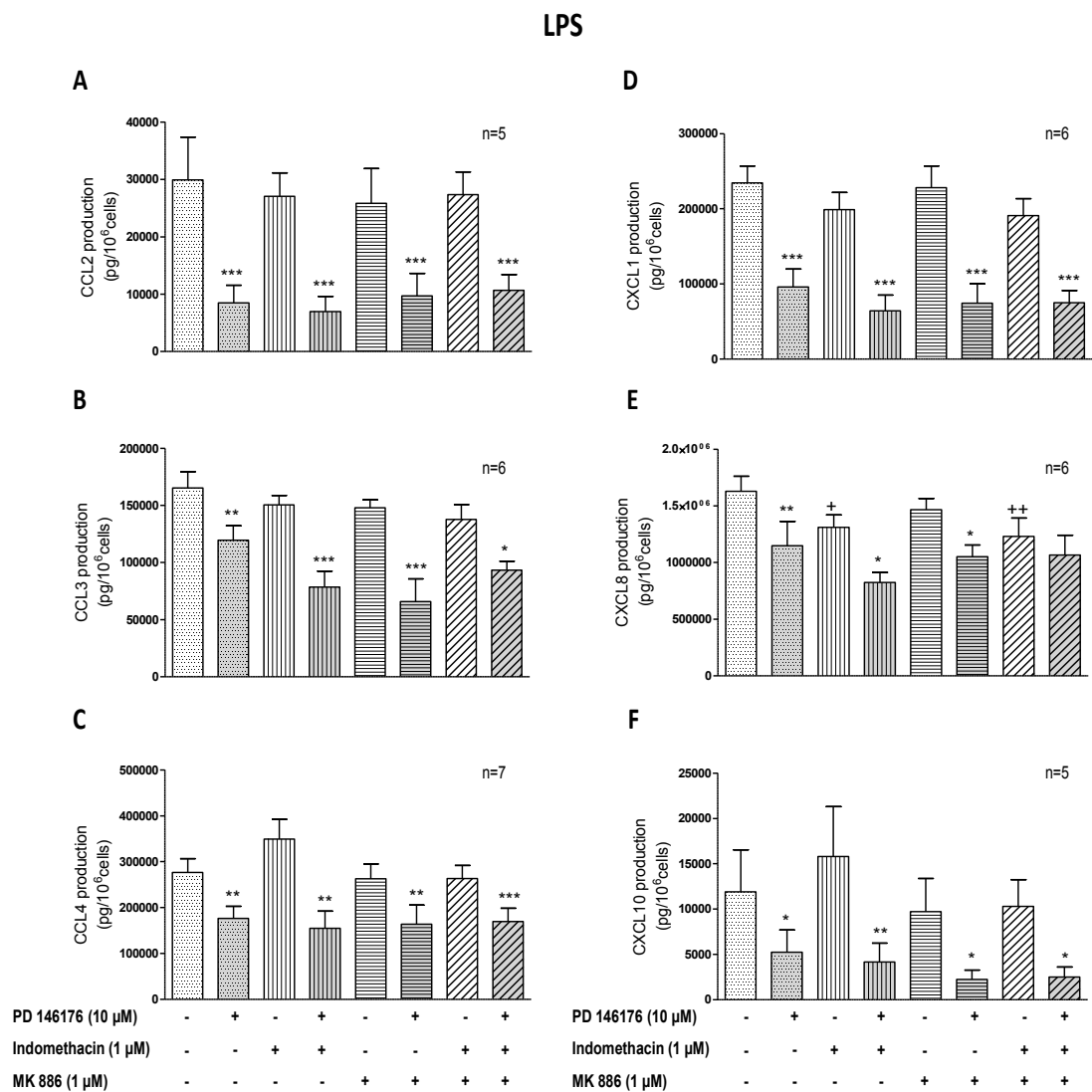
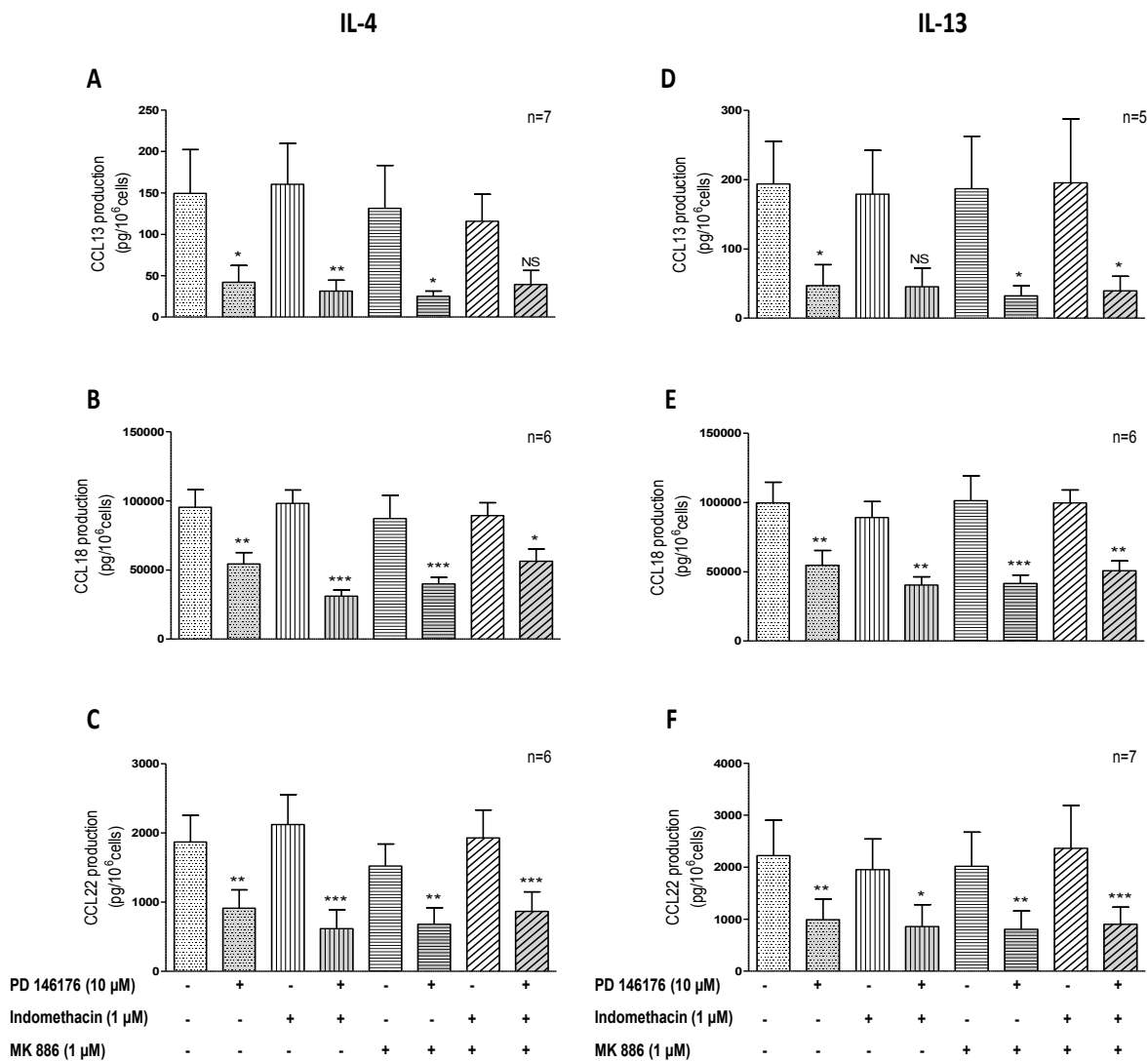


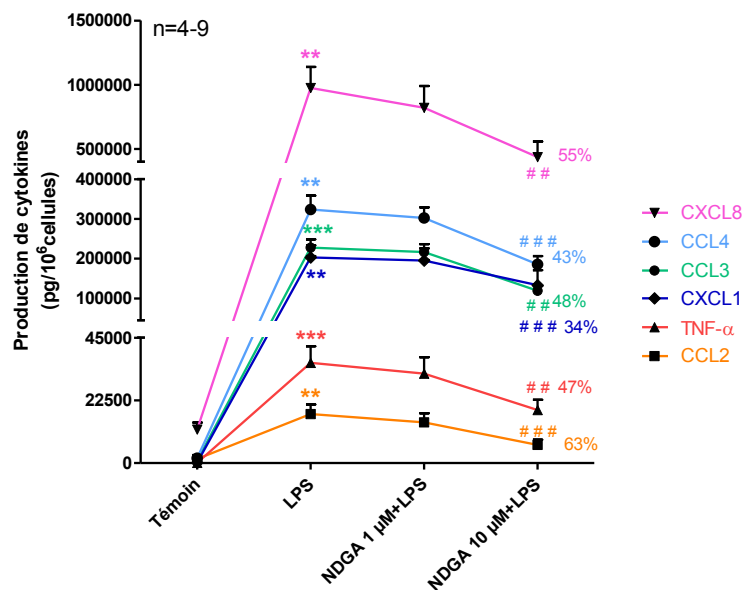
Figure 3.



## Résultats complémentaires

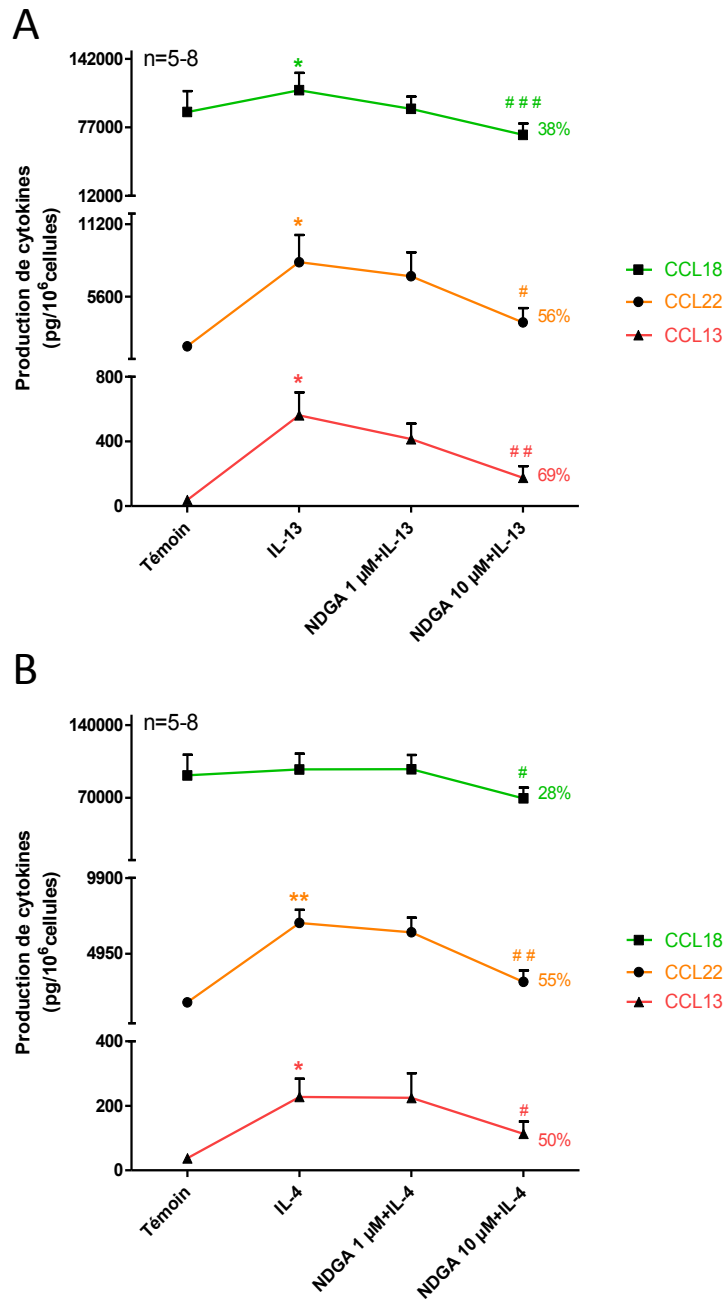
### Effet du NDGA, un inhibiteur des 15-lipoxygénases, sur la polarisation M1/M2a des macrophages pulmonaires

Nous avons évalué les effets d'un second inhibiteur des 15-lipoxygénases, le NDGA. Ce dernier est également un inhibiteur de la 12-lipoxygénase, mais qui n'est pas retrouvée exprimée par les macrophages pulmonaires humains. Les résultats montrent que le LPS induit une augmentation de la production des cytokines de type M1 (CCL2, CCL3, CCL4, CXCL1, CXCL8 et TNF- $\alpha$ ) qui est significativement inhibée en présence de NDGA à la plus forte concentration de 10  $\mu$ M (**Figure 18**). De même que la production des chimiokines M2a (CCL13, CCL18 et CCL22) induite par l'IL-4 et d'IL-13 est inhibée en présence de NDGA 10  $\mu$ M dans les macrophages pulmonaires humains (**Figure 19**).



**Figure 18 : Effet du NDGA sur la production des cytokines de type M1 induite par le LPS dans les macrophages pulmonaires humains**

Les macrophages pulmonaires ont été exposés pendant 1h au NDGA 1  $\mu$ M et 10  $\mu$ M puis stimulés par le LPS (10 ng.mL<sup>-1</sup>) pendant 24h. Le dosage des cytokines dans les surnageants a été effectué par ELISA. Les données sont représentées en pg pour 10<sup>6</sup> cellules. Les résultats sont représentés sous forme de moyenne  $\pm$  s.e.m de 4 à 9 expériences indépendantes et les statistiques ont été effectuées par la méthode ANOVA suivie du post-test de Bonferroni. \* indique une différence significative avec le témoin (\*\*p<0.01 ; \*\*\*p<0.005) et # indique une différence significative avec le LPS seul (#p<0.01 ; ##p<0.005). Les valeurs en pourcentage représentent le pourcentage d'inhibition de la production des cytokines M1 à la concentration la plus forte de NDGA 10  $\mu$ M par rapport au témoin LPS.



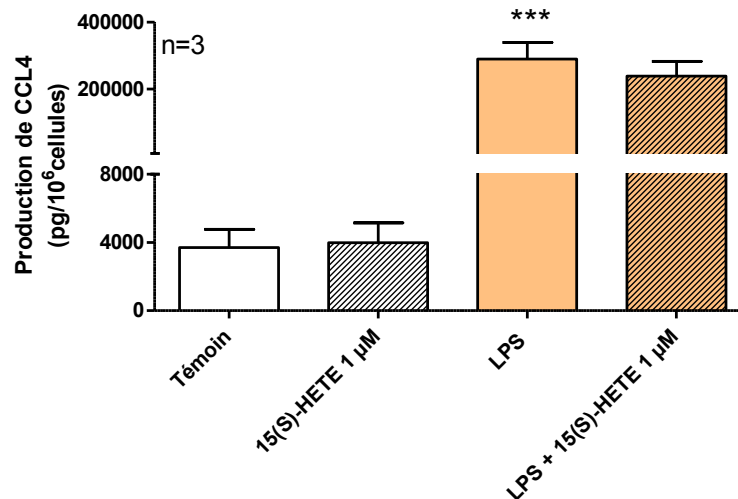
**Figure 19 : Effet du NDGA sur la production des cytokines de type M2a induite par l'IL-4 (A) et l'IL-13 (B) dans les macrophages pulmonaires humains**

Les macrophages pulmonaires ont été exposés pendant 1h au NDGA 1  $\mu\text{M}$  et 10  $\mu\text{M}$  puis stimulés par l'IL-4 (10  $\text{ng.mL}^{-1}$ ) et l'IL-13 (50  $\text{ng.mL}^{-1}$ ) pendant 24h. Le dosage des cytokines dans les surnageants de macrophages a été effectué par ELISA. Les données sont représentées en pg pour  $10^6$  cellules. Les résultats sont représentés sous forme de moyenne  $\pm$  s.e.m de 5 à 8 expériences indépendantes et les statistiques ont été effectuées par la méthode ANOVA suivie du post-test de Bonferroni. \* indique une différence significative avec le contrôle (\* $p < 0.05$  ; \*\* $p < 0.01$ ) et # indique une différence significative avec le l'IL-4 ou l'IL-13 (# $p < 0.05$  ; ## $p < 0.01$  ; ### $p < 0.005$ ). Les valeurs en pourcentage représentent le pourcentage d'inhibition de la production des cytokines M2 à la concentration la plus forte de NDGA 10  $\mu\text{M}$  par rapport au témoin IL-4 ou IL-13.

## Rôle de chaque isoenzyme dans la polarisation des macrophages

Afin de déterminer le rôle de chaque isoenzyme, 15-LOX-1 et 15-LOX-2, dans la polarisation des macrophages pulmonaires, nous avons cherché à inhiber de manière spécifique ces deux isoenzymes afin d'évaluer leur rôle dans la modulation de la production des cytokines M1/M2 par les macrophages pulmonaires. L'absence d'inhibiteur enzymatique spécifique de la 15-LOX-1 et de la 15-LOX-2 nous a conduits à réaliser des études basées sur la transfection de siRNA dirigés spécifiquement contre le gène 15-LOX-1 ou 15-LOX-2. Cependant, les expériences de transfusions de siRNA se sont révélées inefficaces sur l'expression de chaque gène d'intérêt (*ALOX15* et *ALOX15B*) dans les macrophages pulmonaires humains (Données non présentées).

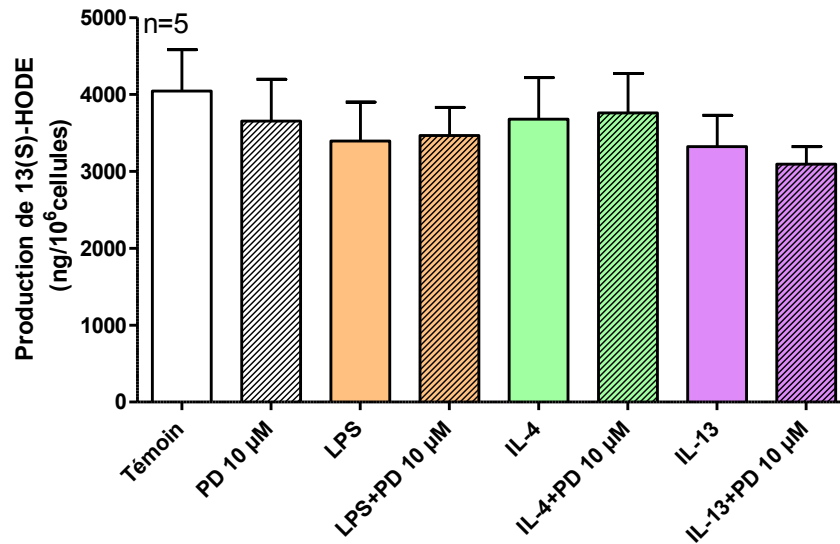
Nous nous sommes ensuite intéressés au mécanisme d'action des 15-lipoxygénases sur l'inhibition de la production des cytokines. Les 15-lipoxygénase produisent de nombreux métabolites aux actions diverses. Les résultats de l'article 2 montrent que la stimulation des macrophages par le LPS augmente la production de 15(S)-HETE par les macrophages qui est inhibée en présence de PD 146176 (10  $\mu$ M). Ces résultats laissent supposer que la 15(S)-HETE pourrait jouer un rôle dans la production des cytokines de type M1 induite par le LPS. Ainsi, il nous a paru intéressant d'évaluer le rôle direct de la 15(S)-HETE sur la production des cytokines de type M1 dans les macrophages pulmonaires. L'exposition à 1  $\mu$ M de 15(S)-HETE pendant 1h, puis au LPS pendant 24h montre que si le LPS augmente la production de CCL4, l'ajout de 15(S)-HETE ne module pas la production de cette chimiokine (**Figure 20**).



**Figure 20 : Effet de la 15(S)-HETE sur la production de CCL4 dans les macrophages pulmonaires humains stimulés par le LPS**

Les macrophages pulmonaires ont été exposés pendant 1h à la 15(S)-HETE (1 μM) puis stimulés par le LPS (10 ng.mL<sup>-1</sup>) pendant 24h. Le dosage des cytokines dans les surnageants de macrophages a été effectué par ELISA. Les données sont représentées en pg pour 10<sup>6</sup> cellules. Les résultats sont représentés sous forme de moyenne ± s.e.m de 3 expériences indépendantes et les statistiques ont été effectuées par la méthode ANOVA suivie du post-test de Bonferroni. \* indique une différence significative avec le témoin (\*\*\*)p<0.001).

L'absence de production de 15(S)-HETE par les macrophages pulmonaires humains stimulés par l'IL-4 peut s'expliquer par la courte demi-vie biologique de la 15-LOX-1 mais peut aussi correspondre à la synthèse d'autres métabolites. En effet, la littérature décrit que la 15-LOX-1 produit du 13(S)-HODE à partir du catabolisme de l'acide linoléique (Kuhn *et al.*, 1993; Kilty *et al.*, 1999), impliqué dans des processus pro-inflammatoires (Natarajan *et al.*, 2001; Dobrian *et al.*, 2011). Cependant, nos résultats montrent que si les macrophages pulmonaires produisent de la 13(S)-HODE, la polarisation M1 par le LPS et surtout M2a par l'IL-4 et l'IL-13 ne module pas sa production (**Figure 21**).



**Figure 21 : Dosage de la 13(S)-HODE dans les surnageants de macrophages pulmonaires humains**

Les macrophages pulmonaires ont été exposés ou non pendant 1h au PD 146176 ( $10 \mu\text{M}$ ) puis stimulés par le LPS ( $10 \text{ ng.mL}^{-1}$ ), l'IL-4 ( $10 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) et l'IL-13 ( $50 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) pendant 24h. Le dosage de la 13(S)-HODE dans les surnageants de macrophages a été effectué par EIA. Les données sont représentées en ng pour  $10^6$  cellules. Les résultats sont représentés sous forme de moyenne  $\pm$  s.e.m de 5 expériences indépendantes.

## Discussion

Nos travaux ont montré que la polarisation M1 et M2a des macrophages pulmonaires humains régule différemment l'expression des deux isoformes de la 15-lipoxygénase. Nous avons mis en évidence que les deux isoformes de la 15-lipoxygénase sont exprimés par les macrophages pulmonaires humains. La polarisation M1 des macrophages par le LPS augmente l'expression de la 15-LOX-2 alors que la polarisation M2a des macrophages par l'IL-4 et l'IL-13 augmente l'expression de la 15-LOX-1. L'inhibition spécifique des deux isoformes par le PD 146176, un inhibiteur non sélectif des deux isoformes, a montré une diminution significative de la production des cytokines M1 pro-inflammatoires (CCL2, CCL3, CCL4, CXCL1, CXCL8 et CXCL10) induite par le LPS et des cytokines M2a immunorégulatrices (CCL13, CCL18, CCL22) induite par l'IL4 et l'IL-13. Cette inhibition spécifique de la production des cytokines par les 15-lipoxygénases a été confirmée par l'utilisation d'inhibiteurs des cyclooxygénases et des 5-lipoxygénases. Nos résultats ont également montré que le LPS augmente la production de 15(S)-HETE qui est inhibée en présence du PD146176, laissant suggérer un rôle régulateur de ce métabolite dans la production des cytokines M1 *via* la 15-LOX-2.

Cette démonstration de la régulation de la production des cytokines M1/M2a par les 15-lipoxygénases a été renforcée par l'utilisation d'un second inhibiteur, le NDGA. Nos résultats ont montré que le NDGA inhibe la production des cytokines M1 induite par le LPS (TNF- $\alpha$ , CCL2, CCL3, CCL4, CXCL1, CXCL8) et des cytokines M2a induite par l'IL-4 et l'IL-13 (CCL13, CCL18, CCL22). Cette inhibition de la production des cytokines est spécifique des 15-lipoxygénases et ne peut impliquer la voie des 12-lipoxygénases car les macrophages pulmonaires humains n'expriment pas cette enzyme contrairement aux macrophages dérivés de monocytes humains (Wuest *et al.*, 2012).

L'étude du rôle spécifique de chaque isoforme dans la régulation de la production des cytokines M1 et M2a n'a pu aboutir. En effet, par manque d'outils pharmacologique adaptés comme des inhibiteurs spécifiques de chaque isoformes, nous avons utilisé une méthode de transfection de siARN par nucléofection afin d'inhiber de manière spécifique l'expression du gène codant pour la 15-LOX-1 (*ALOX15*) et la 15-LOX-2 (*ALOX15B*). Malheureusement, la transfection des macrophages pulmonaires n'a pas abouti à une inhibition de l'expression des gènes cibles. Cette inefficacité de la transfection pourrait résulter d'une dégradation du siRNA *via* le processus de phagocytose des macrophages. Cependant, afin de comprendre par quels mécanismes, ces deux isoformes régulent la production des cytokines M1 et M2a, nous avons



étudié le rôle de leurs métabolites respectifs. Nous avons montré au sein de l'article 2 que la production de 15(S)-HETE est augmentée en présence de LPS et diminuée en présence du PD 146176 dans les macrophages pulmonaires humains polarisés M1. Cependant, l'apport exogène de 15(S)-HETE n'a pas montré de modulation de la production des cytokines de type M1 par la 15(S)-HETE. Des résultats similaires ont été obtenus dans une lignée de cellules épithéliales A549 (Liu *et al.*, 2009). Ces observations suggèrent que d'autres intermédiaires pourraient participer à la régulation de la production des cytokines M1. Dans un modèle de microgliocytes murins, l'inhibition de la 15-lipoxygénase par le PD 146176 augmente l'expression de PPAR $\beta/\delta$  qui est corrélée à une diminution des cytokines pro-inflammatoires *via* l'inhibition du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Xu *et al.*, 2013a). Dans les macrophages alvéolaires murins, l'induction de l'expression de PPAR $\beta/\delta$  inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IL-6) (Wang *et al.*, 2014). Ainsi, les 15-lipoxygénases pourraient agir sur l'expression des PPAR pour réguler la production des cytokines.

Dans la polarisation M2a des macrophages pulmonaires, aucune modulation de la production de 15(S)-HETE n'a été observée, suggérant que seule la 15-LOX-2 est impliquée dans la production de ce métabolite. En effet, les travaux de Gregus *et al.*, 2013, montrent que la 15(S)-HETE est majoritairement produite par la 15-LOX-2 (Gregus *et al.*, 2013). L'absence de régulation de la production de 15(S)-HETE par l'IL-4 pourrait s'expliquer par le fait que la 15-LOX-1 serait essentiellement impliquée dans la production d'un autre métabolite, la 13(S)-HODE à partir de l'acide linoléique (Kuhn *et al.*, 1993). Ainsi, nous avons dosé la production de 13(S)-HODE dans les macrophages pulmonaires humains polarisés M1 par le LPS et M2a par l'IL-4 et l'IL-13. Nos résultats ont montré que les macrophages pulmonaires humains produisent de la 13(S)-HODE mais aucune variation de sa production n'est observée au cours de la polarisation M1/M2a de ces cellules. L'activité enzymatique de la 15-LOX-1 est rapidement inactivée comparée à celle de la 15-lipoxygénase-2 (Kilty *et al.*, 1999). Ces observations peuvent contribuer à expliquer l'absence de production de 15(S)-HETE et de 13(S)-HODE associée à une augmentation de l'expression de la 15-LOX-1.

Dans la littérature, la 15-lipoxygénase agirait au niveau transcriptionnel (Liu *et al.*, 2009). Afin de déterminer si la modulation de la production des cytokines dans les macrophages pulmonaires humains est un phénomène transcriptionnel, nous avons regardé par RT-qPCR, le niveau d'expression des cytokines M1 et M2a en présence du PD 146176 dans les macrophages pulmonaires stimulés par le LPS et l'IL-4 pendant 24 heures. Les résultats obtenus sur cinq expériences indépendantes n'ont pas montré de modulation de l'expression

des transcrits cytokiniques M1/M2 (Données non présentées). Ces résultats suggèrent que les effets régulateurs du PD 146176 sur la production des cytokines M1 et M2a se situe au niveau post-transcriptionnel ou que l'étude des transcrits à 24 heures n'a pas permis de révéler l'effet transcriptionnel attendu. Il serait donc pertinent de regarder les effets du PD 146176 sur les transcrits des cytokines à un temps plus court que 24 heures d'incubation.

## *Article n°3*

### **The role of $\alpha 7$ nicotinic receptor in the polarization of human lung macrophages**

C Abrial,<sup>1,2</sup> S Grassin-Delyle,<sup>1,2</sup> H Salvator,<sup>1,2</sup> M Brolo,<sup>1</sup> A Buenestado,<sup>1,2</sup> E Naline,<sup>1,2</sup> P Devillier<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Pharmacologie UPRES EA220, Hôpital Foch, Suresnes, France

<sup>2</sup>Université Versailles Saint Quentin en Yvelines, UFR Sciences de la santé, Saint Quentin en Yvelines, France

**Corresponding author:** P. Devillier, Laboratoire de Pharmacologie UPRES EA220, Hôpital Foch, 11 rue Guillaume Lenoir, 92150 Suresnes, France. Tel: +33.1.46.25.27.91, Fax: +33.1.46.25.24.22. E-mail: p.devillier@hopital-foch.org

## **Introduction**

La polarisation des macrophages en phénotype M1 ou M2a est un processus transitoire et très complexe. Un déséquilibre de la balance M1/M2 peut participer au développement de certaines pathologies infectieuses et pulmonaires. L'étude des voies de régulation de la polarisation des macrophages est donc importante pour mieux comprendre les mécanismes qui pourraient être impliqués dans la dérégulation de la polarisation des macrophages.

Des travaux présentés en 2010 au congrès de l'*American Thoracic Society* (ATS) par Wongtrakool *et al.*, ont montré que les macrophages pulmonaires de souris exprimaient des marqueurs de polarisation M2 après 24h et 48h d'exposition à la nicotine (Wongtrakool *et al.*, 2010). Dans la polarisation lymphocytaire, la nicotine, agoniste des récepteurs nicotiques  $\alpha 4\beta 2$  et  $\alpha 7$  diminue la polarisation des lymphocytes Th1 et Th17 au profit d'une augmentation des lymphocytes Th2 (Nizri *et al.*, 2009). La fumée de cigarette est composée de plus de 4000 substances dont la nicotine, principale alcaloïde du tabac, qui interagit *via* les récepteurs cholinergiques. La nicotine interagit avec les récepteurs nicotiques exprimés dans les tissus et organes périphériques, et contribue à la suppression des réponses immunitaires (Sopori *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2003; Razani-Boroujerdi *et al.*, 2004). Différents travaux ont été consacrés au rôle du système cholinergique non neuronal dans la composante anti-inflammatoire. Les travaux de Borovikova *et al.*, 2000 ont montré que ce système cholinergique non neuronal diminue la production de cytokines pro-inflammatoires dans les macrophages dérivés de monocytes humains (Borovikova *et al.*, 2000). *In vivo*, ces effets anti-inflammatoires du système cholinergique sont principalement médiés par l'acétylcholine (Borovikova *et al.*, 2000). Des études ont montré que cette composante anti-inflammatoire du système cholinergique implique la sous-unité  $\alpha 7$  du récepteur nicotique (Wang *et al.*, 2003; Kawashima *et al.*, 2012). En effet, dans divers modèles cellulaires (monocytes, macrophages dérivés de monocytes humains, lignée cellulaire de macrophages et macrophages murins) la stimulation du récepteur nicotique  $\alpha 7$  induit une diminution de la production de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18 (Borovikova *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2003; Rosas-Ballina *et al.*, 2009; Chernyavsky *et al.*, 2010; Kox *et al.*, 2011a).

Ces observations suggèrent que les récepteurs nicotiques  $\alpha 7$  pourraient moduler la polarisation des macrophages pulmonaires humains. Ainsi, l'objectif de notre étude a été dans un premier temps de déterminer si les macrophages pulmonaires humains expriment les récepteurs nicotiques de type  $\alpha 7$  puis d'évaluer dans un second temps le rôle de ces

récepteurs dans la régulation de la polarisation M1/M2a des macrophages pulmonaires humains.

## **The role of $\alpha 7$ nicotinic receptor in the polarization of human lung macrophages**

C Abrial,<sup>1,2</sup> S Grassin-Delyle,<sup>1,2</sup> H Salvator,<sup>1,2</sup> M Brollo,<sup>1</sup> A Buenestado,<sup>1,2</sup> E Naline,<sup>1,2</sup>

P Devillier<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Pharmacologie UPRES EA220, Hôpital Foch, Suresnes, France

<sup>2</sup>Université Versailles Saint Quentin en Yvelines, UFR Sciences de la santé, Saint Quentin en Yvelines, France

**Corresponding author:** P. Devillier, Laboratoire de Pharmacologie UPRES EA220, Hôpital Foch, 11 rue Guillaume Lenoir, 92150 Suresnes, France. Tel: +33.1.46.25.27.91, Fax: +33.1.46.25.24.22. E-mail: p.devillier@hopital-foch.org

### **Authorship contribution and statement**

- CA, HS and MB prepared the lung macrophages, carried out immunoassay and performed PCR assay
- EN provided the human tissues and were also involved in preparation of the lung macrophages
- CA and SGD analyzed the results, prepared the figures, performed the statistical analysis and drafted the manuscript
- PD and SGD conceived the study, participated in its design, managed the work in the laboratory, analyzed the results, and drafted the manuscript

## ABSTRACT

**Background and purpose.** The existence and the role of the human “cholinergic anti-inflammatory pathway” in the regulation of cytokine production have been previously demonstrated in monocyte-derived macrophages. The current study was performed to investigate the expression of  $\alpha 7$  nicotinic receptor ( $\alpha 7$ nAChR) and their regulating roles in the polarization of human lung macrophages in response to LPS and to the Th2 cytokines IL-4/IL-13.

**Experimental approach.** Lung macrophages (LM) were isolated from resected human lungs, and incubated with nicotine, GTS-21, 4OH-GTS-21, EVP-6124 or vehicle and stimulated with LPS (10 ng.mL<sup>-1</sup>), IL-4 (10 ng.mL<sup>-1</sup>) or IL-13 (50 ng.mL<sup>-1</sup>) during 24 hrs. Transcript expression of  $\alpha 7$ nAChR,  $\alpha 4$ nAChR and M1/M2 cytokines was assessed by real-time-PCR. M1-type (TNF- $\alpha$ , CCL2, CCL3, CCL4, CXCL1 and CXCL8) as well as M2-type (CCL13, CCL18, CCL22) cytokines were also quantified in culture supernatants by immunoassay.

**Key results.** Expression of nicotinic  $\alpha 7$  receptors was found in unstimulated LM. GTS-21 and 4OH-GTS-21 reduced M1- and M2-cytokines, at both the transcriptional and protein level. GTS-21, 4OH-GTS-21 and EVP-6124 also decreased the LPS-stimulated release of TNF- $\alpha$ , CCL2, CCL3, CCL4, CXCL1 and CXCL8 as well as the IL-13-induced release of CCL13, CCL18 and CCL22. Contrary to these results, nicotine was devoid of any effect in LM. The effect of GTS-21 and EVP-6124 was not reversed by the specific antagonist  $\alpha 7$  nicotinic receptor,  $\alpha$ -bungarotoxine. Conversely, the specific  $\alpha 7$ nAChR antagonist,  $\alpha$ -bungarotoxine, caused an increase in the cytokine production in unstimulated LM.

**Conclusions and Implications.** Stimulation of  $\alpha 7$ nAChR has a profound anti-inflammatory effect in LM stimulated by LPS and IL-13 and may have therapeutic perspective for the treatment of lung inflammatory diseases.

**Keys Words.**  $\alpha 7$  nicotinic receptor, lung macrophages, cytokines, macrophages polarization, nicotine, GTS-21, EVP-6124.

**Abbreviations.**  $\alpha$ -BTX, alpha-bungarotoxine; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; DMSO, dimethylsulfoxide; FCS, fetal calf serum; IL, Interleukin; INF- $\gamma$ , Interferon-  $\gamma$ ; LPS, lipopolysaccharide; MDM, monocyte-derived macrophages; nAChR, nicotinic acetylcholine receptor; PCR, polymerase chain reaction, RT-qPCR, reverse transcriptase-quantitative polymerase chain reaction; RPMI, rRoswell park memorial institute; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ .

## INTRODUCTION

In the last few years, it became evident that the cholinergic nervous system plays an important role in limiting inflammatory responses and called “the cholinergic anti-inflammatory pathway” (Tracey, 2002). The role of this cholinergic anti-inflammatory pathway in the regulation of the inflammatory response have been well established since the initial observation by Borovikova *et al.* who showed that the activation of this pathway decreases the pro-inflammatory cytokines production by human monocytes derived-macrophages or by the liver in an *in vivo* model in rat (Borovikova *et al.*, 2000; Vukelic *et al.*, 2013). Many study established that the release of endogenous acetylcholine is the principal mediator of the anti-inflammatory effects of vagus nerve stimulation. In mice and rats, vagotomy induces an increased sensitivity to endotoxin resulting in a significant higher TNF- $\alpha$  production (Borovikova *et al.*, 2000). Recent research has demonstrated that the  $\alpha 7$  subunit of  $\alpha 7$ nAChRs is an important component of the mechanism orchestrates by the cholinergic anti-inflammatory pathway (Wang *et al.*, 2003a).

Nicotinic acetylcholine receptors are a family of ligand-gated pentameric ion channels. In human, 16 different subunits have been identified ( $\alpha 1-7$ ,  $\alpha 9-10$ ,  $\beta 1-4$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ ) and form five identical subunit (homopentameres) or different subunits (heteropentameres). The homopentamer  $\alpha 7$ nAChRs are encoded by the *CHRNA7* gene and are expressed in the nervous system and in immune cells such as macrophages (Khan *et al.*, 2012b). Cholinergic  $\alpha 7$  nicotinic receptors became a pharmacological target of interest for the regulation of inflammation and a range of selective  $\alpha 7$  cholinergic agonists have been synthesized and evaluated in different preclinical models or in clinical trials in humans. In cells such as monocytes, monocytes-derived macrophages or macrophages-like cells, stimulation of  $\alpha 7$ nAChRs may suppress the production of pro-inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  or IL-6 (Borovikova *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2003a; Rosas-Ballina *et al.*, 2009; Chernyavsky *et al.*, 2010). Cholinergic  $\alpha 7$  nicotinic receptor may represent an essential regulator of inflammation and consequently more selective  $\alpha 7$  cholinergic agonists were developed and used in various study. Among them, GTS-21 [3-(2, 4-dimethoxybenzylidene)-anabaseine, also known as DMBX-anabaseine, is a  $\alpha 7$  selective partial agonist and primarily developed for the psychiatric disorders (Alzheimer’s or schizophrenia’s diseases) as well as EVP-6124, a new  $\alpha 7$  selective partial agonist (Prickaerts *et al.*, 2012). However, *in vitro* studies have shown that the stimulation of  $\alpha 7$ nAChRs with GTS-21 induced a dose-dependent inhibition of pro-inflammatory but not anti-inflammatory cytokines in human monocytes, peripheral blood



mononuclear cell, whole blood and murine macrophages (Giebelen *et al.*, 2007; Kox *et al.*, 2009; Rosas-Ballina *et al.*, 2009; Khan *et al.*, 2012a). Besides, *in vivo* study of rodent models of endotoxemia, severe sepsis or acute lung injury, GTS-21 also inhibited the production of pro-inflammatory cytokines by activating  $\alpha 7$ nAChRs (Pavlov *et al.*, 2007; Kox *et al.*, 2011b; Vukelic *et al.*, 2013).

The role of macrophages in inflammation is well established, particularly in the lung where these cells orchestrate the inflammatory reaction through the release of chemokines and cytokines (Barnes, 2008a). Macrophages are an essential regulator of innate and adaptive immunity and play a central role in inflammation, host defence and tissue homeostasis. In response to environment signals, macrophages exhibit a phenotypic polarity M1 or M2 which mirrors the Th1 or Th2 polarization. The two distinct M1 and M2 macrophages activation states have now been described and reviewed on several occasions (Mantovani *et al.*, 2004; Martinez *et al.*, 2008; Sica *et al.*, 2012). Following stimulation with IFN- $\gamma$  or bacterial component such as lipopolysaccharide (LPS) macrophage undergo M1 or classically activated macrophages and produce high amounts of pro-inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  or IL-12 (Mantovani *et al.*, 2004; Benoit *et al.*, 2008). M1 macrophages are a pro-inflammatory phenotype characterized by enhanced expression of pro-inflammatory cytokines/chemokines, increase production of reactive oxygen species and nitric oxide which have been involved in microbial clearance and tissues damages (Mantovani *et al.*, 2004; Benoit *et al.*, 2008). In contrast, M2 macrophages, also called alternatively activated macrophages, are triggered by the two canonical Th2 cytokines such as IL-4 or IL-13 and produce immunoregulatory cytokines, IL-10, TGF- $\beta$  and chemokines such as CCL17 (TARC), CCL18 (PARC), CCL22 (MDC), CCL24 (Eotaxin-2) (Mantovani *et al.*, 2004; Sica *et al.*, 2012). M2 macrophages are associated to the dampening inflammation, immunoregulation and promotion of tissue remodeling.

As there is a body of evidence in the literature that  $\alpha 7$ nAChRs is able to modulate the production of cytokines in animal or human tissues, the objectives of the present study were to investigate the role of  $\alpha 7$ nAChRs in lung macrophages polarization. We thus sought to determine the expression of nicotinic  $\alpha 7$  receptors in human lung macrophages (LM), and to assess their role in the production of M1- or M2-type cytokines.

## METHODS

### Materials

GTS-21 (3-(2, 4-dimethoxybenzylidene)-anabaseine) and its metabolite 4OH-GTS-21 (3-(4-hydroxy, 2-methoxybenzylidene)-anabaseine) were obtained from Taiho (Tokyo, Japan). Nicotine,  $\alpha$ -bungarotoxin and méthylycaconitine citrate were obtained from Tocris Biosciences (Bristol, UK). EVP-6124(N-[(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]octan-3-yl]-7-chloro-1-benzothiophene-2carboxamide; hydrochloride) was obtained from MedChemexpress (Princeton, United States) RPMI 1640, phosphate-buffered saline and bovine serum albumin were acquired from Eurobio Biotechnology (Les Ulis, France). Penicillin-streptomycin, DMSO, L-glutamine, trypan blue dye, fetal calf serum (FCS) and lipopolysaccharide (LPS) (from *Escherichia coli* serotype 0111:B4) were purchased from Sigma Aldrich, hrIL-13 from R&D Systems (Lille, France).

### Isolation and culture of human lung macrophages

Experiments with human tissues were approved by the regional independent ethics committee (*Comité de Protection des Personnes Île de France VIII*, Boulogne-Billancourt, France). Lungs tissues were obtained from 25 patients (mean  $\pm$  standard error mean (SEM) age:  $62 \pm 2$  years; gender (M:F): 14:11; mean  $\pm$  SEM FEV<sub>1</sub>/FVC ratio:  $0.75 \pm 0.04$ ; non smokers:1; smokers/ex-smokers: 10 and 14; pack years:  $41 \pm 3$ ) undergoing surgical resection for lung carcinoma and who had not received chemotherapy or radiotherapy. Lung macrophages from lung parenchyma, as previously described (Buenestado *et al.*, 2010; Buenestado *et al.*, 2012). Fragments of lung parenchyma were taken as far as possible from the tumor, thinly sliced with scissors then washed with RPMI medium. Lavage fluid was collected, centrifuged (3000g, 10 min, 25°C) and the cell pellet was resuspended in RPMI supplemented with 10% heat-inactivated FCS, 2 mM L-glutamine, 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  streptomycin and 100  $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$  penicillin. Cell suspension was plated in 24-well plates at a density of  $10^6$  cells. $\text{mL}^{-1}$  and incubated for at least 1.5 hr at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. Non-adherent cells were then washed with FCS-free RPMI medium. More than 95% of the adherent cells were macrophages, as determined by May–Grünwald–Giemsa staining and CD68 immunocytochemistry. Cell viability exceeded 90% as assessed by trypan blue dye exclusion. LM were finally incubated overnight in supplemented RPMI medium. Classically activated macrophages (M1 macrophages) were obtained by exposure to LPS. Alternatively activated

macrophages (M2 macrophages) were induced by *in vitro* exposure to IL-13. The LPS concentration ( $10 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) was selected as being suboptimal on the basis of previous data on time-response and concentration curves (Buenestado *et al.*, 2012). The concentration of IL-13 ( $50 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) was chosen on the basis of previous experiments in our laboratory (data not shown).

### **Incubation of LM with $\alpha 7\text{nAChRs}$ agonists and antagonist**

The following day, LM were washed twice and 1 mL of RPMI supplemented with 1% FCS was added to each well. LM were treated with nicotinic receptors agonists (mixed  $\alpha 4/\alpha 7\text{nAChRs}$  agonist: nicotine ( $100 \mu\text{M}$ ), selective  $\alpha 7\text{nAChRs}$  partial agonists: GTS-21 (10 to  $100 \mu\text{M}$ ), 4OH-GTS-21 (10 to  $100 \mu\text{M}$ ), EVP-6124 (10 to  $20 \mu\text{M}$ ) and  $\alpha 7\text{nAChRs}$  antagonist  $\alpha$ -bungarotoxin (0.1 to  $10 \mu\text{M}$ ) or their respective vehicle for 1 hr prior to stimulation with  $10 \text{ ng.mL}^{-1}$  LPS or  $50 \text{ ng.mL}^{-1}$  IL-13. Nicotinic antagonist,  $\alpha$ -bungarotoxin ( $10 \mu\text{M}$ ) and methyllycaconitine citrate ( $10 \mu\text{M}$ ) was added 30 min before GTS-21. Following a 24 hrs incubation period, LM supernatants were collected and stored at  $-20^\circ\text{C}$  for later cytokines analysis. All wells were run in duplicate for each series of experiments. All wells were run in duplicate. After 24 hr of incubation, LM supernatants were collected, stored at  $-20^\circ\text{C}$  and subsequently assayed for cytokines.

Stock solutions ( $10 \text{ mM}$ ) of GTS-21, 4OH-GTS-21 and EVP-6124 were prepared in DMSO, expected for nicotine prepared in medium. All subsequent dilutions were prepared daily in complete medium. The maximal DMSO concentration applied to cells in culture did not exceed 0.05% and did not alter the production of cytokines. Cytotoxicity of nicotine, GTS-21, 4OH-GTS-21 and EVP-6124 was determined by measuring lactate dehydrogenase (LDH) activity in LM supernatants (using the LDH cytotoxicity assay from Cayman Chemical Europe). Neither the vehicles nor the compounds used in this work altered the viability of LMs.

### **Reverse transcriptase - quantitative polymerase chain reaction**

Lung macrophages were treated with GTS-21 ( $100 \mu\text{M}$ ) or EVP-6124 ( $20 \mu\text{M}$ ) for 1 hr prior to stimulation with LPS ( $10 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) or IL-13 ( $50 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) for 4 and 24 hrs. Total RNA was prepared using TRIzol<sup>®</sup> reagent (Life Technologies, Saint Aubin, France and RNA

was extracted according to the manufacturer's instructions. RNA concentration was determined using a Biowave DNA spectrophotometer (Biochrom, Cambridge, England). The RNA's intactness was determined by running an aliquot of each sample on an Experion™ automated electrophoresis station (BioRad, Marnes-la-Coquette, France). Then, 1 µg of total RNA was reverse-transcribed using SuperScript® III First-strand SuperMix kit (Life Technologies).

Specific TaqMan® array based on predesigned reagents (Life Technologies) were used for the analysis of cytokines/chemokines and subunits of  $\alpha 7$  (*CHRNA7*),  $\alpha 4$  (*CHRNA4*) of nicotinic receptors transcripts. Reverse transcriptase-quantitative PCR was performed using Gene Expression Master Mix (Life Technologies) with 20 ng of cDNA in a StepOnePlus thermocycler (Life Technologies). The thermal cycling conditions were as follows: initial denaturation at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 sec, and 60°C for 1 min. The housekeeping gene hypoxanthine phosphoribosyltransferase (*HPRT1*) was used for signal normalization.

### **Cytokine measurements**

Selected cytokines in the culture supernatants were measured with specific ELISAs (the Duoset Development System from R&D Systems), according to the manufacturer's instructions. The supernatant were diluted with RPMI medium as appropriate and the optical density was determined at 450 nm with an MRX II microplate reader (Dyner Technologies, Saint-Cloud, France). The detection limits of these assays were 4 pg.mL<sup>-1</sup> for CCL3, CCL13, CCL18, CCL22, 8 pg.mL<sup>-1</sup> for TNF- $\alpha$ , CCL2 and CCL4 and 32 pg.mL<sup>-1</sup> for CXCL1 and CXCL8. Cytokine concentrations are expressed as pg.10<sup>-6</sup> cells.

### **Flow cytometry determination of $\alpha 7$ nAChR expression**

Cells were washed three times with PBS, then scratched with a pipette tip to be unfasten from culture wells, resuspended at 0.5.10<sup>6</sup> cells.mL<sup>-1</sup> and incubated for 20 min in the dark with 10 µM of the selective FITC-labelled  $\alpha 7$ nAChRs antagonist  $\alpha$ -bungarotoxin (Invitrogen Life Technologies). Analysis was performed on a FC500 flow cytometer (Beckman Coulter, Lognes, France).

## Data expression and statistical analysis

Data of cytokines production and flow cytometry are expressed as means  $\pm$  S.E.M. from experiments performed with LM obtained from  $n$  patients. The concentration-effect curves were analyzed using GraphPad Prism<sup>®</sup> v5.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Concentration of GTS-21 and 4OH-GTS-21 that provokes 50% of inhibition ( $EC_{50}$ ) response of cytokine production was calculated by GraphPad Prism<sup>®</sup> v5.01 thanks to a nonlinear regression. The relative expression and fold changes of mRNAs was calculated according the  $2^{(-\Delta Ct)}$  and to the  $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$  method respectively (Livak *et al.*, 2001). Statistical analysis of mRNA expression level was performed with a paired t-test. Other analyses were performed with a one-way, repeated-measures analysis of variance followed by Bonferonni's post-tests or paired t test. The threshold for statistical significance was defined as  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### Expression of nicotinic $\alpha 7$ and $\alpha 4$ receptors in human lung macrophages

We first investigated the expression of *CHRNA7* ( $\alpha 7$ nAChRs) and *CHRNA4* ( $\alpha 4$ nAChRs) in LM. Expressions of  $\alpha 7$ nAChRs transcripts were detected in LM (Figure 1). A 24 hrs incubation with LPS or IL-13 had no significant impact on  $\alpha 7$ nAChRs transcript in LM. Expression of  $\alpha 4$ nAChRs was not observed in LM. The expression of  $\alpha 7$ nAChRs was confirmed with a flow cytometry analysis, since the whole macrophage population was positively stained with the FITC-bound  $\alpha 7$ nAChRs antagonist  $\alpha$ -bungarotoxin (Figure 2).

### Effect of $\alpha 7$ nAChRs agonists on the production of M1/M2 cytokines

As  $\alpha 7$ nAChRs were expressed in human LM, we investigated the effects of selective  $\alpha 7$ nAChRs agonists on the production of M1/M2 cytokines by LM stimulated or not (basal) by LPS or IL-13. As expected, LPS and IL-13 were associated with significant greater production of M1 and M2 cytokines, respectively. In unstimulated LM, GTS-21 concentration-dependently inhibited the production of the M1 cytokines CCL2, CCL3, CCL4 and CXCL1 with relative reduction of 80%, 32%, 52% and 63% respectively, whereas TNF- $\alpha$ , and CXCL8 were unaffected (Figure 3A). In the same way 4OH-GTS-21 decreased the production of M1 cytokines CCL2, CCL4, CXCL1 and CXCL8 with relative reduction of 80%, 40%, 63% and 60%, whereas the production of CCL3 and TNF- $\alpha$  was unaffected

(Figure 3C). In unstimulated LM, the production of the M2 cytokines CCL18 and CCL22 was also inhibited by GTS-21 with relative reduction of 71% and 40% respectively (Figure 3B). M2 cytokines were also decreased by 4OH-GTS-21 with maximal decrease of 37% and 45% respectively (Figure 3D). The M2 cytokine CCL13 was unaffected by either GTS-21 or its metabolite. Similarly, both the LPS-induced increase in M1 cytokines (TNF- $\alpha$ , CCL2, CCL3, CCL4, CXCL1 and CXCL8, Figure 4A, 4C) and the IL-13-induced increase in M2 cytokines (CCL13, CCL18 and CCL22, Figure 4B,4D) were concentration-dependently inhibited by GTS-21 and 4OH-GTS-21, with relative reduction ranging between 35% and 97%. The EC<sub>50</sub> for each cytokine in basal, LPS and IL-13 condition are given in Table 1.

Involvement of  $\alpha$ 7nAChRs pathway in the modulation of cytokine production was also confirmed by other selective  $\alpha$ 7nAChRs agonists such as EVP-6124. As it was shown in table 2, EVP-6124 (20  $\mu$ M) was associated with significant lower production of M1 and M2 cytokines previously modulated by GTS-21 and its metabolite with relative reduction of 44%, 17%, 36%, 34%, 14% and 35 % for CCL2, CCL3, CCL4, CXCL1, CCL18 and CCL22 respectively (Table 2). EVP-6124 had any effect on M1/M2 cytokine production in basal condition.

However, it is noteworthy that the mixed  $\alpha$ 4/ $\alpha$ 7nAChRs agonist nicotine (100  $\mu$ M) did not affect LM cytokines production in any condition (data not shown).

### **Effect of $\alpha$ 7nAChRs agonists on the transcript expression of M1/M2 cytokines**

Our transcriptome analysis with a panel of M1- and M2-related genes revealed that GTS-21 also affected LM mRNA expression. In a first attempt, we assessed the cytokine transcript expression after 24 hrs incubation with LPS or IL-13 in the presence and in the absence of GTS-21. Among M1 cytokines, only CCL2 transcripts were significant lower by GTS-21 in LPS-treated LM about 68 fold, whereas M2 cytokines CCL13 and CCL22 were decreased in IL-13-treated macrophages (Figure 5B). Since peaks of cytokine transcript expression may occur earlier than 24 hrs, we performed the same analysis after 4 hours incubation with LPS and IL-13. In this condition, the decrease in the M1-cytokines transcripts was significant for TNF- $\alpha$ , CCL2, CCL3, CCL4 and CXCL1 (Figure 5A). However, no effect of GTS-21 on M2 cytokines transcripts was observed after 4 hrs incubation time.

### **Effect of the $\alpha 7$ nAChRs antagonist $\alpha$ -bungarotoxin and méthylyllycaconitine citrate**

We then sought to characterize the effects of the  $\alpha 7$ nAChRs antagonist  $\alpha$ -bungarotoxin on the inhibition of cytokines production induced by GTS-21 and EVP-6124. In our experimental conditions, when  $\alpha$ -bungarotoxin (10  $\mu$ M) or méthylyllycaconitine citrate (10  $\mu$ M) was incubated with LM for 30 min before GTS-21 (100  $\mu$ M) or EVP-6124 (20  $\mu$ M) was added, we were not able to observe a reversal effect of the GTS-21- or EVP-6124-induced inhibition of M1/M2 cytokines production (data not shown). However, when unstimulated LM were cultured in the presence of the  $\alpha 7$ nAChRs antagonist  $\alpha$ -bungarotoxin (0.1  $\mu$ M to 10  $\mu$ M) alone for 24 hrs, there was a significant increase in the production of M1 cytokines TNF- $\alpha$ , CCL2, CCL3, CCL4 and CXCL8 at both the transcriptional (Figure 6A) and the protein level (Figure 6B).

### **DISCUSSION AND CONCLUSION**

The present study shows for the first time the expression of  $\alpha 7$ nAChRs in human LM and their involvement in the down-regulation of the LPS-induced release of M1 cytokines CCL2, CCL3, CCL4, CXCL1, CXCL8 and TNF- $\alpha$  as well as the IL-13-induced release of M2 cytokines CCL13, CCL18 and CCL22. These results suggest an immunomodulatory role of  $\alpha 7$ nAChRs in LM.

In our model, human lung macrophages express  $\alpha 7$ nAChRs, as it was previously observed in other immune cells such as human monocytes (Yoshikawa *et al.*, 2006) or monocyte-derived macrophages (Borovikova *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2003b) where it exert a key role in the “cholinergic anti-inflammatory pathway” (Borovikova *et al.*, 2000; Yoshikawa *et al.*, 2006; Chernyavsky *et al.*, 2010). Previous study indicate that stimulation of  $\alpha 7$ nAChR exert a regulatory effect on cytokine/chemokine production. Inhibition in the production of M1 cytokines was also observed following application of nicotine to human monocytes (TNF- $\alpha$ , CCL2 and CCL3) (Yoshikawa *et al.*, 2006), after treatment of monocyte-derived macrophages with ACh (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-18) (Borovikova *et al.*, 2000) whereas the anti-inflammatory cytokine IL-10 was either unaffected or upregulated (Borovikova *et al.*, 2000; Chernyavsky *et al.*, 2010). In our model, we found that stimulation of  $\alpha 7$ nAChR by GTS-21, 4OH-GTS-21 and EVP-6124 were able to induce a marked inhibition of M1/M2 cytokines transcript expression and protein release by unstimulated LM or by cells cultured with LPS or IL-13. The most cytokines/chemokines affected in LPS-stimulated cells were

TNF- $\alpha$  and cytokines involved in the recruitment of neutrophils (CXCL1, CXCL8), monocytes (CCL2, CCL4) and Th1 lymphocytes (CCL3, CCL4), which are major cell types in the inflammatory reaction to infection. On the other hand, Th2-type cytokines induced by IL-13 were also inhibited by GTS-21, 4OH-GTS-21 and EVP-6124, with marked inhibition in the production of cytokines involved in the recruitment of cells characteristics of the IgE-mediated response, such as Th2 lymphocytes (CCL18 and CCL22) (de Nadai *et al.*, 2006) or eosinophils and basophils (CCL13) (Lamkhioued *et al.*, 2000).

In similar models, the stimulation of  $\alpha 7$ nAChRs with GTS-21 induced a dose-dependent inhibition of pro-inflammatory but not anti-inflammatory cytokines in human monocytes, peripheral blood mononuclear cell, whole blood and murine macrophages (Giebelen *et al.*, 2007; Kox *et al.*, 2009; Rosas-Ballina *et al.*, 2009; Khan *et al.*, 2012a). Interestingly, a previous work by Shaykhiev *et al.* showed that alveolar macrophages from healthy smokers exhibited a substantial suppression of M1-related genes and a partial induction of some M2-related genes (CCL17, CCL18 and CCL22 remained unaffected) in comparison to cells from nonsmokers (Shaykhiev *et al.*, 2009), that might be explained by the immunosuppressive effects of cholinergic agonists (such as nicotine) observed in the previously mentioned studies or with a  $\alpha 7$ nAChRs selective agonist in the present work. Taken together, our results suggest that stimulation  $\alpha 7$ nAChRs exert a potent down-regulation of LM cytokines production. Our result were also confirmed by the effect of another agonist of  $\alpha 7$  nicotinic receptor, EVP-6124, currently evaluated in clinical trial for schizophrenia (NCT00968851) and Alzheimer's disease (NCT02004392). Because any study have been previously evaluated the effect of EVP-6124 on immune function, our results show for the first time that EVP-6124, is able to regulate M1 and M2 cytokines production in LM.

While the implication of  $\alpha 7$ nAChRs has been fully described in the cholinergic anti-inflammatory pathway (4, 5), we evaluated a specific antagonist of  $\alpha 7$ nAChRs,  $\alpha$ -bungarotoxin. However,  $\alpha$ -bungarotoxin did not reverse the action of GTS-21 and EVP-6124 in our model. The lack of blocking effect of GTS-21 by  $\alpha 7$ nAChRs antagonists has also been described in murine macrophages and human leukocytes (Kox *et al.*, 2009; Khan *et al.*, 2012b). A possible explanation for this result might rely on difference in the  $\alpha 7$ nAChR between cells types. Studies have been shown that human monocyte-derived macrophages do not express the normal  $\alpha 7$ nAChRs subunit encoded by the *CHRNA7* gene, but a partially duplicated hybrid subunit called dup $\alpha 7$  and encoded by the *CHRFAM7A* gene, in which exons 1-4 of the original *CHRNA7* are replaced by the exons A-D of *FAM7* gene. Interestingly, the



*dupα7* gene lacks exons coding for the  $\alpha$ -bungarotoxin-binding site (Villiger *et al.*, 2002). This could explain why there was no reversal of GTS-21 and EVP-6124 effects when a pre-incubation with  $\alpha$ -bungarotoxin (10  $\mu$ M) was performed and highlight the putative role of *dupα7* in cytokines modulation by  $\alpha 7$  nicotinic agonist evaluated in our study. Moreover, it should be noted that GTS-21 has a higher affinity and possess antagonistic effect on  $\alpha 4\beta 2$  subunits of nicotinic receptor (Briggs *et al.*, 1997). So it is possible that GTS-21 effects are due to antagonism of  $\alpha 4\beta 2$  subunits rather than activation of the  $\alpha 7$ nAChRs. However, our results not shown mRNA expression of  $\alpha 4\beta 2$  subunits in human lung macrophages. The effect of GTS-21 on TNF- $\alpha$  release in mouse peritoneal macrophages is insensitive to  $\alpha$ -bungarotoxin, but sensitive to  $\alpha 7$  siRNA knock-down (Khan *et al.*, 2012b). These results suggest that  $\alpha 7$ nAChRs expression is required but ion flux through this receptor is not responsible of GTS-21 effects on cytokine production by human lung macrophages. The functionality of these receptors remains poorly known, and it could be expected that the binding affinity for ligands and gating mechanisms may be affected, leading to a particular pharmacological profile. Interestingly, nicotine did not cause any modulation of M1/M2 cytokines production in our experimental conditions. It have been reported that expression of *CHRFAM7A* in leukocytes is a negative dominant regulator of  $\alpha 7$ nAChRs function in terms of current detectable and could explain, in our model the absence of effect by nicotine through the  $\alpha 7$ nAChRs (Araud *et al.*, 2011; de Lucas-Cerrillo *et al.*, 2011b). Moreover, it was demonstrated that nicotine failed to induce detectable current in human leukocytes which expressed *dupα7* (Villiger *et al.*, 2002) and less effective than GTS-21 in cytokine decrease by leukocytes (Kox *et al.*, 2009).

The blockade of  $\alpha 7$ nAChRs antagonist  $\alpha$ -bungarotoxin induced an increase of M1 cytokines in unstimulated LM, without affecting M2 cytokines. Two main hypothesis may explain this increase in M1 cytokines. The first one is there could be an endogenous acetylcholine production by LM, which could activate  $\alpha 7$ nAChRs once released in the culture medium and consequently affect the cytokine production. There are however evidences that do not favour this hypothesis. First of all, we did not detect in LM the transcript expression of choline acetyltransferase (data not shown), the enzyme responsible for ACh synthesis, suggesting the absence of endogenous ACh in our LM. The second hypothesis we could not rule out is a potential action of choline, which is an endogenous and selective  $\alpha 7$ nAChRs agonist (Papke *et al.*, 1996), present in concentrations around 3 mg/L in the culture medium. The modulation

of TNF- $\alpha$  release by choline in human monocyte-derived macrophages and by an  $\alpha 7$ nAChRs-dependent mechanism has been previously demonstrated (Parrish *et al.*, 2008).

The two distinct M1 and M2 macrophages activation states have now been described and reviewed on several occasions (Mantovani *et al.*, 2004; Gordon *et al.*, 2005; Martinez *et al.*, 2008; Sica *et al.*, 2012). LPS as well as other Toll-like receptor ligands are known to polarize macrophages towards a M1 pro-inflammatory phenotype, characterized by enhanced expression of pro-inflammatory cytokines, reactive oxygen species, promotion of Th1 response and strong microbicidal and tumoricidal activities. In contrast, IL-13 polarizes macrophages towards the M2 phenotype, which induces a specific chemokine repertoire, dampens inflammation, promotes tissue remodeling, tumor progression and possesses other immunomodulatory functions. M1 cytokines of LM evaluated in our study such as TNF- $\alpha$ , CCL2, CCL3, CCL4, CXCL1 and CXCL8 have been reported to be involved in the development of COPD (Barnes, 2009). M2 cytokines such as CCL13, CCL18 and CCL22 are implied in the development of chronic disease such as asthma and allergy (Lamkhioued *et al.*, 2000; de Nadai *et al.*, 2006). Indeed, asthmatic patients have a greater number of M2 macrophages in their lungs (Viksman *et al.*, 2002; Melgert *et al.*, 2011) and the persistent production of IL-13 is responsible for the chronic mucous cell metaplasia and airway hyperreactivity that are characteristic of such chronic airway diseases (Kim *et al.*, 2008). The inhibitory effect of selective  $\alpha 7$ nAChRs agonist on the M1 and M2 chemokines reflects an interesting finding for treatment of COPD and asthma/allergy disease. Recent study has been shown that GTS-21 decreases Th2 response in a murine food allergy model (Yamamoto *et al.*, 2014), improved bacterial clearance in murine hyperoxia model (Sitapara *et al.*, 2014) and also inhibit Th1-cell differentiation in rheumatoid arthritis (Wu *et al.*, 2014), highlighting the role of  $\alpha 7$ nAChRs in inflammatory disease. Our study underline a putative interest for  $\alpha 7$ nAChRs agonist as a dual inhibitor of M1- and M2-pathways, especially as reference anti-inflammatory corticosteroids rather seem to selectively target M1-cytokines more than M2-cytokines (unpublished results). This dual inhibition may be of clinical interest in several physiopathological conditions such as COPD exacerbations or asthma (Dasgupta *et al.*, 2012b). Given that the innate immune system in the lungs includes several macrophages populations and that M1 and M2 macrophages could coexist in distinct local environments, one could speculate that in some conditions such as asthma exacerbations, whose viral or bacterial origin may induce a TLR-dependant M1-type macrophage activation being added to a M2 background, the inhibition of both M1 and M2 pathways may be beneficial.

Our study showed that selective  $\alpha 7$ nAChRs agonist plays an anti-inflammatory role to modulate the immune response in human lung macrophages. These results suggest that  $\alpha 7$  nicotinic receptors may thus constitute a pharmacological target in the treatment of lung diseases such as asthma or COPD.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors wish to acknowledge Pr Vasse and Dr Masure (Service de Biologie Médicale, Hôpital Foch), for providing access to the flow cytometer and David Fraser (Biotech Communication, Dannery, France) for providing copy editing services.

#### **CONFLICTS OF INTEREST STATEMENT**

Any conflict of interest must be declared

**LIST OF REFERENCE**

- Araud T, Graw S, Berger R, Lee M, Neveu E, Bertrand D, *et al.* (2011). The chimeric gene *CHRFAM7A*, a partial duplication of the *CHRNA7* gene, is a dominant negative regulator of  $\alpha 7$  nAChR function. *Biochem Pharmacol* 82: 904-914.
- Barnes PJ (2008). Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol* 8: 183-192.
- Barnes PJ (2009). The cytokine network in chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 41: 631-638.
- Benoit M, Desnues B, Mege JL (2008). Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol* 181: 3733-3739.
- Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, *et al.* (2000). Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 405: 458-462.
- Briggs CA, Anderson DJ, Brioni JD, Buccafusco JJ, Buckley MJ, Campbell JE, *et al.* (1997). Functional characterization of the novel neuronal nicotinic acetylcholine receptor ligand GTS-21 in vitro and in vivo. *Pharmacol Biochem Behav* 57: 231-241.
- Buenestado A, Grassin Delyle S, Arnould I, Besnard F, Naline E, Blouquit-Laye S, *et al.* (2010). The role of adenosine receptors in regulating production of tumour necrosis factor- $\alpha$  and chemokines by human lung macrophages. *Br J Pharmacol* 159: 1304-1311.
- Buenestado A, Grassin-Delyle S, Guitard F, Naline E, Faisy C, Israel-Biet D, *et al.* (2012). Roflumilast inhibits the release of chemokines and TNF- $\alpha$  from human lung macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *Br J Pharmacol* 165: 1877-1890.
- Chernyavsky AI, Arredondo J, Skok M, Grando SA (2010). Auto/paracrine control of inflammatory cytokines by acetylcholine in macrophage-like U937 cells through nicotinic receptors. *Int Immunopharmacol* 10: 308-315.
- Dasgupta P, Keegan AD (2012). Contribution of Alternatively Activated Macrophages to Allergic Lung Inflammation: A Tale of Mice and Men. *J Innate Immun.*
- de Lucas-Cerrillo AM, Maldifassi MC, Arnalich F, Renart J, Atienza G, Serantes R, *et al.* (2011). Function of partially duplicated human  $\alpha 7$  nicotinic receptor subunit *CHRFAM7A* gene: potential implications for the cholinergic anti-inflammatory response. *J Biol Chem* 286: 594-606.
- de Nadai P, Charbonnier AS, Chenivresse C, Senechal S, Fournier C, Gilet J, *et al.* (2006). Involvement of CCL18 in allergic asthma. *J Immunol* 176: 6286-6293.
- Giebelen IA, van Westerloo DJ, LaRosa GJ, de Vos AF, van der Poll T (2007). Local stimulation of  $\alpha 7$  cholinergic receptors inhibits LPS-induced TNF- $\alpha$  release in the mouse lung. *Shock* 28: 700-703.
- Gordon S, Taylor PR (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5: 953-964.
- Khan MA, Farkhondeh M, Crombie J, Jacobson L, Kaneki M, Martyn JA (2012a). Lipopolysaccharide Up-regulates  $\alpha 7$  Acetylcholine Receptors: Stimulation with GTS-21 Mitigates Growth Arrest of Macrophages and Improves Survival in Burned Mice. *Shock*.
- Khan MA, Farkhondeh M, Crombie J, Jacobson L, Kaneki M, Martyn JA (2012b). Lipopolysaccharide Up-regulates  $\alpha 7$  Acetylcholine Receptors: Stimulation with GTS-21

Mitigates Growth Arrest of Macrophages and Improves Survival in Burned Mice. *Shock* 38: 213-219.

Kim EY, Battaile JT, Patel AC, You Y, Agapov E, Grayson MH, *et al.* (2008). Persistent activation of an innate immune response translates respiratory viral infection into chronic lung disease. *Nat Med* 14: 633-640.

Kox M, van Velzen JF, Pompe JC, Hoedemaekers CW, van der Hoeven JG, Pickkers P (2009). GTS-21 inhibits pro-inflammatory cytokine release independent of the Toll-like receptor stimulated via a transcriptional mechanism involving JAK2 activation. *Biochem Pharmacol* 78: 863-872.

Kox M, Pompe JC, Peters E, Vaneker M, van der Laak JW, van der Hoeven JG, *et al.* (2011). alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonist GTS-21 attenuates ventilator-induced tumour necrosis factor-alpha production and lung injury. *Br J Anaesth* 107: 559-566.

Lamkhioued B, Garcia-Zepeda EA, Abi-Younes S, Nakamura H, Jedrzkiewicz S, Wagner L, *et al.* (2000). Monocyte chemoattractant protein (MCP)-4 expression in the airways of patients with asthma. Induction in epithelial cells and mononuclear cells by proinflammatory cytokines. *Am J Respir Crit Care Med* 162: 723-732.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 25: 402-408.

Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 25: 677-686.

Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M (2008). Macrophage activation and polarization. *Front Biosci* 13: 453-461.

Melgert BN, ten Hacken NH, Rutgers B, Timens W, Postma DS, Hylkema MN (2011). More alternative activation of macrophages in lungs of asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol* 127: 831-833.

Papke RL, Bencherif M, Lippiello P (1996). An evaluation of neuronal nicotinic acetylcholine receptor activation by quaternary nitrogen compounds indicates that choline is selective for the alpha 7 subtype. *Neurosci Lett* 213: 201-204.

Parrish WR, Rosas-Ballina M, Gallowitsch-Puerta M, Ochani M, Ochani K, Yang LH, *et al.* (2008). Modulation of TNF release by choline requires alpha7 subunit nicotinic acetylcholine receptor-mediated signaling. *Mol Med* 14: 567-574.

Pavlov VA, Ochani M, Yang LH, Gallowitsch-Puerta M, Ochani K, Lin X, *et al.* (2007). Selective alpha7-nicotinic acetylcholine receptor agonist GTS-21 improves survival in murine endotoxemia and severe sepsis. *Crit Care Med* 35: 1139-1144.

Prickaerts J, van Goethem NP, Chesworth R, Shapiro G, Boess FG, Methfessel C, *et al.* (2012). EVP-6124, a novel and selective alpha7 nicotinic acetylcholine receptor partial agonist, improves memory performance by potentiating the acetylcholine response of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* 62: 1099-1110.

Rosas-Ballina M, Goldstein RS, Gallowitsch-Puerta M, Yang L, Valdes-Ferrer SI, Patel NB, *et al.* (2009). The selective alpha7 agonist GTS-21 attenuates cytokine production in human whole blood and human monocytes activated by ligands for TLR2, TLR3, TLR4, TLR9, and RAGE. *Mol Med* 15: 195-202.

- Shaykhiev R, Krause A, Salit J, Strulovici-Barel Y, Harvey BG, O'Connor TP, *et al.* (2009). Smoking-dependent reprogramming of alveolar macrophage polarization: implication for pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *J Immunol* 183: 2867-2883.
- Sica A, Mantovani A (2012). Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* 122: 787-795.
- Sitapara RA, Antoine DJ, Sharma L, Patel VS, Ashby CR, Jr., Gorasiya S, *et al.* (2014). The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonist GTS-21 improves bacterial clearance in mice by restoring hyperoxia-compromised macrophage function. *Mol Med* 20: 238-247.
- Tracey KJ (2002). The inflammatory reflex. *Nature* 420: 853-859.
- Viksman MY, Bochner BS, Peebles RS, Schleimer RP, Liu MC (2002). Expression of activation markers on alveolar macrophages in allergic asthmatics after endobronchial or whole-lung allergen challenge. *Clin Immunol* 104: 77-85.
- Villiger Y, Szanto I, Jaconi S, Blanchet C, Buisson B, Krause KH, *et al.* (2002). Expression of an alpha7 duplicate nicotinic acetylcholine receptor-related protein in human leukocytes. *J Neuroimmunol* 126: 86-98.
- Vukelic M, Qing X, Redecha P, Koo G, Salmon JE (2013). Cholinergic receptors modulate immune complex-induced inflammation in vitro and in vivo. *J Immunol* 191: 1800-1807.
- Wang H, Yu M, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, Susarla S, *et al.* (2003a). Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* 421: 384-388.
- Wang H, Yu M, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, Susarla S, *et al.* (2003b). Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* 421: 384-388.
- Wu S, Zhao H, Luo H, Xiao X, Zhang H, Li T, *et al.* (2014). GTS-21, an alpha7-nicotinic acetylcholine receptor agonist, modulates Th1 differentiation in CD4 T cells from patients with rheumatoid arthritis. *Experimental and therapeutic medicine* 8: 557-562.
- Yamamoto T, Kodama T, Lee J, Utsunomiya N, Hayashi S, Sakamoto H, *et al.* (2014). Anti-allergic role of cholinergic neuronal pathway via alpha7 nicotinic ACh receptors on mucosal mast cells in a murine food allergy model. *PloS one* 9: e85888.
- Yoshikawa H, Kurokawa M, Ozaki N, Nara K, Atou K, Takada E, *et al.* (2006). Nicotine inhibits the production of proinflammatory mediators in human monocytes by suppression of I-kappaB phosphorylation and nuclear factor-kappaB transcriptional activity through nicotinic acetylcholine receptor alpha7. *Clin Exp Immunol* 146: 116-123.

## TABLES

**Table 1. The half inhibitory concentration (EC<sub>50</sub>) of GTS-21 and 4OH-GTS-21 on basal, LPS or IL-13-induced M1 and M2 cytokines release by human LM**

	<i>Basal</i>		<i>+LPS</i>		<i>+IL-13</i>	
	<i>GTS-21</i>	<i>4OH-GTS-21</i>	<i>GTS-21</i>	<i>4OH-GTS-21</i>	<i>GTS-21</i>	<i>4OH-GTS-21</i>
<b>M1 cytokines</b>	<b>EC<sub>50</sub> [95% CI] (μM)</b>					
<b>TNF-α</b>	NE	NE	100 [86 - 116]	91[70 - 120]		
<b>CCL2</b>	32 [20 - 52]	73 [48 - 110]	8 [5 - 12]	18 [11 - 28]		
<b>CCL3</b>	162 [96 - 276]	NE	94 [62 - 42]	148 [82 - 271]		
<b>CCL4</b>	120 [68 - 211]	135 [60 - 303]	62 [44 - 86]	100 [70 - 186]		
<b>CXCL1</b>	138 [60 - 218]	65 [34 - 127]	73 [38 - 140]	66 [38 - 114]		
<b>CXCL8</b>	NE	103 [52 - 202]	85 [55 - 131]	98 [50 - 190]		
<b>M2 cytokines</b>	<b>EC<sub>50</sub> [95% CI] (μM)</b>					
<b>CCL13</b>	NE	NE			23 [13 - 42]	64 [42 - 99]
<b>CCL18</b>	50 [37 - 70]	121 [96 - 154]			50 [34 - 75]	39 [25 - 60]
<b>CCL22</b>	73 [78-158]	50 [164-158]			19 [13-26]	25 [20-35]

*Lung macrophages were incubated with medium (basal), LPS (10 ng.mL<sup>-1</sup>) or IL-13 (50 ng.mL<sup>-1</sup>), in the presence of GTS-21 or 4OH-GTS-21 (10 to 100 μM). Supernatants were harvested at 24 hrs and analyzed for cytokine levels with ELISA. Values are represented as mean of EC<sub>50</sub> with 95% confidence interval (CI) for between five and seven preparations from different patients.*

**Table 2. Inhibitory effect of EVP-6124 on the LPS- and IL-13-induced release of M1 and M2 chemokines by human LM**

Cytokines ng per 10 <sup>6</sup> cells	+ LPS						+ IL-13		
	Basal	EVP (10 $\mu$ M)	EVP (20 $\mu$ M)	LPS	EVP (10 $\mu$ M)	EVP (20 $\mu$ M)	IL-13	EVP (10 $\mu$ M)	EVP (20 $\mu$ M)
CCL2	1.6 $\pm$ 0.6	1.8 $\pm$ 0.7	1.7 $\pm$ 0.8	14.4 $\pm$ 4.2 #	153.1 $\pm$ 4.4	8.1 $\pm$ 3.7 ***			
CCL3	8.7 $\pm$ 1.9	8.6 $\pm$ 1.8	9.6 $\pm$ 1.8	198.3 $\pm$ 16.2 ###	202.3 $\pm$ 16.3	164.5 $\pm$ 11.4 **			
CCL4	7.1 $\pm$ 1.1	7.5 $\pm$ 1.1	6.6 $\pm$ 1	304.2 $\pm$ 42.4 ##	287.5 $\pm$ 35.9	193.3 $\pm$ 42.3 ***			
CXCL1	7.9 $\pm$ 2.4	6.9 $\pm$ 2.5	7.5 $\pm$ 2.3	299.1 $\pm$ 44 ###	274.9 $\pm$ 37.1	196.9 $\pm$ 48.3 ***			
CCL18	75 $\pm$ 8.8	71.5 $\pm$ 11.2	70.7 $\pm$ 9.4				134.6 $\pm$ 27	128.5 $\pm$ 24.5 *	115.9 $\pm$ 24.7 **
CCL22	2.4 $\pm$ 0.6	2.3 $\pm$ 0.7	2.1 $\pm$ 0.6				6.2 $\pm$ 1.7 #	5.9 $\pm$ 1.5 **	4 $\pm$ 1.3 **

Lung macrophages were incubated with medium (basal), LPS (10 ng.mL<sup>-1</sup>) or IL-13 (50 ng.mL<sup>-1</sup>), in the presence of EVP-6124 (10 and 20  $\mu$ M). Supernatants were harvested at 24 hrs and analyzed for chemokine levels with ELISA. Values are represented as mean  $\pm$  S.E.M of five to eight independent experiments. # indicates significant differences versus Basal (#  $P$ <0.05; ##  $P$ <0.01; ###  $P$ <0.001) and \* versus LPS or IL-13 (\* $P$ <0.05; \*\* $P$ <0.01; \*\*\* $P$ <0.001).



**FIGURE LEGENDS**

**Figure 1. mRNA expression of  $\alpha 7nAChRs$  in human lung macrophages.** Lung macrophages were incubated with LPS ( $10 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) or IL-13 ( $50 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) for 24 hrs. The relative expression of  $\alpha 7nAChRs$  was determined by RT-qPCR and calculated from the expression of *CHRNA7* gene versus the expression of housekeeping gene (*HPRT1*). Data are represented as mean of relative expression of six independent experiments.

**Figure 2. Expression of  $\alpha 7nAChRs$  in human lung macrophages by flow cytometry analysis.** Lung macrophages were incubated with  $10 \mu\text{M}$  FITC-labelled (green) or unlabeled (black)  $\alpha$ -bungarotoxin for 20 min. Expression of  $\alpha 7nAChRs$  was analyzed by flow cytometry. Data are represented as mean of fluorescence intensity  $\pm$  S.E.M. of nine independent experiments. \* indicates significant differences versus unlabeled condition (\*\* $P < 0.001$ ).

**Figure 3. Concentration-response curves for the effect of GTS-21 and 4OH-GTS-21 on the release of M1 cytokines (A, C) and M2 cytokines (B, D) in unstimulated LM.** Lung macrophages were incubated for 1 hr with GTS-21 or 4OH-GTS-21 ( $10$  to  $100 \mu\text{M}$ ) or vehicle. M1/M2 cytokines release was determined with ELISA in culture supernatants collected after 24 hrs. Data are represented as mean  $\pm$  S.E.M. of four to six independent experiments. \* indicates significant differences versus control (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ).

**Figure 4. Concentration-response curves for the effect of GTS-21 and 4OH-GTS-21 on the release of M1 cytokines stimulated by LPS (A, C) and M2 cytokines stimulated by IL-13 (B, D) in LM.** Lung macrophages were pre-incubated for 1 hr with GTS-21 or 4OH-GTS-21 ( $10$  to  $100 \mu\text{M}$ ) or vehicle before LPS ( $10 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) or IL-13 ( $50 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) was added. M1/M2 cytokines release was determined with ELISA in culture supernatants collected after 24 hrs. Data are represented as mean  $\pm$  S.E.M. of four to seven independent experiments. \* indicates significant differences versus control (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ).

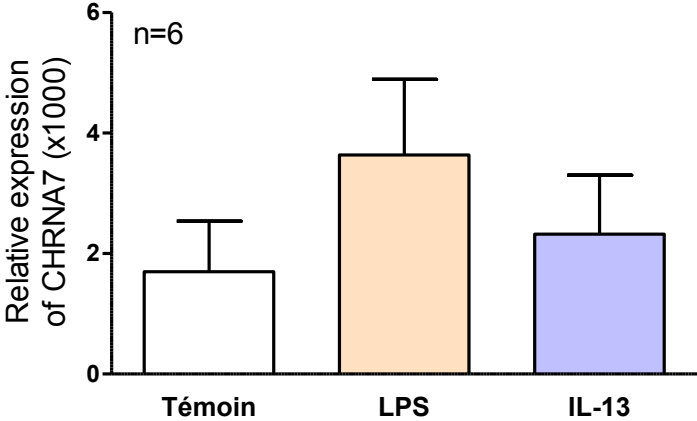
**Figure 5. Effect of GTS-21 on the mRNA expression of M1-cytokines in LPS-stimulated LM (A) and of M2-cytokines in IL-13 stimulated LM (B).** Lung macrophages were pre-incubated for 1 hr with GTS-21 ( $100 \mu\text{M}$ ) or vehicle before LPS ( $10 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) or IL-13 ( $50 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) was added during 4 and 24 hrs. The relative expression of M1/M2 cytokines was determined by RT-qPCR and calculated from the expression of the target gene versus the expression of housekeeping gene (*HPRT1*). Data are represented as mean with range of fold

*change of three to five independent experiments. \* indicates significant differences versus basal (\*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001).*

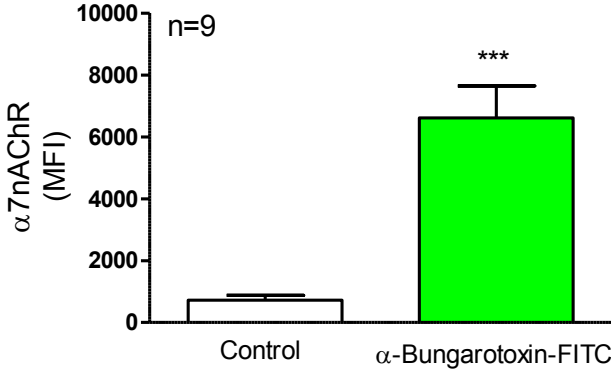
**Figure 6. Effect of  $\alpha$ 7nAChRs antagonist  $\alpha$ -bungarotoxin on mRNA expression (A) and production (B) of M1 cytokines by human LM.** *Lung macrophages were incubated with  $\alpha$ -bungarotoxin (0.1 to 10  $\mu$ M) or vehicle during 24 hrs. M1 cytokines release was determined with ELISA in culture supernatants. Data are represented as mean  $\pm$  S.E.M. of five to six independent experiments. \* indicate significant differences versus basal (\*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001).*

**FIGURES**

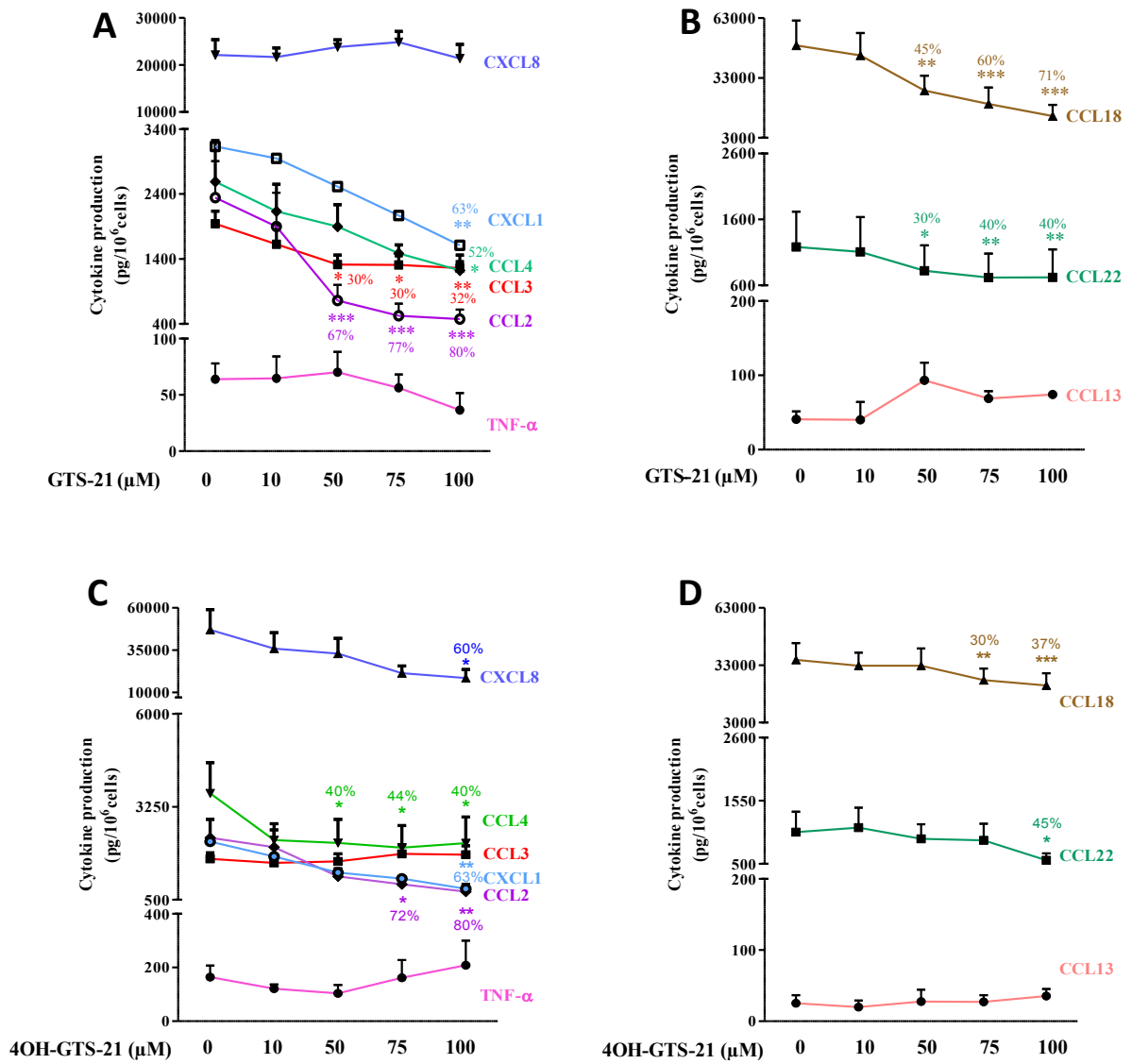
**Figures 1.**



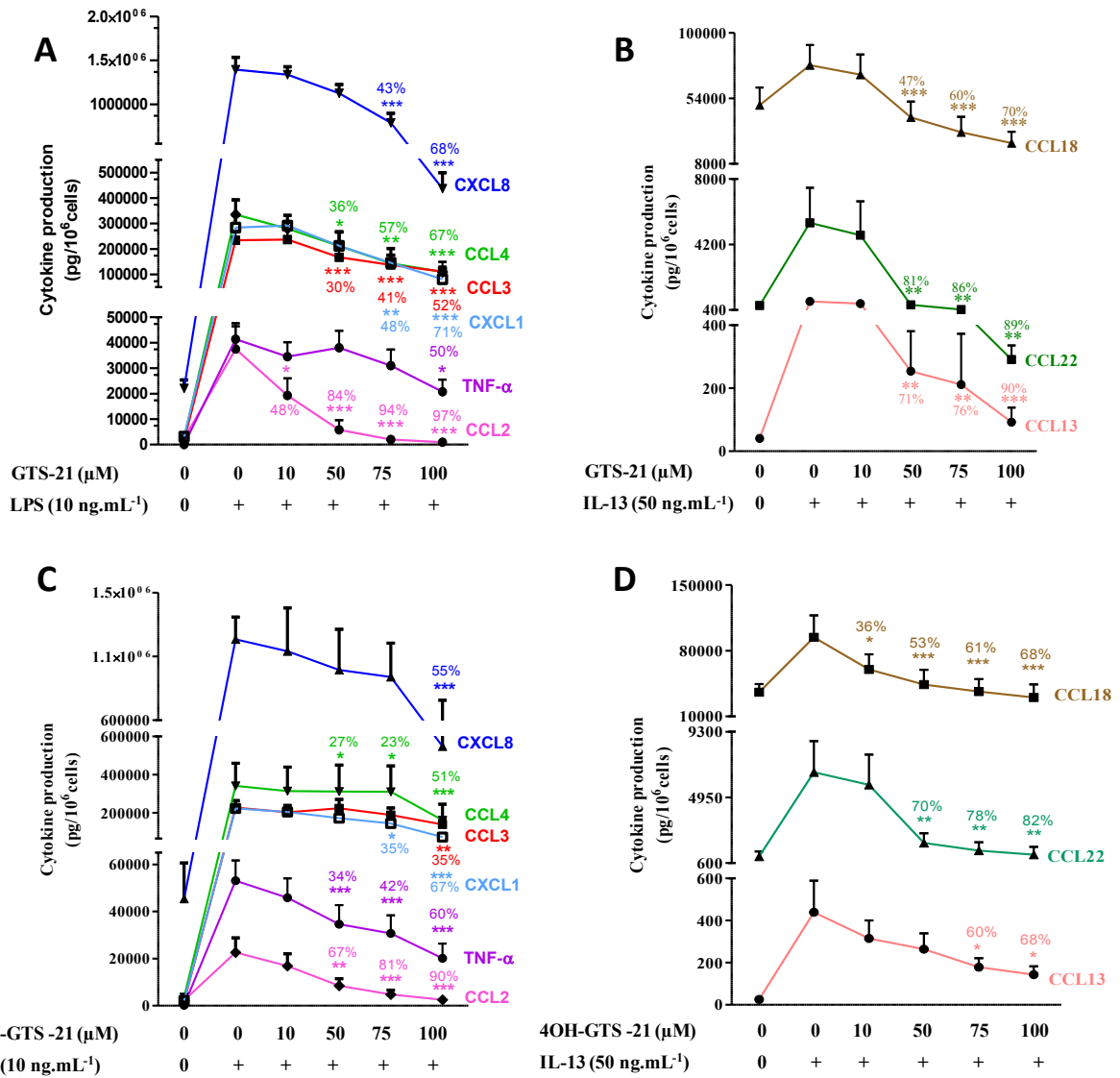
Figures 2.



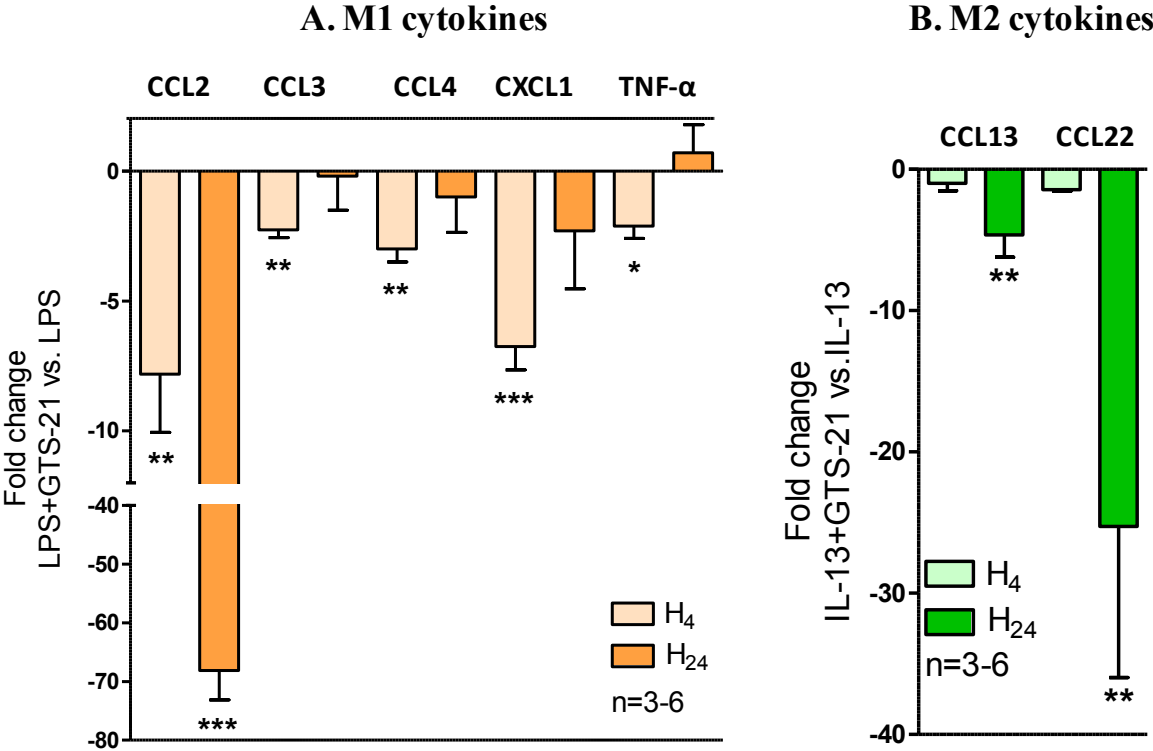
Figures 3.



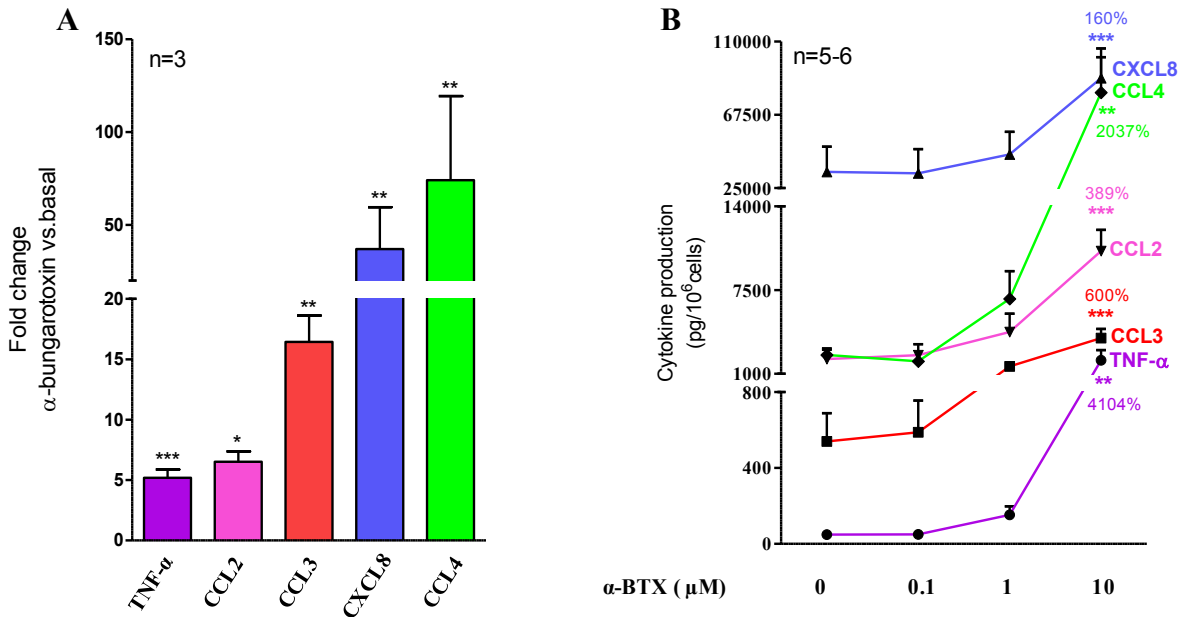
Figures 4.



Figures 5.



Figures 6.



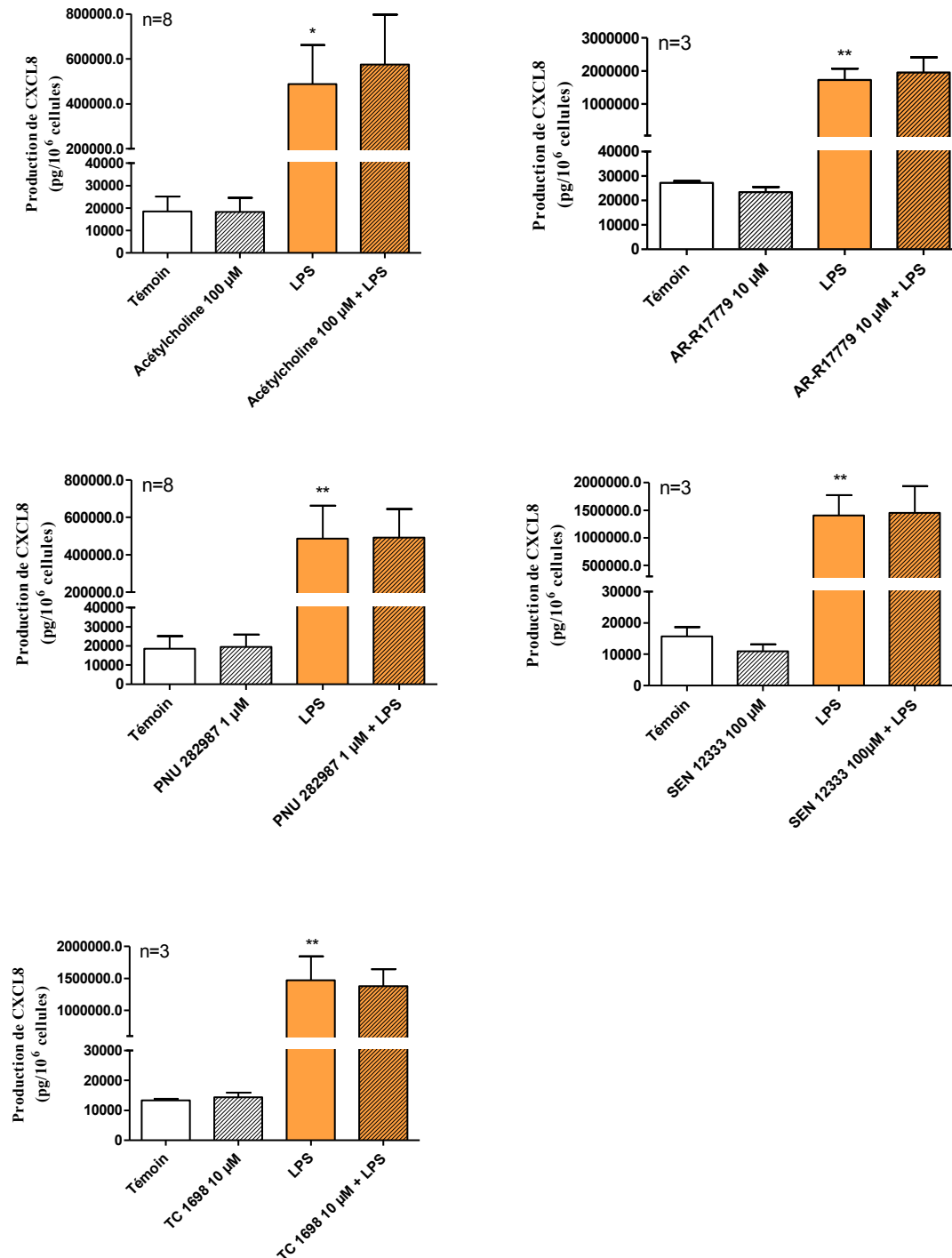


## **Résultats complémentaires**

Les résultats de l'article 3 montrent que le récepteur nicotinique  $\alpha 7$  joue un rôle important dans la régulation de la polarisation des macrophages pulmonaires. La stimulation de ce récepteur par des agonistes partiels, comme le GTS-21, son métabolite actif le 4OH-GTS-21 ainsi que l'EPV-6124, induit une diminution significative de la production des cytokines de type M1 et M2a par les macrophages pulmonaires humains. En parallèle des études menées avec les trois agonistes partiels, nous avons étudié les effets d'autres agonistes nicotiques du récepteur  $\alpha 7$  sur la production des cytokines par les macrophages pulmonaires humains. De plus, nous avons évalué l'expression d'un autre récepteur nicotinique, le récepteur dup $\alpha 7$  dans les macrophages pulmonaires humains. Enfin, les effets du GTS-21 ont été évalués sur l'expression d'autres marqueurs de la polarisation des macrophages pulmonaires humains.

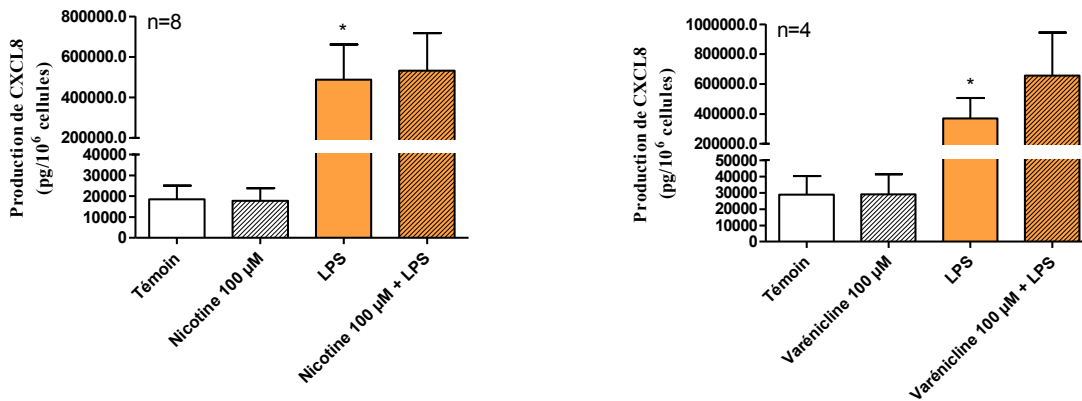
### **Effet d'autres agonistes nicotiques du récepteur nicotinique $\alpha 7$ sur la polarisation des macrophages**

Nous avons observé l'effet d'autres agonistes nicotiques  $\alpha 7$  (acétylcholine, AR-R17779, PNU 282987, SEN 12333 et TC 1698) et d'agonistes mixtes  $\alpha 4\beta 2$  et  $\alpha 7$  (nicotine et varénicline) sur la polarisation des macrophages pulmonaires humains. Les résultats montrent que le LPS induit une augmentation significative de la production de CXCL8 par les macrophages pulmonaires humains (**Figures 22 et 23**), mais les agonistes  $\alpha 7$  et mixtes  $\alpha 4\beta 2$  et  $\alpha 7$  ne modulent pas la production de cette chimiokine (**Figures 22 et 23**).



**Figure 22 : Effet des agonistes nicotiques  $\alpha 7$  sur la production de CXCL8 par les macrophages pulmonaires humains polarisés en phénotype M1 par le LPS**

Les macrophages pulmonaires humains ont été exposés aux différents agonistes nicotiques  $\alpha 7$  pendant 24h. Le LPS ( $10 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) a été ajouté au milieu de culture après 1h d'incubation avec les agonistes nicotiques. Le dosage de CXCL8 dans les surnageants a été effectué par ELISA. Les données sont représentées en pg pour  $10^6$  cellules. Les résultats sont représentés sous forme de moyenne  $\pm$  s.e.m de 3 à 8 expériences indépendantes. Les statistiques ont été effectuées par la méthode ANOVA suivie d'un test t. \* indique une différence significative avec le témoin (\* $p < 0.05$  ; \*\* $p < 0.01$ ).

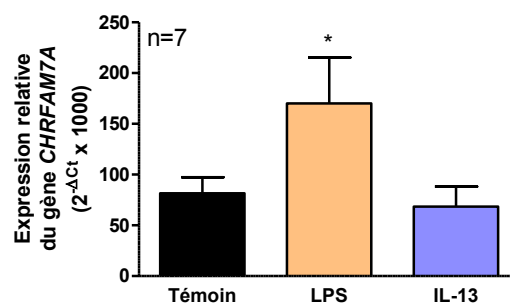


**Figure 23 : Effet de d'agonistes mixtes  $\alpha 4\beta 2$  et  $\alpha 7$  sur la production de CXCL8 par les macrophages pulmonaires humains polarisés M1 par le LPS**

Les macrophages pulmonaires humains ont été exposés aux différents agonistes nicotiniques mixtes  $\alpha 4\beta 2/\alpha 7$  pendant 24h. Le LPS ( $10 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) a été ajouté au milieu de culture après 1h d'incubation avec les agonistes mixtes. Le dosage de CXCL8 dans les surnageants a été effectué par ELISA. Les données sont représentées en pg pour  $10^6$  cellules. Les résultats sont représentés sous forme de moyenne  $\pm$  s.e.m de 4 à 8 expériences indépendantes. Les statistiques ont été effectuées par la méthode ANOVA suivie d'un test t. \* indique une différence significative avec le témoin (\* $p < 0.05$ ).

### Expression du récepteur dup $\alpha 7$ dans les macrophages pulmonaires humains

En plus d'une expression du récepteur nicotinique  $\alpha 7$ , nous avons mis en évidence que les macrophages pulmonaires humains expriment une forme partiellement dupliquée de ce récepteur appelée dup $\alpha 7$ , codée par le gène *CHRFAM7A* et dont les transcrits sont significativement augmentés en présence de LPS (Figure 24).

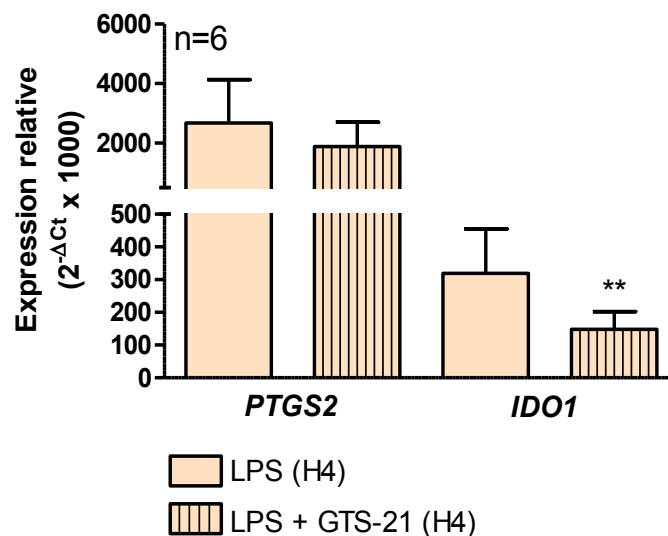


**Figure 24 : Expression des transcrits du récepteur nicotinique dup $\alpha 7$  dans les macrophages pulmonaires humains polarisés**

Les macrophages pulmonaires humains ont été exposés au LPS ( $10 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) et à l'IL-13 ( $50 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) pendant 24h. L'expression relative de *CHRFAM7A* a été mesurée par RT-qPCR. Les résultats sont représentés sous forme de moyenne  $\pm$  s.e.m de 7 expériences indépendantes et les statistiques ont été effectuées par la méthode ANOVA suivie d'un test t. \* indique une différence significative avec le témoin (\* $p < 0.05$ ).

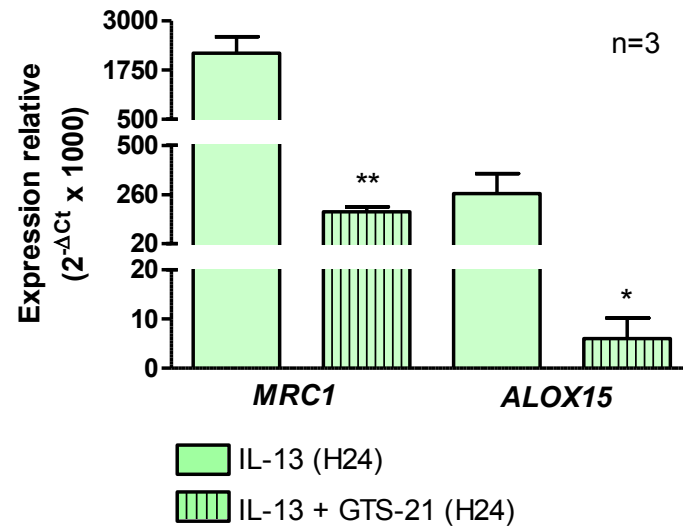
## Effet du récepteurs nicotinique $\alpha 7$ sur la régulation de l'expression d'autres marqueurs de la polarisation des macrophages pulmonaires

En complément des effets inhibiteurs du récepteur nicotinique  $\alpha 7$  sur la production de médiateurs de l'inflammation, nous avons regardé si d'autres marqueurs de la polarisation M1/M2a, préalablement identifiés dans l'article 1, étaient régulés par la stimulation de ce récepteur. Les résultats obtenus montrent que le GTS-21 (100  $\mu$ M) ne module pas l'expression des transcrits de la PTGS2 (COX-2) mais diminue ceux de l'IDO1 dans les macrophages pulmonaires humains polarisés M1 (**Figure 25**). Dans les macrophages pulmonaires de phénotype M2a induit par l'IL-13, le GTS-21 diminue significativement l'expression des transcrits de *MRC1* et de l'*ALOX15* (15-LOX-1) (**Figure 26**).



**Figure 25 : Effet du GTS-21 sur l'expression des transcrits de la PTGS2 et de l'IDO1 dans les macrophages pulmonaires humains polarisés M1**

Les macrophages pulmonaires ont été traités avec du GTS-21 (100  $\mu$ M) pendant 1h, suivi d'une stimulation par du LPS (10  $\text{ng.mL}^{-1}$ ) pendant 4h. L'expression relative de la PTGS2 et de l'IDO1 a été mesurée par RT-qPCR. Les résultats sont représentés sous forme de moyenne  $\pm$  s.e.m de 6 expériences indépendantes et les statistiques ont été effectuées par la méthode ANOVA suivie d'un test t. \* indique une différence significative avec le témoin LPS (\* $p < 0.01$ ).



**Figure 26 : Effet du GTS-21 sur l'expression des transcrits de MRC1 et de l'ALOX15 dans les macrophages pulmonaires humains polarisés M2a**

Les macrophages pulmonaires ont été traités avec du GTS-21 (100  $\mu\text{M}$ ) pendant 1h, suivi d'une stimulation par de l'IL-13 (50  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) pendant 24h. L'expression relative de MRC1 et de l'ALOX15 a été mesurée par RT-qPCR. Les résultats sont représentés sous forme de moyenne  $\pm$  s.e.m de 3 expériences indépendantes et les statistiques ont été effectuées par la méthode ANOVA suivie d'un test t. \* indique une différence significative avec le témoin IL-13 (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ).

## **Discussion**

Nos résultats ont montré que la sous-unité  $\alpha 7$  du récepteur nicotinique est exprimée au niveau transcriptionnel et protéique dans les macrophages pulmonaires humains. La stimulation des récepteurs nicotiniques par des agonistes partiels tels que le GTS-21 et son métabolite le 4-OH-GTS-21 inhibe de manière concentration-dépendante et significative l'expression et la production des cytokines M1 induites par le LPS (TNF- $\alpha$ , CCL2, CCL3, CCL4, CXCL1 et CXCL8) et des cytokines M2a induites par l'IL-13 (CCL13, CCL18 et CCL22). Ces résultats ont été renforcés par l'utilisation d'un second agoniste partiel des récepteurs nicotiniques  $\alpha 7$ , l'EVP-6124, qui induit également une diminution de la production des cytokines M1 et M2a dans les macrophages pulmonaires humains. En revanche, l'exposition des macrophages pulmonaires polarisés M1 et M2a à d'autres agonistes nicotiniques  $\alpha 7$  (acétylcholine, AR-R17779, PNU 282987, SEN 12333, TC 1698, nicotine et varénicline) n'a eu aucun effet sur la modulation de la production des cytokines M1/M2a. De plus, nous n'avons pas observé d'effet inhibiteur d'un antagoniste spécifique ( $\alpha$ -bungarotoxine) et d'un antagoniste non spécifique (méthyllycaconitine) du récepteur nicotinique  $\alpha 7$  sur les effets du GTS-21 et de l'EVP-6124 dans la régulation de la production des cytokines M1 et M2a. Néanmoins, nous avons observé que l' $\alpha$ -bungarotoxine augmente la production des cytokines M1 pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , CCL2, CCL3, CCL4 et CXCL8) dans les macrophages pulmonaires humains M1. Ces résultats pourraient être expliqués par l'existence de sites de liaison distincts au niveau de récepteur nicotinique  $\alpha 7$  entre les différents agonistes et antagonistes ;ou par la liaison au récepteur chimérique dup $\alpha 7$ .

En complément des résultats de l'article 3, nous avons montré que les macrophages pulmonaires humains expriment le récepteur dup $\alpha 7$ . L'expression de ce récepteur est uniquement retrouvée chez l'Homme au niveau du système nerveux central, des leucocytes (Villiger *et al.*, 2002) et des macrophages dérivés de monocytes humains (Gault *et al.*, 1998; Araud *et al.*, 2011; de Lucas-Cerrillo *et al.*, 2011) ainsi que dans les lignées cellulaires de monocytes (THP-1, U937 et Mono-Mac-6) (Benfante *et al.*, 2011). Le gène codant pour ce récepteur ne possède pas les exons codant pour le site de fixation de l' $\alpha$ -bungarotoxine, ce qui pourrait expliquer l'absence d'effet inhibiteur de l' $\alpha$ -bungarotoxine sur le GTS-21 et l'EVP-6124 si ces agonistes agissaient *via* le récepteur dup $\alpha 7$ . Dans la littérature, la stimulation de ce récepteur dup $\alpha 7$  par de la nicotine n'a pas montré d'activité sur le courant électrique, normalement généré par la stimulation des récepteurs nicotiniques  $\alpha 7$  fonctionnels (Villiger *et al.*, 2002). De manière intéressante, une étude a montré que l'expression du récepteur dup $\alpha 7$

dans les leucocytes régule de manière négative la fonctionnalité du récepteur nicotinique  $\alpha 7$  (de Lucas-Cerrillo *et al.*, 2011). Nos travaux ont également montré que l'expression de ce récepteur dup $\alpha 7$  était induite en présence de LPS 10 ng.mL<sup>-1</sup>. A l'inverse, dans les macrophages dérivés de monocytes humains, l'expression du dup $\alpha 7$  est inhibée en présence de LPS, mais à une concentration 10 fois supérieur à la notre (de Lucas-Cerrillo *et al.*, 2011).

La découverte de ce récepteur dup $\alpha 7$  est assez récente et il n'existe aujourd'hui aucun agoniste ou antagoniste spécifique de ce dernier. Afin de déterminer la spécificité de ce récepteur dans la modulation de la production des cytokines M1/M2a, nous avons réalisé des études de transfection *in vitro* de siRNA dirigé contre le gène *CHRFAM7A*. Mais comme observé précédemment pour d'autres gènes, la technique de transfection n'a pas été efficace sur l'inhibition de l'expression du gène *CHRFAM7A*. Par conséquent, nous ne pouvons aujourd'hui valider ou invalider le rôle de ce récepteur dup $\alpha 7$  dans la modulation de la production des cytokines de type M1 et M2a par les macrophages pulmonaires humains.

Les effets régulateurs du GTS-21 sur la production des cytokines M1 ne semblent pas être médiés par la production de PGE<sub>2</sub> car aucune modulation de l'expression de la *PTGS2* n'a été observée dans les macrophages pulmonaires M1 exposés au GTS-21. De même que l'inhibition de l'expression de l'IDO1 par le GTS-21 ne peut expliquer les effets inhibiteurs de cette agoniste sur la production des cytokines au regard de l'action anti-inflammatoire des kynurénines précédemment observée au sein du laboratoire UPRES EA220.

Par ailleurs, les effets régulateurs du GTS-21 sur la production des cytokines M2a pourraient passer par la voie des 15-LOX-1, dont l'expression est diminuée en présence du GTS-21 dans les macrophages pulmonaires humains M2a. Les effets régulateurs de la 15-LOX-1 sur les cytokines M2a ayant précédemment été décrits dans l'article 2.

## **Conclusions et perspectives**



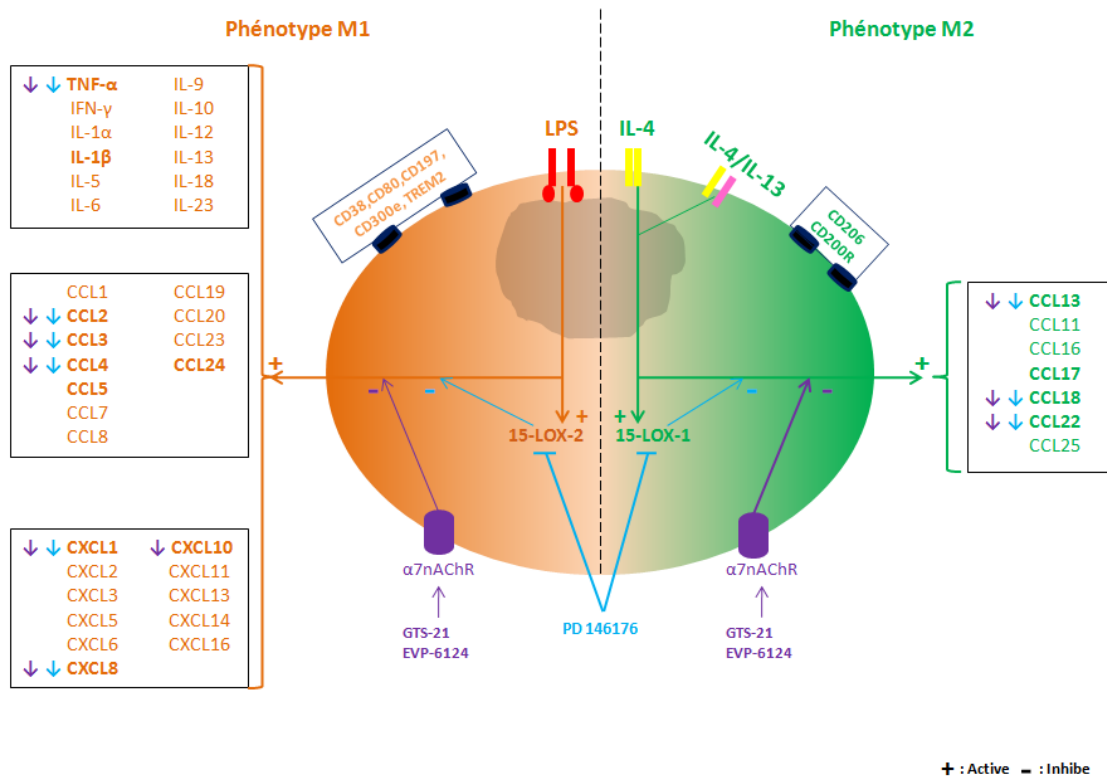
L'ensemble de ces travaux a permis de définir un profil d'expression de gènes et de protéines associé à la polarisation des macrophages pulmonaires humains induite *in vitro* par le LPS (polarisation M1) et par les cytokines Th2 (polarisation M2a). Ces travaux ont précisé les marqueurs de polarisation M1/M2a des macrophages pulmonaires humains qui diffèrent en partie de ceux observés dans des modèles de macrophages murins et de macrophages dérivés de monocytes humains. Nous avons montré que la polarisation M1 des macrophages pulmonaires était définie par une augmentation de la production des cytokines/chimiokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CCL2, 3, 4, 5, 24, CXCL1, 8, 10), de l'expression de protéines membranaires (CD38, CD80, CD197 et CD300e) et de l'expression d'enzymes impliquées dans différentes voies métaboliques (15-LOX-2 et IDO1). La polarisation M2a est associée à la production de cytokines immunorégulatrices (CCL13, CCL17, CCL18, CCL22), l'expression de marqueurs membranaires (CD206, CD200R, HPGDS) et de la 15-LOX-1. Les macrophages pulmonaires ont été obtenus à partir de pièces de lobectomie de patients opérés pour cancer ; bien que le parenchyme ait été prélevé à distance de la tumeur, le contexte clinique peut avoir influencé l'état d'activation des macrophages et les résultats obtenus après stimulation par le LPS ou les cytokines Th2. De plus, ces marqueurs identifiés après 24 heures de stimulation *in vitro* sont-ils maintenus après une plus longue stimulation (stabilité dans le temps) et sont-ils observés *in situ* ? Ces deux questions nécessitent des études complémentaires pour en valider l'intérêt physiopathologique.

La connaissance des marqueurs associés à la polarisation M1/M2 des macrophages pulmonaires humains représente un intérêt particulier pour certaines pathologies respiratoires inflammatoires comme l'asthme et la BPCO où la polarisation M1/M2 pourrait jouer un rôle physiopathologique important. Ainsi, l'identification des marqueurs M1/M2 est un élément clé dans l'étude des anomalies éventuelles de la polarisation dans ces pathologies pulmonaires. Jusqu'à présent, tant dans l'asthme que dans la BPCO, les données sur la polarisation M1/M2 restent fragmentaires et insuffisantes. Il apparaît que la BPCO ne résulterait pas de l'expression d'un phénotype en particulier mais plutôt d'une dérégulation de chaque phénotype (Shaykhiev *et al.*, 2009; Hodge *et al.*, 2011). En effet certains marqueurs M1 (CXCL9, CXCL10, CXCL11 et CCL5) et M2 (MRC1, CD31, CD44 et CD91) sont diminués alors que d'autres marqueurs M1 (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IL-12) et M2 (MMP-2, MMP-7 et ADORA3) sont quant à eux augmentés (Hodge *et al.*, 2003; Shaykhiev *et al.*, 2009; Hodge *et al.*, 2011). Une augmentation des macrophages M2 est observée chez les patients asthmatiques (Chupp *et al.*, 2007; Melgert *et al.*, 2011). L'efficacité clinique des anticorps

anti-IL-4 et anti-IL-13 chez les patients asthmatiques les plus sévères et ayant un profil Th2 suggère l'importance de ces cytokines Th2 dans la physiopathologie de la maladie asthmatique chez ces patients et potentiellement de la polarisation M2a des macrophages qui serait associée à ce profil de patients. De plus, chez les patients asthmatiques sévères, la polarisation M1 des macrophages serait corrélée à la corticorésistance. En effet, une augmentation de l'expression de cytokines M1 (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL8, CCL3, CCL4 et CCL20) est observée chez les patients asthmatiques corticorésistants (Goleva *et al.*, 2008). La mise en évidence des effets régulateurs de la 15-LOX-1 et de la 15-LOX-2 sur la production de cytokines M1/M2a en fait une cible pharmacologique d'intérêt thérapeutique potentiel dans l'asthme, compte tenu notamment de l'augmentation des métabolites des 15-lipoxygénases (Lundstrom *et al.*, 2012; Mabalirajan *et al.*, 2013). De plus, le système cholinergique non neuronal *via* les récepteurs nicotiques  $\alpha 7$  pourrait limiter l'activation des macrophages pulmonaires. Le GTS-21, un agoniste spécifique des récepteurs nicotiques  $\alpha 7$  exerce des effets anti-inflammatoires dans des modèles animaux de polyarthrite rhumatoïde (Wu *et al.*, 2014) et d'allergie de type alimentaire (Yamamoto *et al.*, 2014).

La polarisation des macrophages illustre à la fois la multiplicité des fonctions de cette cellule essentielle à l'homéostasie tissulaire, ses capacités d'adaptation à son microenvironnement et les voies de régulation de ses activités inflammatoires. Des études réalisées au sein du laboratoire UPRES EA220 montrent, en effet, au-delà du rôle des 15-lipoxygénases et des récepteurs nicotiques  $\alpha 7$  que l'adénosine, les adipokines et les kynurénines peuvent aussi réguler la polarisation M1 et M2a des macrophages pulmonaires humains. Certaines voies de régulation pourraient être sélectives d'un phénotype en particulier, comme les inhibiteurs des phosphodiésterases de type 4 (Roflumilast) qui n'agissent que sur la polarisation M1 des macrophages pulmonaires humains.

Ces études montrent la complexité et la diversité des cibles pharmacologiques pouvant réguler l'état d'activation des macrophages pulmonaires humains et tout l'intérêt d'explorer ces cibles pour mieux comprendre les voies de régulation de l'activation des macrophages pulmonaires et leur implication dans les maladies inflammatoires broncho-pulmonaires.



**Figure 27 : Schéma de synthèse reprenant les principaux marqueurs associés à la polarisation M1/M2a in vitro des macrophages pulmonaires humains**

## **Références bibliographiques**

- Adamson IY, Bowden DH (1980). Role of monocytes and interstitial cells in the generation of alveolar macrophages II. Kinetic studies after carbon loading. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 42: 518-524.
- Akira S (2009). Pathogen recognition by innate immunity and its signaling. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 85: 143-156.
- Albuquerque EX, Pereira EF, Alkondon M, Rogers SW (2009). Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 89: 73-120.
- Almatroodi SA, McDonald CF, Pouniotis DS (2014). Alveolar Macrophage Polarisation in Lung Cancer. *Lung Cancer International* 2014: 9.
- Almawi WY, Beyhum HN, Rahme AA, Rieder MJ (1996). Regulation of cytokine and cytokine receptor expression by glucocorticoids. *J Leukoc Biol* 60: 563-572.
- Amano SU, Cohen JL, Vangala P, Tencerova M, Nicoloro SM, Yawe JC, *et al.* (2014). Local proliferation of macrophages contributes to obesity-associated adipose tissue inflammation. *Cell Metab* 19: 162-171.
- Ambarus CA, Krausz S, van Eijk M, Hamann J, Radstake TR, Reedquist KA, *et al.* (2012). Systematic validation of specific phenotypic markers for in vitro polarized human macrophages. *J Immunol Methods* 375: 196-206.
- Amoruso A, Bardelli C, Gunella G, Fresu LG, Ferrero V, Brunelleschi S (2007). Quantification of PPAR-gamma protein in monocyte/macrophages from healthy smokers and non-smokers: a possible direct effect of nicotine. *Life Sci* 81: 906-915.
- Araud T, Graw S, Berger R, Lee M, Neveu E, Bertrand D, *et al.* (2011). The chimeric gene CHRFAM7A, a partial duplication of the CHRNA7 gene, is a dominant negative regulator of alpha7\*nAChR function. *Biochem Pharmacol* 82: 904-914.
- Aronoff DM, Canetti C, Peters-Golden M (2004). Prostaglandin E2 inhibits alveolar macrophage phagocytosis through an E-prostanoid 2 receptor-mediated increase in intracellular cyclic AMP. *J Immunol* 173: 559-565.
- Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F (2009). Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 27: 669-692.
- Azuma Y, Shinohara M, Wang PL, Ohura K (2001). 15-Deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J(2) inhibits IL-10 and IL-12 production by macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 283: 344-346.
- Back M, Powell WS, Dahlen SE, Drazen JM, Evans JF, Serhan CN, *et al.* (2014). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. Update on Leukotriene, Lipoxin and Oxoeicosanoid Receptors: IUPHAR Review 7. *Br J Pharmacol*.
- Bailly S, Ferrua B, Fay M, Gougerot-Pocidal MA (1990). Differential regulation of IL 6, IL 1 A, IL 1 beta and TNF alpha production in LPS-stimulated human monocytes: role of cyclic AMP. *Cytokine* 2: 205-210.

- Balce DR, Li B, Allan ER, Rybicka JM, Krohn RM, Yates RM (2011). Alternative activation of macrophages by IL-4 enhances the proteolytic capacity of their phagosomes through synergistic mechanisms. *Blood* 118: 4199-4208.
- Baraldo S, Bazzan E, Zanin ME, Turato G, Garbisa S, Maestrelli P, *et al.* (2007). Matrix metalloproteinase-2 protein in lung periphery is related to COPD progression. *Chest* 132: 1733-1740.
- Barnes PJ (2004). Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol Rev* 56: 515-548.
- Barnes PJ (2008). The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest* 118: 3546-3556.
- Benfante R, Antonini RA, De Pizzol M, Gotti C, Clementi F, Locati M, *et al.* (2011). Expression of the alpha7 nAChR subunit duplicate form (CHRFAM7A) is down-regulated in the monocytic cell line THP-1 on treatment with LPS. *J Neuroimmunol* 230: 74-84.
- Benhammou K, Lee M, Strook M, Sullivan B, Logel J, Raschen K, *et al.* (2000). [(3)H]Nicotine binding in peripheral blood cells of smokers is correlated with the number of cigarettes smoked per day. *Neuropharmacology* 39: 2818-2829.
- Benoit M, Desnues B, Mege JL (2008). Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol* 181: 3733-3739.
- Berenson CS, Garlipp MA, Grove LJ, Maloney J, Sethi S (2006). Impaired phagocytosis of nontypeable Haemophilus influenzae by human alveolar macrophages in chronic obstructive pulmonary disease. *J Infect Dis* 194: 1375-1384.
- Berry MA, Hargadon B, Shelley M, Parker D, Shaw DE, Green RH, *et al.* (2006). Evidence of a role of tumor necrosis factor alpha in refractory asthma. *N Engl J Med* 354: 697-708.
- Beyer M, Mallmann MR, Xue J, Staratschek-Jox A, Vorholt D, Krebs W, *et al.* (2012). High-resolution transcriptome of human macrophages. *PLoS One* 7: e45466.
- Bhattacharjee A, Shukla M, Yakubenko VP, Mulya A, Kundu S, Cathcart MK (2013). IL-4 and IL-13 employ discrete signaling pathways for target gene expression in alternatively activated monocytes/macrophages. *Free Radic Biol Med* 54: 1-16.
- Biswas SK, Lopez-Collazo E (2009). Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol* 30: 475-487.
- Biswas SK, Mantovani A (2010). Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol* 11: 889-896.
- Biswas SK, Gangi L, Paul S, Schioppa T, Saccani A, Sironi M, *et al.* (2006). A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF-kappaB and enhanced IRF-3/STAT1 activation). *Blood* 107: 2112-2122.

- Bitterman PB, Saltzman LE, Adelberg S, Ferrans VJ, Crystal RG (1984). Alveolar macrophage replication. One mechanism for the expansion of the mononuclear phagocyte population in the chronically inflamed lung. *J Clin Invest* 74: 460-469.
- Blanchet MR, Langlois A, Israel-Assayag E, Beaulieu MJ, Ferland C, Laviolette M, *et al.* (2007). Modulation of eosinophil activation in vitro by a nicotinic receptor agonist. *J Leukoc Biol* 81: 1245-1251.
- Bogdan C, Paik J, Vodovotz Y, Nathan C (1992). Contrasting mechanisms for suppression of macrophage cytokine release by transforming growth factor-beta and interleukin-10. *J Biol Chem* 267: 23301-23308.
- Bogdan C, Vodovotz Y, Paik J, Xie QW, Nathan C (1994). Mechanism of suppression of nitric oxide synthase expression by interleukin-4 in primary mouse macrophages. *J Leukoc Biol* 55: 227-233.
- Boorsma CE, Draijer C, Melgert BN (2013). Macrophage heterogeneity in respiratory diseases. *Mediators Inflamm* 2013: 769214.
- Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, *et al.* (2000). Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 405: 458-462.
- Bost KL, Clements JD (1997). Intracellular *Salmonella dublin* induces substantial secretion of the 40-kilodalton subunit of interleukin-12 (IL-12) but minimal secretion of IL-12 as a 70-kilodalton protein in murine macrophages. *Infect Immun* 65: 3186-3192.
- Bozza FA, Salluh JJ, Japiassu AM, Soares M, Assis EF, Gomes RN, *et al.* (2007). Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. *Crit Care* 11: R49.
- Bradding P, Redington AE, Djukanovic R, Conrad DJ, Holgate ST (1995). 15-lipoxygenase immunoreactivity in normal and in asthmatic airways. *Am J Respir Crit Care Med* 151: 1201-1204.
- Brancato SK, Albina JE (2011). Wound macrophages as key regulators of repair: origin, phenotype, and function. *Am J Pathol* 178: 19-25.
- Brckalo T, Calzetti F, Perez-Cabezas B, Borrás FE, Cassatella MA, Lopez-Botet M (2010). Functional analysis of the CD300e receptor in human monocytes and myeloid dendritic cells. *Eur J Immunol* 40: 722-732.
- Briggs CA, McKenna DG (1998). Activation and inhibition of the human alpha7 nicotinic acetylcholine receptor by agonists. *Neuropharmacology* 37: 1095-1102.
- Brown CD, Kilty I, Yeadon M, Jenkinson S (2001). Regulation of 15-lipoxygenase isozymes and mucin secretion by cytokines in cultured normal human bronchial epithelial cells. *Inflamm Res* 50: 321-326.
- Brune B, Dehne N, Grossmann N, Jung M, Namgaladze D, Schmid T, *et al.* (2013). Redox control of inflammation in macrophages. *Antioxid Redox Signal* 19: 595-637.

- Buenestado A, Grassin-Delyle S, Guitard F, Naline E, Faisy C, Israel-Biet D, *et al.* (2012). Roflumilast inhibits the release of chemokines and TNF-alpha from human lung macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *Br J Pharmacol* 165: 1877-1890.
- Canton J (2014). Phagosome maturation in polarized macrophages. *J Leukoc Biol.*
- Cassetta L, Cassol E, Poli G (2011). Macrophage polarization in health and disease. *ScientificWorldJournal* 11: 2391-2402.
- Cassetta L, Kajaste-Rudnitski A, Coradin T, Saba E, Della Chiara G, Barbagallo M, *et al.* (2013). M1 polarization of human monocyte-derived macrophages restricts pre and postintegration steps of HIV-1 replication. *AIDS* 27: 1847-1856.
- Cassol E, Cassetta L, Alfano M, Poli G (2010). Macrophage polarization and HIV-1 infection. *J Leukoc Biol* 87: 599-608.
- Cassol E, Cassetta L, Rizzi C, Alfano M, Poli G (2009). M1 and M2a polarization of human monocyte-derived macrophages inhibits HIV-1 replication by distinct mechanisms. *J Immunol* 182: 6237-6246.
- Cenci E, Romani L, Mencacci A, Spaccapelo R, Schiaffella E, Puccetti P, *et al.* (1993). Interleukin-4 and interleukin-10 inhibit nitric oxide-dependent macrophage killing of *Candida albicans*. *Eur J Immunol* 23: 1034-1038.
- Chacon-Salinas R, Serafin-Lopez J, Ramos-Payan R, Mendez-Aragon P, Hernandez-Pando R, Van Soolingen D, *et al.* (2005). Differential pattern of cytokine expression by macrophages infected in vitro with different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clin Exp Immunol* 140: 443-449.
- Chaitidis P, O'Donnell V, Kuban RJ, Bermudez-Fajardo A, Ungethuen U, Kuhn H (2005). Gene expression alterations of human peripheral blood monocytes induced by medium-term treatment with the TH2-cytokines interleukin-4 and -13. *Cytokine* 30: 366-377.
- Chen EP, Smyth EM (2011). COX-2 and PGE2-dependent immunomodulation in breast cancer. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 96: 14-20.
- Chen JJ, Yao PL, Yuan A, Hong TM, Shun CT, Kuo ML, *et al.* (2003). Up-regulation of tumor interleukin-8 expression by infiltrating macrophages: its correlation with tumor angiogenesis and patient survival in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 9: 729-737.
- Cherayil BJ, McCormick BA, Bosley J (2000). *Salmonella enterica* serovar typhimurium-dependent regulation of inducible nitric oxide synthase expression in macrophages by invasins SipB, SipC, and SipD and effector SopE2. *Infect Immun* 68: 5567-5574.
- Chernyavsky AI, Arredondo J, Skok M, Grando SA (2010). Auto/paracrine control of inflammatory cytokines by acetylcholine in macrophage-like U937 cells through nicotinic receptors. *Int Immunopharmacol* 10: 308-315.



- Cheshire JL, Baldwin AS, Jr. (1997). Synergistic activation of NF-kappaB by tumor necrosis factor alpha and gamma interferon via enhanced I kappaB alpha degradation and de novo I kappaBbeta degradation. *Mol Cell Biol* 17: 6746-6754.
- Chieppa M, Bianchi G, Doni A, Del Prete A, Sironi M, Laskarin G, *et al.* (2003). Cross-linking of the mannose receptor on monocyte-derived dendritic cells activates an anti-inflammatory immunosuppressive program. *J Immunol* 171: 4552-4560.
- Chinetti-Gbaguidi G, Staels B (2011). Macrophage polarization in metabolic disorders: functions and regulation. *Curr Opin Lipidol* 22: 365-372.
- Chu HW, Balzar S, Westcott JY, Trudeau JB, Sun Y, Conrad DJ, *et al.* (2002). Expression and activation of 15-lipoxygenase pathway in severe asthma: relationship to eosinophilic phenotype and collagen deposition. *Clin Exp Allergy* 32: 1558-1565.
- Chung FT, Lee KY, Wang CW, Heh CC, Chan YF, Chen HW, *et al.* (2012). Tumor-associated macrophages correlate with response to epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors in advanced non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 131: E227-235.
- Chupp GL, Lee CG, Jarjour N, Shim YM, Holm CT, He S, *et al.* (2007). A chitinase-like protein in the lung and circulation of patients with severe asthma. *N Engl J Med* 357: 2016-2027.
- Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, *et al.* (2005). Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res* 46: 2347-2355.
- Couturier S, Bertrand D, Matter JM, Hernandez MC, Bertrand S, Millar N, *et al.* (1990). A neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit (alpha 7) is developmentally regulated and forms a homo-oligomeric channel blocked by alpha-BTX. *Neuron* 5: 847-856.
- Curtale G, Mirolò M, Renzi TA, Rossato M, Bazzoni F, Locati M (2013). Negative regulation of Toll-like receptor 4 signaling by IL-10-dependent microRNA-146b. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 11499-11504.
- Dalli J, Serhan CN (2012). Specific lipid mediator signatures of human phagocytes: microparticles stimulate macrophage efferocytosis and pro-resolving mediators. *Blood* 120: e60-72.
- Danielsson KN, Rydberg EK, Ingelsten M, Akyurek LM, Jirholt P, Ullstrom C, *et al.* (2008). 15-Lipoxygenase-2 expression in human macrophages induces chemokine secretion and T cell migration. *Atherosclerosis* 199: 34-40.
- Darmani H, Parton J, Harwood JL, Jackson SK (1994). Interferon-gamma and polyunsaturated fatty acids increase the binding of lipopolysaccharide to macrophages. *Int J Exp Pathol* 75: 363-368.
- Dasgupta P, Keegan AD (2012). Contribution of alternatively activated macrophages to allergic lung inflammation: a tale of mice and men. *J Innate Immun* 4: 478-488.

- David Dong ZM, Aplin AC, Nicosia RF (2009). Regulation of angiogenesis by macrophages, dendritic cells, and circulating myelomonocytic cells. *Current pharmaceutical design* 15: 365-379.
- de Jonge WJ, Ulloa L (2007). The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor as a pharmacological target for inflammation. *Br J Pharmacol* 151: 915-929.
- de Jonge WJ, van der Zanden EP, The FO, Bijlsma MF, van Westerloo DJ, Bennink RJ, *et al.* (2005). Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway. *Nat Immunol* 6: 844-851.
- de Lucas-Cerrillo AM, Maldifassi MC, Arnalich F, Renart J, Atienza G, Serantes R, *et al.* (2011). Function of partially duplicated human alpha77 nicotinic receptor subunit CHRFAM7A gene: potential implications for the cholinergic anti-inflammatory response. *J Biol Chem* 286: 594-606.
- de Nadai P, Charbonnier AS, Chenivesse C, Senechal S, Fournier C, Gilet J, *et al.* (2006). Involvement of CCL18 in allergic asthma. *J Immunol* 176: 6286-6293.
- Degraaf AJ, Zaslona Z, Bourdonnay E, Peters-Golden M (2014). Prostaglandin e2 reduces toll-like receptor 4 expression in alveolar macrophages by inhibition of translation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 51: 242-250.
- Demirjian L, Abboud RT, Li H, Duronio V (2006). Acute effect of cigarette smoke on TNF-alpha release by macrophages mediated through the erk1/2 pathway. *Biochim Biophys Acta* 1762: 592-597.
- Derynck R, Zhang YE (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425: 577-584.
- Dhillon NK, Murphy WJ, Filla MB, Crespo AJ, Latham HA, O'Brien-Ladner A (2009). Down modulation of IFN-gamma signaling in alveolar macrophages isolated from smokers. *Toxicol Appl Pharmacol* 237: 22-28.
- Di Stefano A, Capelli A, Lusuardi M, Balbo P, Vecchio C, Maestrelli P, *et al.* (1998). Severity of airflow limitation is associated with severity of airway inflammation in smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 158: 1277-1285.
- Divanovic S, Trompette A, Atabani SF, Madan R, Golenbock DT, Visintin A, *et al.* (2005). Negative regulation of Toll-like receptor 4 signaling by the Toll-like receptor homolog RP105. *Nat Immunol* 6: 571-578.
- Dobrian AD, Lieb DC, Cole BK, Taylor-Fishwick DA, Chakrabarti SK, Nadler JL (2011). Functional and pathological roles of the 12- and 15-lipoxygenases. *Prog Lipid Res* 50: 115-131.
- Draijer C, Robbe P, Boorsma CE, Hylkema MN, Melgert BN (2013). Characterization of macrophage phenotypes in three murine models of house-dust-mite-induced asthma. *Mediators Inflamm* 2013: 632049.

- Eantuzzi L, Eid P, Malorni W, Rainaldi G, Gauzzi MC, Pellegrini S, *et al.* (1997). Post-translational up-regulation of the cell surface-associated alpha component of the human type I interferon receptor during differentiation of peripheral blood monocytes: role in the biological response to type I interferon. *Eur J Immunol* 27: 1075-1081.
- Edwards JP, Zhang X, Frauwirth KA, Mosser DM (2006). Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J Leukoc Biol* 80: 1298-1307.
- Ehrchen J, Steinmuller L, Barczyk K, Tenbrock K, Nacken W, Eisenacher M, *et al.* (2007). Glucocorticoids induce differentiation of a specifically activated, anti-inflammatory subtype of human monocytes. *Blood* 109: 1265-1274.
- Endo T, Ogushi F, Kawano T, Sone S (1998). Comparison of the regulations by Th2-type cytokines of the arachidonic-acid metabolic pathway in human alveolar macrophages and monocytes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19: 300-307.
- Evans MJ, Shami SG, Martinez LA (1986). Enhanced proliferation of pulmonary alveolar macrophages after carbon instillation in mice depleted of blood monocytes by strontium-89. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 54: 154-159.
- Fantuzzi L, Borghi P, Ciolli V, Pavlakis G, Belardelli F, Gessani S (1999). Loss of CCR2 expression and functional response to monocyte chemoattractant protein (MCP-1) during the differentiation of human monocytes: role of secreted MCP-1 in the regulation of the chemotactic response. *Blood* 94: 875-883.
- Fels AO, Pawlowski NA, Cramer EB, King TK, Cohn ZA, Scott WA (1982). Human alveolar macrophages produce leukotriene B4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 7866-7870.
- Fenton MJ, Buras JA, Donnelly RP (1992). IL-4 reciprocally regulates IL-1 and IL-1 receptor antagonist expression in human monocytes. *J Immunol* 149: 1283-1288.
- Fenton MJ, Vermeulen MW, Kim S, Burdick M, Strieter RM, Kornfeld H (1997). Induction of gamma interferon production in human alveolar macrophages by Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun* 65: 5149-5156.
- Fernandez S, Jose P, Avdiushko MG, Kaplan AM, Cohen DA (2004). Inhibition of IL-10 receptor function in alveolar macrophages by Toll-like receptor agonists. *J Immunol* 172: 2613-2620.
- Ferracini M, Rios FJ, Pecenin M, Jancar S (2013). Clearance of apoptotic cells by macrophages induces regulatory phenotype and involves stimulation of CD36 and platelet-activating factor receptor. *Mediators Inflamm* 2013: 950273.
- Flomen RH, Collier DA, Osborne S, Munro J, Breen G, St Clair D, *et al.* (2006). Association study of CHRFAM7A copy number and 2 bp deletion polymorphisms with schizophrenia and bipolar affective disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 141B: 571-575.
- Galvis G, Lips KS, Kummer W (2006). Expression of nicotinic acetylcholine receptors on murine alveolar macrophages. *J Mol Neurosci* 30: 107-108.

- Gao JJ, Zuvanich EG, Xue Q, Horn DL, Silverstein R, Morrison DC (1999). Cutting edge: bacterial DNA and LPS act in synergy in inducing nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. *J Immunol* 163: 4095-4099.
- Gao X, Dong Y, Liu Z, Niu B (2013). Silencing of triggering receptor expressed on myeloid cells-2 enhances the inflammatory responses of alveolar macrophages to lipopolysaccharide. *Molecular medicine reports* 7: 921-926.
- Gault J, Robinson M, Berger R, Drebing C, Logel J, Hopkins J, *et al.* (1998). Genomic organization and partial duplication of the human alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor gene (CHRNA7). *Genomics* 52: 173-185.
- Gerber JS, Mosser DM (2001). Reversing lipopolysaccharide toxicity by ligating the macrophage Fc gamma receptors. *J Immunol* 166: 6861-6868.
- Godson C, Mitchell S, Harvey K, Petasis NA, Hogg N, Brady HR (2000). Cutting edge: lipoxins rapidly stimulate nonphlogistic phagocytosis of apoptotic neutrophils by monocyte-derived macrophages. *J Immunol* 164: 1663-1667.
- Golde DW, Byers LA, Finley TN (1974). Proliferative capacity of human alveolar macrophage. *Nature* 247: 373-375.
- Goleva E, Hauk PJ, Hall CF, Liu AH, Riches DW, Martin RJ, *et al.* (2008). Corticosteroid-resistant asthma is associated with classical antimicrobial activation of airway macrophages. *J Allergy Clin Immunol* 122: 550-559 e553.
- Gordon S (2002). Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* 111: 927-930.
- Gordon S (2003). Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3: 23-35.
- Gordon S, Taylor PR (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5: 953-964.
- Gordon S, Martinez FO (2010). Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 32: 593-604.
- Gosens R, Zaagsma J, Meurs H, Halayko AJ (2006). Muscarinic receptor signaling in the pathophysiology of asthma and COPD. *Respir Res* 7: 73.
- Gras D, Bourdin A, Vachier I, de Senneville L, Bonnans C, Chanez P (2012). An ex vivo model of severe asthma using reconstituted human bronchial epithelium. *J Allergy Clin Immunol* 129: 1259-1266 e1251.
- Gratchev A, Guillot P, Hakiy N, Politz O, Orfanos CE, Schledzewski K, *et al.* (2001). Alternatively activated macrophages differentially express fibronectin and its splice variants and the extracellular matrix protein beta1G-H3. *Scand J Immunol* 53: 386-392.

- Gregus AM, Dumlao DS, Wei SC, Norris PC, Catella LC, Meyerstein FG, *et al.* (2013). Systematic analysis of rat 12/15-lipoxygenase enzymes reveals critical role for spinal eLOX3 hepxilin synthase activity in inflammatory hyperalgesia. *FASEB J* 27: 1939-1949.
- Gundra UM, Girgis NM, Ruckerl D, Jenkins S, Ward LN, Kurtz ZD, *et al.* (2014). Alternatively activated macrophages derived from monocytes and tissue macrophages are phenotypically and functionally distinct. *Blood* 123: e110-122.
- Gwilt CR, Donnelly LE, Rogers DF (2007). The non-neuronal cholinergic system in the airways: an unappreciated regulatory role in pulmonary inflammation? *Pharmacol Ther* 115: 208-222.
- Hallstrand TS, Wurfel MM, Lai Y, Ni Z, Gelb MH, Altemeier WA, *et al.* (2010). Transglutaminase 2, a novel regulator of eicosanoid production in asthma revealed by genome-wide expression profiling of distinct asthma phenotypes. *PLoS One* 5: e8583.
- Hamano R, Takahashi HK, Iwagaki H, Yoshino T, Nishibori M, Tanaka N (2006). Stimulation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor inhibits CD14 and the toll-like receptor 4 expression in human monocytes. *Shock* 26: 358-364.
- Hedrick JA, Helms A, Vicari A, Zlotnik A (1998). Characterization of a novel CC chemokine, HCC-4, whose expression is increased by interleukin-10. *Blood* 91: 4242-4247.
- Heller NM, Qi X, Junttila IS, Shirey KA, Vogel SN, Paul WE, *et al.* (2008). Type I IL-4Rs selectively activate IRS-2 to induce target gene expression in macrophages. *Sci Signal* 1: ra17.
- Herbein G, Varin A (2010). The macrophage in HIV-1 infection: from activation to deactivation? *Retrovirology* 7: 33.
- Herbert DR, Holscher C, Mohrs M, Arendse B, Schwegmann A, Radwanska M, *et al.* (2004). Alternative macrophage activation is essential for survival during schistosomiasis and downmodulates T helper 1 responses and immunopathology. *Immunity* 20: 623-635.
- Hiemke C, Stolp M, Reuss S, Wevers A, Reinhardt S, Maelicke A, *et al.* (1996). Expression of alpha subunit genes of nicotinic acetylcholine receptors in human lymphocytes. *Neurosci Lett* 214: 171-174.
- Hodge S, Hodge G, Scicchitano R, Reynolds PN, Holmes M (2003). Alveolar macrophages from subjects with chronic obstructive pulmonary disease are deficient in their ability to phagocytose apoptotic airway epithelial cells. *Immunol Cell Biol* 81: 289-296.
- Hodge S, Matthews G, Mukaro V, Ahern J, Shivam A, Hodge G, *et al.* (2011). Cigarette smoke-induced changes to alveolar macrophage phenotype and function are improved by treatment with procysteine. *Am J Respir Cell Mol Biol* 44: 673-681.
- Huang JT, Welch JS, Ricote M, Binder CJ, Willson TM, Kelly C, *et al.* (1999). Interleukin-4-dependent production of PPAR-gamma ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. *Nature* 400: 378-382.

- Huang SC, Everts B, Ivanova Y, O'Sullivan D, Nascimento M, Smith AM, *et al.* (2014). Cell-intrinsic lysosomal lipolysis is essential for alternative activation of macrophages. *Nat Immunol* 15: 846-855.
- Hunninghake GW, Gadek JE, Kawanami O, Ferrans VJ, Crystal RG (1979). Inflammatory and immune processes in the human lung in health and disease: evaluation by bronchoalveolar lavage. *Am J Pathol* 97: 149-206.
- Hussell T, Bell TJ (2014). Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. *Nat Rev Immunol* 14: 81-93.
- Italiani P, Mazza EM, Lucchesi D, Cifola I, Gemelli C, Grande A, *et al.* (2014). Transcriptomic profiling of the development of the inflammatory response in human monocytes in vitro. *PLoS One* 9: e87680.
- Jaguin M, Houlbert N, Fardel O, Lecureur V (2013). Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. *Cell Immunol* 281: 51-61.
- Jayawickreme SP, Gray T, Nettesheim P, Eling T (1999). Regulation of 15-lipoxygenase expression and mucus secretion by IL-4 in human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol* 276: L596-603.
- Jenkins SJ, Allen JE (2010). Similarity and diversity in macrophage activation by nematodes, trematodes, and cestodes. *J Biomed Biotechnol* 2010: 262609.
- Jenkins SJ, Ruckerl D, Cook PC, Jones LH, Finkelman FD, van Rooijen N, *et al.* (2011). Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. *Science* 332: 1284-1288.
- Jeyaseelan S, Manzer R, Young SK, Yamamoto M, Akira S, Mason RJ, *et al.* (2005). Toll-IL-1 receptor domain-containing adaptor protein is critical for early lung immune responses against *Escherichia coli* lipopolysaccharide and viable *Escherichia coli*. *J Immunol* 175: 7484-7495.
- Johansen JS, Jensen BV, Roslind A, Price PA (2007). Is YKL-40 a new therapeutic target in cancer? *Expert Opin Ther Targets* 11: 219-234.
- Jouanguy E, Doffinger R, Dupuis S, Pallier A, Altare F, Casanova JL (1999). IL-12 and IFN-gamma in host defense against mycobacteria and salmonella in mice and men. *Curr Opin Immunol* 11: 346-351.
- Jung JY, Madan-Lala R, Georgieva M, Rengarajan J, Sohaskey CD, Bange FC, *et al.* (2013). The intracellular environment of human macrophages that produce nitric oxide promotes growth of mycobacteria. *Infect Immun* 81: 3198-3209.
- Kang K, Reilly SM, Karabacak V, Gangl MR, Fitzgerald K, Hatano B, *et al.* (2008). Adipocyte-derived Th2 cytokines and myeloid PPARdelta regulate macrophage polarization and insulin sensitivity. *Cell Metab* 7: 485-495.

- Kar Mahapatra S, Bhattacharjee S, Chakraborty SP, Majumdar S, Roy S (2011). Alteration of immune functions and Th1/Th2 cytokine balance in nicotine-induced murine macrophages: immunomodulatory role of eugenol and N-acetylcysteine. *Int Immunopharmacol* 11: 485-495.
- Karimi K, Sarir H, Mortaz E, Smit JJ, Hosseini H, De Kimpe SJ, *et al.* (2006). Toll-like receptor-4 mediates cigarette smoke-induced cytokine production by human macrophages. *Respir Res* 7: 66.
- Kaufmann A, Salentin R, Gerns D, Sprenger H (2001). Increase of CCR1 and CCR5 expression and enhanced functional response to MIP-1 alpha during differentiation of human monocytes to macrophages. *J Leukoc Biol* 69: 248-252.
- Kawashima K, Fujii T, Moriwaki Y, Misawa H (2012). Critical roles of acetylcholine and the muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors in the regulation of immune function. *Life Sci* 91: 1027-1032.
- Khan MA, Farkhondeh M, Crombie J, Jacobson L, Kaneki M, Martyn JA (2012). Lipopolysaccharide upregulates alpha7 acetylcholine receptors: stimulation with GTS-21 mitigates growth arrest of macrophages and improves survival in burned mice. *Shock* 38: 213-219.
- Kilty I, Logan A, Vickers PJ (1999). Differential characteristics of human 15-lipoxygenase isozymes and a novel splice variant of 15S-lipoxygenase. *Eur J Biochem* 266: 83-93.
- Kim EY, Battaile JT, Patel AC, You Y, Agapov E, Grayson MH, *et al.* (2008). Persistent activation of an innate immune response translates respiratory viral infection into chronic lung disease. *Nat Med* 14: 633-640.
- Kim HB, Kim CK, Iijima K, Kobayashi T, Kita H (2009). Protein microarray analysis in patients with asthma: elevation of the chemokine PARC/CCL18 in sputum. *Chest* 135: 295-302.
- Kim YK, Oh SY, Jeon SG, Park HW, Lee SY, Chun EY, *et al.* (2007). Airway exposure levels of lipopolysaccharide determine type 1 versus type 2 experimental asthma. *J Immunol* 178: 5375-5382.
- Koarai A, Traves SL, Fenwick PS, Brown SM, Chana KK, Russell RE, *et al.* (2012). Expression of muscarinic receptors by human macrophages. *Eur Respir J* 39: 698-704.
- Koning N, van Eijk M, Pouwels W, Brouwer MS, Voehringer D, Huitinga I, *et al.* (2010). Expression of the inhibitory CD200 receptor is associated with alternative macrophage activation. *J Innate Immun* 2: 195-200.
- Kox M, van Velzen JF, Pompe JC, Hoedemaekers CW, van der Hoeven JG, Pickkers P (2009). GTS-21 inhibits pro-inflammatory cytokine release independent of the Toll-like receptor stimulated via a transcriptional mechanism involving JAK2 activation. *Biochem Pharmacol* 78: 863-872.

- Kox M, Pompe JC, Gordinou de Gouberville MC, van der Hoeven JG, Hoedemaekers CW, Pickkers P (2011a). Effects of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonist GTS-21 on the innate immune response in humans. *Shock* 36: 5-11.
- Kox M, Pompe JC, Peters E, Vaneker M, van der Laak JW, van der Hoeven JG, *et al.* (2011b). alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonist GTS-21 attenuates ventilator-induced tumour necrosis factor-alpha production and lung injury. *Br J Anaesth* 107: 559-566.
- Kraaij MD, Koekkoek KM, van der Kooij SW, Gelderman KA, van Kooten C (2013). Subsets of human type 2 macrophages show differential capacity to produce reactive oxygen species. *Cell Immunol* 284: 1-8.
- Krausgruber T, Blazek K, Smallie T, Alzabin S, Lockstone H, Sahgal N, *et al.* (2011). IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nat Immunol* 12: 231-238.
- Kuhn H, Barnett J, Grunberger D, Baecker P, Chow J, Nguyen B, *et al.* (1993). Overexpression, purification and characterization of human recombinant 15-lipoxygenase. *Biochim Biophys Acta* 1169: 80-89.
- Laing KJ, Secombes CJ (2004). Chemokines. *Developmental and comparative immunology* 28: 443-460.
- Landsman L, Jung S (2007). Lung macrophages serve as obligatory intermediate between blood monocytes and alveolar macrophages. *J Immunol* 179: 3488-3494.
- Lang R, Patel D, Morris JJ, Rutschman RL, Murray PJ (2002). Shaping gene expression in activated and resting primary macrophages by IL-10. *J Immunol* 169: 2253-2263.
- Lanier LL (2009). DAP10- and DAP12-associated receptors in innate immunity. *Immunol Rev* 227: 150-160.
- Levy BD, Serhan CN (2014). Resolution of acute inflammation in the lung. *Annu Rev Physiol* 76: 467-492.
- Levy BD, Clish CB, Schmidt B, Gronert K, Serhan CN (2001). Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nat Immunol* 2: 612-619.
- Levy BD, Romano M, Chapman HA, Reilly JJ, Drazen J, Serhan CN (1993). Human alveolar macrophages have 15-lipoxygenase and generate 15(S)-hydroxy-5,8,11-cis-13-trans-eicosatetraenoic acid and lipoxins. *J Clin Invest* 92: 1572-1579.
- Li J, Pritchard DK, Wang X, Park DR, Bumgarner RE, Schwartz SM, *et al.* (2007). cDNA microarray analysis reveals fundamental differences in the expression profiles of primary human monocytes, monocyte-derived macrophages, and alveolar macrophages. *J Leukoc Biol* 81: 328-335.
- Liu C, Xu D, Liu L, Schain F, Brunnstrom A, Bjorkholm M, *et al.* (2009). 15-Lipoxygenase-1 induces expression and release of chemokines in cultured human lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297: L196-203.



- Liu Y, Stewart KN, Bishop E, Marek CJ, Kluth DC, Rees AJ, *et al.* (2008). Unique expression of suppressor of cytokine signaling 3 is essential for classical macrophage activation in rodents in vitro and in vivo. *J Immunol* 180: 6270-6278.
- Lohmann-Matthes ML, Steinmuller C, Franke-Ullmann G (1994). Pulmonary macrophages. *Eur Respir J* 7: 1678-1689.
- Louis CA, Mody V, Henry WL, Jr., Reichner JS, Albina JE (1999). Regulation of arginase isoforms I and II by IL-4 in cultured murine peritoneal macrophages. *Am J Physiol* 276: R237-242.
- Lukacs NW, Strieter RM, Chensue SW, Widmer M, Kunkel SL (1995). TNF-alpha mediates recruitment of neutrophils and eosinophils during airway inflammation. *J Immunol* 154: 5411-5417.
- Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR (2007). Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 117: 175-184.
- Lundstrom SL, Yang J, Kallberg HJ, Thunberg S, Gafvelin G, Haeggstrom JZ, *et al.* (2012). Allergic asthmatics show divergent lipid mediator profiles from healthy controls both at baseline and following birch pollen provocation. *PLoS One* 7: e33780.
- Ma J, Liu L, Che G, Yu N, Dai F, You Z (2010). The M1 form of tumor-associated macrophages in non-small cell lung cancer is positively associated with survival time. *BMC Cancer* 10: 112.
- Mabalirajan U, Rehman R, Ahmad T, Kumar S, Leishangthem GD, Singh S, *et al.* (2013). 12/15-lipoxygenase expressed in non-epithelial cells causes airway epithelial injury in asthma. *Scientific reports* 3: 1540.
- MacMicking J, Xie QW, Nathan C (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 15: 323-350.
- Mages J, Dietrich H, Lang R (2007). A genome-wide analysis of LPS tolerance in macrophages. *Immunobiology* 212: 723-737.
- Magnusson LU, Lundqvist A, Karlsson MN, Skalen K, Levin M, Wiklund O, *et al.* (2012). Arachidonate 15-lipoxygenase type B knockdown leads to reduced lipid accumulation and inflammation in atherosclerosis. *PLoS One* 7: e43142.
- Mak JC, Barnes PJ (1990). Autoradiographic visualization of muscarinic receptor subtypes in human and guinea pig lung. *Am Rev Respir Dis* 141: 1559-1568.
- Mancuso P, Standiford TJ, Marshall T, Peters-Golden M (1998). 5-Lipoxygenase reaction products modulate alveolar macrophage phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun* 66: 5140-5146.
- Mantegazza AR, Magalhaes JG, Amigorena S, Marks MS (2013). Presentation of phagocytosed antigens by MHC class I and II. *Traffic* 14: 135-152.

- Mantovani A, Locati M, Vecchi A, Sozzani S, Allavena P (2001). Decoy receptors: a strategy to regulate inflammatory cytokines and chemokines. *Trends Immunol* 22: 328-336.
- Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 23: 549-555.
- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 25: 677-686.
- Martinez-Pomares L, Reid DM, Brown GD, Taylor PR, Stillion RJ, Linehan SA, *et al.* (2003). Analysis of mannose receptor regulation by IL-4, IL-10, and proteolytic processing using novel monoclonal antibodies. *J Leukoc Biol* 73: 604-613.
- Martinez FO, Helming L, Gordon S (2009). Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol* 27: 451-483.
- Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A (2006). Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J Immunol* 177: 7303-7311.
- Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M (2008). Macrophage activation and polarization. *Front Biosci* 13: 453-461.
- Martinez FO, Helming L, Milde R, Varin A, Melgert BN, Draijer C, *et al.* (2013). Genetic programs expressed in resting and IL-4 alternatively activated mouse and human macrophages: similarities and differences. *Blood* 121: e57-69.
- McKay LI, Cidlowski JA (1999). Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocr Rev* 20: 435-459.
- Melgert BN, ten Hacken NH, Rutgers B, Timens W, Postma DS, Hylkema MN (2011). More alternative activation of macrophages in lungs of asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol* 127: 831-833.
- Menard G, Bissonnette EY (2000). Priming of alveolar macrophages by leukotriene D(4): potentiation of inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 23: 572-577.
- Meyer EM, Tay ET, Zoltewicz JA, Meyers C, King MA, Papke RL, *et al.* (1998). Neuroprotective and memory-related actions of novel alpha-7 nicotinic agents with different mixed agonist/antagonist properties. *J Pharmacol Exp Ther* 284: 1026-1032.
- Middleton MK, Rubinstein T, Pure E (2006). Cellular and molecular mechanisms of the selective regulation of IL-12 production by 12/15-lipoxygenase. *J Immunol* 176: 265-274.
- Mihalak KB, Carroll FI, Luetje CW (2006). Varenicline is a partial agonist at alpha4beta2 and a full agonist at alpha7 neuronal nicotinic receptors. *Mol Pharmacol* 70: 801-805.

- Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM (2000). M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol* 164: 6166-6173.
- Mogensen TH (2009). Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev* 22: 240-273, Table of Contents.
- Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR (1993). Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 11: 165-190.
- Mosmann TR, Coffman RL (1989a). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7: 145-173.
- Mosmann TR, Coffman RL (1989b). Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Adv Immunol* 46: 111-147.
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136: 2348-2357.
- Mosser DM (2003). The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol* 73: 209-212.
- Mosser DM, Edwards JP (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8: 958-969.
- Munder M, Eichmann K, Moran JM, Centeno F, Soler G, Modolell M (1999). Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. *J Immunol* 163: 3771-3777.
- Murakami Y, Hoshi M, Imamura Y, Arioka Y, Yamamoto Y, Saito K (2013). Remarkable role of indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan metabolites in infectious diseases: potential role in macrophage-mediated inflammatory diseases. *Mediators Inflamm* 2013: 391984.
- Murphy DM, O'Byrne PM (2010). Recent advances in the pathophysiology of asthma. *Chest* 137: 1417-1426.
- Murray HW (1988). Interferon-gamma, the activated macrophage, and host defense against microbial challenge. *Ann Intern Med* 108: 595-608.
- Murray PJ (2006). Understanding and exploiting the endogenous interleukin-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response. *Curr Opin Pharmacol* 6: 379-386.
- Murray PJ, Wynn TA (2011a). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* 11: 723-737.
- Murray PJ, Wynn TA (2011b). Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. *J Leukoc Biol* 89: 557-563.

- Nacu N, Luzina IG, Highsmith K, Lockett V, Pochetuhin K, Cooper ZA, *et al.* (2008). Macrophages produce TGF-beta-induced (beta-ig-h3) following ingestion of apoptotic cells and regulate MMP14 levels and collagen turnover in fibroblasts. *J Immunol* 180: 5036-5044.
- Natarajan R, Reddy MA, Malik KU, Fatima S, Khan BV (2001). Signaling mechanisms of nuclear factor-kappaB-mediated activation of inflammatory genes by 13-hydroperoxyoctadecadienoic acid in cultured vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 1408-1413.
- Negishi H, Ohba Y, Yanai H, Takaoka A, Honma K, Yui K, *et al.* (2005). Negative regulation of Toll-like-receptor signaling by IRF-4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 15989-15994.
- Niedergang F, Chavrier P (2004). Signaling and membrane dynamics during phagocytosis: many roads lead to the phagos(R)ome. *Current opinion in cell biology* 16: 422-428.
- Nizri E, Irony-Tur-Sinai M, Lory O, Orr-Urtreger A, Lavi E, Brenner T (2009). Activation of the cholinergic anti-inflammatory system by nicotine attenuates neuroinflammation via suppression of Th1 and Th17 responses. *J Immunol* 183: 6681-6688.
- Novak ML, Koh TJ (2013). Macrophage phenotypes during tissue repair. *J Leukoc Biol* 93: 875-881.
- Ober C, Tan Z, Sun Y, Possick JD, Pan L, Nicolae R, *et al.* (2008). Effect of variation in CHI3L1 on serum YKL-40 level, risk of asthma, and lung function. *N Engl J Med* 358: 1682-1691.
- Ohri CM, Shikotra A, Green RH, Waller DA, Bradding P (2009). Macrophages within NSCLC tumour islets are predominantly of a cytotoxic M1 phenotype associated with extended survival. *Eur Respir J* 33: 118-126.
- Olinic A, Stevens KE (2007). Treating schizophrenia symptoms with an alpha7 nicotinic agonist, from mice to men. *Biochem Pharmacol* 74: 1192-1201.
- Pannellini T, Iezzi M, Di Carlo E, Eleuterio E, Coletti A, Modesti A, *et al.* (2004). The expression of LEC/CCL16, a powerful inflammatory chemokine, is upregulated in ulcerative colitis. *Int J Immunopathol Pharmacol* 17: 171-180.
- Papke RL, McCormack TJ, Jack BA, Wang D, Bugaj-Gaweda B, Schiff HC, *et al.* (2005). Rhesus monkey alpha7 nicotinic acetylcholine receptors: comparisons to human alpha7 receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Eur J Pharmacol* 524: 11-18.
- Pappas K, Papaioannou AI, Kostikas K, Tzanakis N (2013). The role of macrophages in obstructive airways disease: chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Cytokine* 64: 613-625.
- Parameswaran N, Patial S (2010). Tumor necrosis factor-alpha signaling in macrophages. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 20: 87-103.

- Parrish WR, Rosas-Ballina M, Gallowitsch-Puerta M, Ochani M, Ochani K, Yang LH, *et al.* (2008). Modulation of TNF release by choline requires alpha7 subunit nicotinic acetylcholine receptor-mediated signaling. *Mol Med* 14: 567-574.
- Pathak SK, Basu S, Basu KK, Banerjee A, Pathak S, Bhattacharyya A, *et al.* (2007). Direct extracellular interaction between the early secreted antigen ESAT-6 of Mycobacterium tuberculosis and TLR2 inhibits TLR signaling in macrophages. *Nat Immunol* 8: 610-618.
- Pavlov VA, Ochani M, Yang LH, Gallowitsch-Puerta M, Ochani K, Lin X, *et al.* (2007). Selective alpha7-nicotinic acetylcholine receptor agonist GTS-21 improves survival in murine endotoxemia and severe sepsis. *Crit Care Med* 35: 1139-1144.
- Peiser L, Mukhopadhyay S, Gordon S (2002). Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 14: 123-128.
- Peng H, Ferris RL, Matthews T, Hiel H, Lopez-Albaitero A, Lustig LR (2004). Characterization of the human nicotinic acetylcholine receptor subunit alpha (alpha) 9 (CHRNA9) and alpha (alpha) 10 (CHRNA10) in lymphocytes. *Life Sci* 76: 263-280.
- Peters-Golden M, Henderson WR, Jr. (2007). Leukotrienes. *N Engl J Med* 357: 1841-1854.
- Phipps JC, Aronoff DM, Curtis JL, Goel D, O'Brien E, Mancuso P (2010). Cigarette smoke exposure impairs pulmonary bacterial clearance and alveolar macrophage complement-mediated phagocytosis of Streptococcus pneumoniae. *Infect Immun* 78: 1214-1220.
- Platanias LC (2005). Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol* 5: 375-386.
- Prado MA, Reis RA, Prado VF, de Mello MC, Gomez MV, de Mello FG (2002). Regulation of acetylcholine synthesis and storage. *Neurochem Int* 41: 291-299.
- Prickaerts J, van Goethem NP, Chesworth R, Shapiro G, Boess FG, Methfessel C, *et al.* (2012). EVP-6124, a novel and selective alpha7 nicotinic acetylcholine receptor partial agonist, improves memory performance by potentiating the acetylcholine response of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* 62: 1099-1110.
- Prieto J, Lensmar C, Roquet A, van der Ploeg I, Gigliotti D, Eklund A, *et al.* (2000). Increased interleukin-13 mRNA expression in bronchoalveolar lavage cells of atopic patients with mild asthma after repeated low-dose allergen provocations. *Respir Med* 94: 806-814.
- Profita M, Vignola AM, Sala A, Mirabella A, Siena L, Pace E, *et al.* (1999). Interleukin-4 enhances 15-lipoxygenase activity and incorporation of 15(S)-HETE into cellular phospholipids in cultured pulmonary epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20: 61-68.
- Profita M, Giorgi RD, Sala A, Bonanno A, Riccobono L, Mirabella F, *et al.* (2005). Muscarinic receptors, leukotriene B4 production and neutrophilic inflammation in COPD patients. *Allergy* 60: 1361-1369.

- Profita M, Sala A, Riccobono L, Paterno A, Mirabella A, Bonanno A, *et al.* (2000). 15-Lipoxygenase expression and 15(S)-hydroxyeicoisatetraenoic acid release and reincorporation in induced sputum of asthmatic subjects. *J Allergy Clin Immunol* 105: 711-716.
- Pujols L, Mullol J, Roca-Ferrer J, Torrego A, Xaubet A, Cidlowski JA, *et al.* (2002). Expression of glucocorticoid receptor alpha- and beta-isoforms in human cells and tissues. *Am J Physiol Cell Physiol* 283: C1324-1331.
- Quatromoni JG, Eruslanov E (2012). Tumor-associated macrophages: function, phenotype, and link to prognosis in human lung cancer. *Am J Transl Res* 4: 376-389.
- Racke K, Matthiesen S (2004). The airway cholinergic system: physiology and pharmacology. *Pulm Pharmacol Ther* 17: 181-198.
- Raes G, De Baetselier P, Noel W, Beschin A, Brombacher F, Hassanzadeh Gh G (2002). Differential expression of FIZZ1 and Ym1 in alternatively versus classically activated macrophages. *J Leukoc Biol* 71: 597-602.
- Ratcliffe MJ, Walding A, Shelton PA, Flaherty A, Dougall IG (2007). Activation of E-prostanoid4 and E-prostanoid2 receptors inhibits TNF-alpha release from human alveolar macrophages. *Eur Respir J* 29: 986-994.
- Razani-Boroujerdi S, Singh SP, Knall C, Hahn FF, Pena-Philippides JC, Kalra R, *et al.* (2004). Chronic nicotine inhibits inflammation and promotes influenza infection. *Cell Immunol* 230: 1-9.
- Redente EF, Higgins DM, Dwyer-Nield LD, Orme IM, Gonzalez-Juarrero M, Malkinson AM (2010). Differential polarization of alveolar macrophages and bone marrow-derived monocytes following chemically and pathogen-induced chronic lung inflammation. *J Leukoc Biol* 88: 159-168.
- Reiling N, Ulmer AJ, Duchrow M, Ernst M, Flad HD, Hauschildt S (1994). Nitric oxide synthase: mRNA expression of different isoforms in human monocytes/macrophages. *Eur J Immunol* 24: 1941-1944.
- Rodriguez M, Domingo E, Municio C, Alvarez Y, Hugo E, Fernandez N, *et al.* (2014). Polarization of the innate immune response by prostaglandin E2: a puzzle of receptors and signals. *Mol Pharmacol* 85: 187-197.
- Rogers DF (2002). Pharmacological regulation of the neuronal control of airway mucus secretion. *Curr Opin Pharmacol* 2: 249-255.
- Rollins BJ (1997). Chemokines. *Blood* 90: 909-928.
- Roncarati R, Scali C, Comery TA, Grauer SM, Aschmi S, Bothmann H, *et al.* (2009). Procognitive and neuroprotective activity of a novel alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonist for treatment of neurodegenerative and cognitive disorders. *J Pharmacol Exp Ther* 329: 459-468.

- Rosas-Ballina M, Goldstein RS, Gallowitsch-Puerta M, Yang L, Valdes-Ferrer SI, Patel NB, *et al.* (2009). The selective alpha7 agonist GTS-21 attenuates cytokine production in human whole blood and human monocytes activated by ligands for TLR2, TLR3, TLR4, TLR9, and RAGE. *Mol Med* 15: 195-202.
- Sapey E, Stockley RA (2006). COPD exacerbations . 2: aetiology. *Thorax* 61: 250-258.
- Schebesch C, Kodelja V, Muller C, Hakij N, Bisson S, Orfanos CE, *et al.* (1997). Alternatively activated macrophages actively inhibit proliferation of peripheral blood lymphocytes and CD4+ T cells in vitro. *Immunology* 92: 478-486.
- Schnoor M, Cullen P, Lorkowski J, Stolle K, Robenek H, Troyer D, *et al.* (2008). Production of type VI collagen by human macrophages: a new dimension in macrophage functional heterogeneity. *J Immunol* 180: 5707-5719.
- Schroder K, Sweet MJ, Hume DA (2006). Signal integration between IFNgamma and TLR signalling pathways in macrophages. *Immunobiology* 211: 511-524.
- Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA (2004). Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 75: 163-189.
- Scotton CJ, Martinez FO, Smelt MJ, Sironi M, Locati M, Mantovani A, *et al.* (2005). Transcriptional profiling reveals complex regulation of the monocyte IL-1 beta system by IL-13. *J Immunol* 174: 834-845.
- Sekhon HS, Jia Y, Raab R, Kuryatov A, Pankow JF, Whitsett JA, *et al.* (1999). Prenatal nicotine increases pulmonary alpha7 nicotinic receptor expression and alters fetal lung development in monkeys. *J Clin Invest* 103: 637-647.
- Serbina NV, Pamer EG (2006). Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat Immunol* 7: 311-317.
- Serbina NV, Jia T, Hohl TM, Pamer EG (2008). Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol* 26: 421-452.
- Serezani CH, Lewis C, Jancar S, Peters-Golden M (2011). Leukotriene B4 amplifies NF-kappaB activation in mouse macrophages by reducing SOCS1 inhibition of MyD88 expression. *J Clin Invest* 121: 671-682.
- Serezani CH, Chung J, Ballinger MN, Moore BB, Aronoff DM, Peters-Golden M (2007). Prostaglandin E2 suppresses bacterial killing in alveolar macrophages by inhibiting NADPH oxidase. *Am J Respir Cell Mol Biol* 37: 562-570.
- Serhan CN, Savill J (2005). Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol* 6: 1191-1197.
- Shannon J, Ernst P, Yamauchi Y, Olivenstein R, Lemiere C, Foley S, *et al.* (2008). Differences in airway cytokine profile in severe asthma compared to moderate asthma. *Chest* 133: 420-426.

- Shaughnessy LM, Swanson JA (2007). The role of the activated macrophage in clearing *Listeria monocytogenes* infection. *Front Biosci* 12: 2683-2692.
- Shay T, Jojic V, Zuk O, Rothamel K, Puyraimond-Zemmour D, Feng T, *et al.* (2013). Conservation and divergence in the transcriptional programs of the human and mouse immune systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 2946-2951.
- Shaykhiev R, Krause A, Salit J, Strulovici-Barel Y, Harvey BG, O'Connor TP, *et al.* (2009). Smoking-dependent reprogramming of alveolar macrophage polarization: implication for pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *J Immunol* 183: 2867-2883.
- Shearer JD, Richards JR, Mills CD, Caldwell MD (1997). Differential regulation of macrophage arginine metabolism: a proposed role in wound healing. *Am J Physiol* 272: E181-190.
- Shoda LK, Kegerreis KA, Suarez CE, Mwangi W, Knowles DP, Brown WC (2001). Immunostimulatory CpG-modified plasmid DNA enhances IL-12, TNF-alpha, and NO production by bovine macrophages. *J Leukoc Biol* 70: 103-112.
- Sica A, Bronte V (2007). Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *J Clin Invest* 117: 1155-1166.
- Sica A, Mantovani A (2012). Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* 122: 787-795.
- Sinkus ML, Lee MJ, Gault J, Logel J, Short M, Freedman R, *et al.* (2009). A 2-base pair deletion polymorphism in the partial duplication of the alpha7 nicotinic acetylcholine gene (CHRFAM7A) on chromosome 15q14 is associated with schizophrenia. *Brain Res* 1291: 1-11.
- Sironi M, Martinez FO, D'Ambrosio D, Gattorno M, Polentarutti N, Locati M, *et al.* (2006). Differential regulation of chemokine production by Fcgamma receptor engagement in human monocytes: association of CCL1 with a distinct form of M2 monocyte activation (M2b, Type 2). *J Leukoc Biol* 80: 342-349.
- Smith MW, Schmidt JE, Rehg JE, Orihuela CJ, McCullers JA (2007). Induction of pro- and anti-inflammatory molecules in a mouse model of pneumococcal pneumonia after influenza. *Comp Med* 57: 82-89.
- Snelgrove RJ, Goulding J, Didierlaurent AM, Lyonga D, Vekaria S, Edwards L, *et al.* (2008). A critical function for CD200 in lung immune homeostasis and the severity of influenza infection. *Nat Immunol* 9: 1074-1083.
- Song E, Ouyang N, Horbelt M, Antus B, Wang M, Exton MS (2000). Influence of alternatively and classically activated macrophages on fibrogenic activities of human fibroblasts. *Cell Immunol* 204: 19-28.
- Sopori ML, Kozak W, Savage SM, Geng Y, Soszynski D, Kluger MJ, *et al.* (1998). Effect of nicotine on the immune system: possible regulation of immune responses by central and peripheral mechanisms. *Psychoneuroendocrinology* 23: 189-204.



- Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S (1992). Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med* 176: 287-292.
- Stout RD, Suttles J (2004). Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J Leukoc Biol* 76: 509-513.
- Striz I, Brabcova E, Kolesar L, Sekerkova A (2014). Cytokine networking of innate immunity cells: a potential target of therapy. *Clin Sci (Lond)* 126: 593-612.
- Sugano N, Shimada K, Ito K, Murai S (1998). Nicotine inhibits the production of inflammatory mediators in U937 cells through modulation of nuclear factor-kappaB activation. *Biochem Biophys Res Commun* 252: 25-28.
- Sun Y, Li Q, Gui H, Xu DP, Yang YL, Su DF, *et al.* (2013). MicroRNA-124 mediates the cholinergic anti-inflammatory action through inhibiting the production of pro-inflammatory cytokines. *Cell Res* 23: 1270-1283.
- Sutterwala FS, Noel GJ, Clynes R, Mosser DM (1997). Selective suppression of interleukin-12 induction after macrophage receptor ligation. *J Exp Med* 185: 1977-1985.
- Sutterwala FS, Noel GJ, Salgame P, Mosser DM (1998). Reversal of proinflammatory responses by ligating the macrophage Fcgamma receptor type I. *J Exp Med* 188: 217-222.
- Suzuki S, Kawamata J, Matsushita T, Matsumura A, Hisahara S, Takata K, *et al.* (2013). 3-[(2,4-Dimethoxy)benzylidene]-anabaseine dihydrochloride protects against 6-hydroxydopamine-induced parkinsonian neurodegeneration through alpha7 nicotinic acetylcholine receptor stimulation in rats. *J Neurosci Res* 91: 462-471.
- Swanson JA, Baer SC (1995). Phagocytosis by zippers and triggers. *Trends Cell Biol* 5: 89-93.
- Takahashi HK, Iwagaki H, Hamano R, Yoshino T, Tanaka N, Nishibori M (2006). alpha7 Nicotinic acetylcholine receptor stimulation inhibits lipopolysaccharide-induced interleukin-18 and -12 production in monocytes. *J Pharmacol Sci* 102: 143-146.
- Takayama K, Garcia-Cardena G, Sukhova GK, Comander J, Gimbrone MA, Jr., Libby P (2002). Prostaglandin E2 suppresses chemokine production in human macrophages through the EP4 receptor. *J Biol Chem* 277: 44147-44154.
- Takeda K, Akira S (2004). TLR signaling pathways. *Semin Immunol* 16: 3-9.
- Tanaka K, Hirai H, Takano S, Nakamura M, Nagata K (2004). Effects of prostaglandin D2 on helper T cell functions. *Biochem Biophys Res Commun* 316: 1009-1014.
- Tanaka K, Ogawa K, Sugamura K, Nakamura M, Takano S, Nagata K (2000). Cutting edge: differential production of prostaglandin D2 by human helper T cell subsets. *J Immunol* 164: 2277-2280.

- Tateya S, Kim F, Tamori Y (2013). Recent advances in obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4: 93.
- Tauber AI (2003). Metchnikoff and the phagocytosis theory. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 897-901.
- Taylor AE, Finney-Hayward TK, Quint JK, Thomas CM, Tudhope SJ, Wedzicha JA, *et al.* (2010). Defective macrophage phagocytosis of bacteria in COPD. *Eur Respir J* 35: 1039-1047.
- Thoma-Uszynski S, Stenger S, Takeuchi O, Ochoa MT, Engele M, Sieling PA, *et al.* (2001). Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors. *Science* 291: 1544-1547.
- Titos E, Rius B, Gonzalez-Periz A, Lopez-Vicario C, Moran-Salvador E, Martinez-Clemente M, *et al.* (2011). Resolvin D1 and its precursor docosahexaenoic acid promote resolution of adipose tissue inflammation by eliciting macrophage polarization toward an M2-like phenotype. *J Immunol* 187: 5408-5418.
- Toyohara J, Hashimoto K (2010). alpha7 Nicotinic Receptor Agonists: Potential Therapeutic Drugs for Treatment of Cognitive Impairments in Schizophrenia and Alzheimer's Disease. *The open medicinal chemistry journal* 4: 37-56.
- Tsetlin V, Kuzmin D, Kasheverov I (2011). Assembly of nicotinic and other Cys-loop receptors. *J Neurochem* 116: 734-741.
- Tucek S, Ricny J, Dolezal V (1982). Acetylcoenzyme A and the control of the synthesis of acetylcholine in the brain. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 42: 59-68.
- Tugal D, Liao X, Jain MK (2013). Transcriptional control of macrophage polarization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33: 1135-1144.
- Ungar J, Wilson GR (1935). Monocytes as a Source of Alveolar Phagocytes. *Am J Pathol* 11: 681-692 685.
- Vacca G, Randerath WJ, Gillissen A (2011). Inhibition of granulocyte migration by tiotropium bromide. *Respir Res* 12: 24.
- Valledor AF, Ricote M (2004). Nuclear receptor signaling in macrophages. *Biochem Pharmacol* 67: 201-212.
- Van Dyken SJ, Locksley RM (2013). Interleukin-4- and interleukin-13-mediated alternatively activated macrophages: roles in homeostasis and disease. *Annu Rev Immunol* 31: 317-343.
- van Westerloo DJ, Giebelen IA, Florquin S, Bruno MJ, Larosa GJ, Ulloa L, *et al.* (2006). The vagus nerve and nicotinic receptors modulate experimental pancreatitis severity in mice. *Gastroenterology* 130: 1822-1830.

- Villiger Y, Szanto I, Jaconi S, Blanchet C, Buisson B, Krause KH, *et al.* (2002). Expression of an alpha7 duplicate nicotinic acetylcholine receptor-related protein in human leukocytes. *J Neuroimmunol* 126: 86-98.
- Vodovotz Y, Bogdan C (1994). Control of nitric oxide synthase expression by transforming growth factor-beta: implications for homeostasis. *Prog Growth Factor Res* 5: 341-351.
- Vogel DY, Glim JE, Stavenuiter AW, Breur M, Heijnen P, Amor S, *et al.* (2014). Human macrophage polarization in vitro: Maturation and activation methods compared. *Immunobiology* 219: 695-703.
- Wallace WA, Gillooly M, Lamb D (1992). Intra-alveolar macrophage numbers in current smokers and non-smokers: a morphometric study of tissue sections. *Thorax* 47: 437-440.
- Wang C, Zhou G, Zeng Z (2014). Effects of peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta on sepsis induced acute lung injury. *Chin Med J (Engl)* 127: 2129-2137.
- Wang H, Liao H, Ochani M, Justiniani M, Lin X, Yang L, *et al.* (2004). Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis. *Nat Med* 10: 1216-1221.
- Wang H, Yu M, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, Susarla S, *et al.* (2003). Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* 421: 384-388.
- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112: 1796-1808.
- Weisberg SP, Hunter D, Huber R, Lemieux J, Slaymaker S, Vaddi K, *et al.* (2006). CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest* 116: 115-124.
- Wen Y, Gu J, Vandenhoff GE, Liu X, Nadler JL (2008). Role of 12/15-lipoxygenase in the expression of MCP-1 in mouse macrophages. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294: H1933-1938.
- Wen Y, Gu J, Chakrabarti SK, Aylor K, Marshall J, Takahashi Y, *et al.* (2007). The role of 12/15-lipoxygenase in the expression of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in macrophages. *Endocrinology* 148: 1313-1322.
- Wessler I, Kirkpatrick CJ, Racke K (1998). Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems: expression and function in humans. *Pharmacol Ther* 77: 59-79.
- Wessler I, Kirkpatrick CJ, Racke K (1999). The cholinergic 'pitfall': acetylcholine, a universal cell molecule in biological systems, including humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26: 198-205.

- Wessler I, Roth E, Deutsch C, Brockerhoff P, Bittinger F, Kirkpatrick CJ, *et al.* (2001a). Release of non-neuronal acetylcholine from the isolated human placenta is mediated by organic cation transporters. *Br J Pharmacol* 134: 951-956.
- Wessler IK, Kirkpatrick CJ (2001b). The Non-neuronal cholinergic system: an emerging drug target in the airways. *Pulm Pharmacol Ther* 14: 423-434.
- Whyte CS, Bishop ET, Ruckerl D, Gaspar-Pereira S, Barker RN, Allen JE, *et al.* (2011). Suppressor of cytokine signaling (SOCS)1 is a key determinant of differential macrophage activation and function. *J Leukoc Biol* 90: 845-854.
- Williams JA, Shacter E (1997). Regulation of macrophage cytokine production by prostaglandin E2. Distinct roles of cyclooxygenase-1 and -2. *J Biol Chem* 272: 25693-25699.
- Wongtrakool C, Grooms K, Brown LAS, Gauthier TW (2010). Alveolar macrophages exposed to nicotine in vitro exhibit markers of M2 activation. *Am J Respir Crit Care Med* 181: A4966.
- Wongtrakool C, Grooms K, Ping XD, Rivera H, Ward J, Roser-Page S, *et al.* (2012). In utero nicotine exposure promotes M2 activation in neonatal mouse alveolar macrophages. *Pediatr Res* 72: 147-153.
- Wu S, Zhao H, Luo H, Xiao X, Zhang H, Li T, *et al.* (2014). GTS-21, an alpha7-nicotinic acetylcholine receptor agonist, modulates Th1 differentiation in CD4 T cells from patients with rheumatoid arthritis. *Experimental and therapeutic medicine* 8: 557-562.
- Wuest SJ, Crucet M, Gemperle C, Loretz C, Hersberger M (2012). Expression and regulation of 12/15-lipoxygenases in human primary macrophages. *Atherosclerosis* 225: 121-127.
- Xu J, Zhang Y, Xiao Y, Ma S, Liu Q, Dang S, *et al.* (2013a). Inhibition of 12/15-lipoxygenase by baicalein induces microglia PPARbeta/delta: a potential therapeutic role for CNS autoimmune disease. *Cell death & disease* 4: e569.
- Xu W, Zhao X, Daha MR, van Kooten C (2013b). Reversible differentiation of pro- and anti-inflammatory macrophages. *Mol Immunol* 53: 179-186.
- Xue J, Schmidt SV, Sander J, Draffehn A, Krebs W, Quester I, *et al.* (2014). Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. *Immunity* 40: 274-288.
- Yamamoto T, Kodama T, Lee J, Utsunomiya N, Hayashi S, Sakamoto H, *et al.* (2014). Anti-allergic role of cholinergic neuronal pathway via alpha7 nicotinic ACh receptors on mucosal mast cells in a murine food allergy model. *PLoS One* 9: e85888.
- Yang M, Kumar RK, Foster PS (2009). Pathogenesis of steroid-resistant airway hyperresponsiveness: interaction between IFN-gamma and TLR4/MyD88 pathways. *J Immunol* 182: 5107-5115.
- Yoshikawa H, Kurokawa M, Ozaki N, Nara K, Atou K, Takada E, *et al.* (2006). Nicotine inhibits the production of proinflammatory mediators in human monocytes by suppression of

I-kappaB phosphorylation and nuclear factor-kappaB transcriptional activity through nicotinic acetylcholine receptor alpha7. *Clin Exp Immunol* 146: 116-123.

Young HA (1996). Regulation of interferon-gamma gene expression. *J Interferon Cytokine Res* 16: 563-568.

Zhao J, Maskrey B, Balzar S, Chibana K, Mustovich A, Hu H, *et al.* (2009). Interleukin-13-induced MUC5AC is regulated by 15-lipoxygenase 1 pathway in human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med* 179: 782-790.

