HAL
open science

Rôle des adipokines dans la régulation de l'activation des macrophages pulmonaires humains

Helene Salvator

To cite this version:

Helene Salvator. Rôle des adipokines dans la régulation de l'activation des macrophages pulmonaires humains. Immunologie. Université Paris Saclay (COmUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLV082 . tel-02394767

HAL Id: tel-02394767

https://theses.hal.science/tel-02394767v1

Submitted on 5 Dec 2019

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 PARIS-SACLAY

NNT : 2018SACLV 082

UNIVERSITÉ DE VERSAILLES ST-QUENTIN-EN-YVELINES
université PARIS-SACLAY

Rôle des adipokines dans l'activation des macrophages pulmonaires humains

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université Versailles Saint Quentin en Yvelines

École doctorale n°577 Structure et Dynamique des Systèmes Vivants
Spécialité de doctorat: Sciences de la Vie et de la santé

Thèse présentée et soutenue à Suresnes, le 18 décembre 2018

Hélène SALVATOR

Composition du Jury :

Louis-Jean COUDERC — Président
PU-PH, Pneumologie Hôpital FOCH
Suresnes

Nelly FROSSARD — Rapporteur
Directeur de recherche INSERM
Laboratoire d'Innovation thérapeutique UMR 7200
Université de Strasbourg

Francoise STANKE-LABESQUE — Rapporteur
Pu-PH, Laboratoire HP2- INSERM U1042
Pharmaco-toxicologie
CHU de Grenoble

Vincent LAGENTE — Examinateur
Professeur, Institut NUMECAN - Inserm U1241 - Inra U1341
Faculté des sciences pharmaceutiques et Biologiques
Université Rennes 1

Philippe DEVILLIER — Directeur de thèse
PU-PH, UPRES EA 220
Suresnes

Thèse de doctorat

Remerciements

Je tiens à adresser mes sincères remerciements aux membres du jury

Au Docteur Nelly Frossard et au Professeur Françoise Stanke-Labesque
Vous me faites l'honneur de juger mon travail en tant que rapporteur de ma thèse. Soyez assurées de ma profonde reconnaissance.

Au Docteur Vincent Lagente
Vous avez accepté d'être examinateur de ma thèse. Recevez mes sincères remerciements.

A M. Le Professeur Philippe Devillier
Vous m'avez ouvert les portes de la recherche et de votre laboratoire. Vous avez dirigé mon master et ma thèse, vous m'avez encadrée, orientée, conseillée tout au long de ces (nombreuses) années. Je tenais à vous faire part de mon admiration et vous adresser mes remerciements les plus sincères. Vos conseils ont toujours été importants pour mes choix de carrière, votre soutien essentiel. C'est avec beaucoup d'émotion que je clos cette étape mais je suis très heureuse de pouvoir continuer à travailler avec vous, au laboratoire et sur notre projet de recherche clinique. Merci pour tout !

A M. le Professeur Louis-Jean Couderc
Je vous serai toujours reconnaissante de m'avoir accueillie au sein de votre service, de me permettre d'exercer mon métier dans de si bonnes conditions et de le rendre passionnant au quotidien. Votre sens clinique, votre enthousiasme, votre empathie sont des moteurs pour mon exercice professionnel. Je suis fière d'avoir été votre élève, de travailler à vos côtés et de continuer l'aventure au-delà de l'Atlantique. Un immense merci pour votre indéfectible soutien.

Je remercie l'ensemble de l'équipe de recherche du laboratoire UPRES EA220

Marion Brollo. La réussite de ce travail te doit tant ! J'ai découvert la biologie grâce à toi. Tu m'as permis d'acquérir des compétences essentielles et offert une amitié qui m'est chère. Je te souhaite tout le bonheur du monde et espère continuer de voir grandir Victor.

Le docteur Emmanuel Naline. C'est peu dire que tu es la pierre angulaire de ce laboratoire. Un immense merci pour ton aide, tes conseils, ta bonne humeur et les collations impromptues qui remontent le moral.

Le Docteur Stanislas Grassin-Delyle. Je te remercie pour tes conseils. J'ai beaucoup d'admiration pour ton travail et suis très heureuse de continuer à collaborer avec toi sur d'autres projets.

Charlotte Abrial : ton travail et ton sérieux m'avaient impressionnée ; je n'en mesurais pas encore pleinement l'ampleur avant de terminer cette thèse. Merci pour ce que tu m'as appris et tous mes vœux de bonheur.

Tatiana Victoni : ton sourire m'a réchauffée. Qu'il continue de briller à Rennes ou à Rio. Tous mes vœux de réussite pour la suite !

Amparo, Sonia, Charles, Nikola, Caroline, Cécile, Julie, Camille : merci pour ces moments partagés.
Manon : merci pour le support graphique

J'ai une pensée pour tous mes collègues et amis du service de pneumologie de l'hôpital Foch. La vie serait moins belle sans vous :
Emilie Catherinot, Elisabeth Rivaud, Colas Tcherakian, Alexandre Chabrol, Antoine Roux, Clément Picard, Anne-Cécile Métivier, Sylvie Friard, Hélène Doubre, Hélène Neveu, Dominique Grenet, Sandra De Miranda, Abdul Hamid, Nicolas Carlier, Benoit Douvry, Laurence Beaumont, Severine Fraboulet, Geneviève, Matthieu Glorion

Aux médecins que j'ai admirés et qui ont influencé mes choix : le Dr Marc Stern, le Pr Dominique Valeyre, le Dr Benjamin Terrier.
A toutes les personnes qui m'aident au quotidien dans mon exercice professionnel : l'équipe infirmière, aide-soignante et les secrétaires de choc.

Un pensée toute particulière pour Mme Françoise Lambinet : aide-soignante, technicienne, collègue et désormais amie. Merci pour les recharges sucrées.
Je remercie mes amis qui ont fait un bout de chemin avec moi, les proches et ceux que je voudrais voir plus souvent : Mario et Lola, Doup, Leila, Deniz et Hélène, Margot et Vincent, Florence et Nicolas, Parain Willy et Anahita, Schmul et Djali, Marie-Alice et ses loulous, Gaelle et Jerome, Bedi et Max, Maxime, Flora, Olivier….

Enfin, mes remerciements les plus sincères et tout mon amour à ma famille
Mes parents : notre attachement ne peut se décrire. Merci pour votre aide et votre amour.
Laurence : tu es un repère. Je sais que je pourrai toujours compter sur toi ; sois assurée de la réciproque.
A Nicolas, Gabrielle, Ariane, Denise et Claude : toute mon affection
Jean : tout au long du chemin, tu es là. Le bâtiment que nous construisons est le plus précieux. Je t'aime.
Lucie et Marc : vous avez égayé mes jours et blanchi mes nuits. Petites boules d'adipokines, concentré de bonheur, je vous aime.
Catherine, mamicha : merci pour votre aide. Cette thèse clôture une année si riche en émotions.

A Jacques. Tu n'as pas eu le temps d'écrire ta thèse, je te dédie la mienne.

Table des matières

AVANT-PROPOS **1**

VALORISATION DES TRAVAUX DE RECHERCHE **3**

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX **5**

LISTE DES ABREVIATIONS **7**

INTRODUCTION **9**

I. OBESITE : DEFINITION, EPIDEMIOLOGIE ET IMPACT SOCIO-ECONOMIQUE **10**

A. Définition 10

B. Epidémiologie de l'obésité dans le monde et en France 11

C. L'obésité : un enjeu de santé publique 12

II. PATHOLOGIES ASSOCIEES A L'OBESITE **13**

A. Maladies métaboliques 13

1. Diabète de type 2 13
2. Dyslipidémies 14
3. Syndrome métabolique 14
4. Steatohépatite métabolique 14

B.. Maladies cardiovasculaires 15

1. Hypertension artérielle 15
2. Maladie coronaire 15
3. Insuffisance cardiaque chronique 15

C. Maladies respiratoires chroniques 16

1. Asthme 16
2. Broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) 17
3. Syndrome d'apnée-hypopnée obstructive du sommeil 17
4. Syndrome obésité-hypoventilation 18

D. Infections respiratoires 18

E. Autres pathologies 19

1. Cancers 19
2. Complications ostéo-articulaires 19
3. Complications dermatologiques 20

III. LE TISSU ADIPEUX.....20

A. Localisation.....20

B. Structure.....21

C. Fonction des adipocytes.....22

1. Synthèse des lipides: lipogenèse……22
2. Stockage des lipides……...22
3. Libération des lipides……22
4. Sécrétion de médiateurs……23

D. Adipogénèse.....23

E. Les macrophages dans le tissu adipeux 26

IV. LES ADIPOKINES 28

A. Leptine ……30

1. Gène et structure……30
2. Récepteurs……..30
3. Voies de signalisation……31
4. Effets biologiques……..33

B. Adiponectine.....36

1. Gène et structure……36
2. Sécrétion et régulation……...36
3. Récepteurs et voies de signalisation……..38
4. Effets biologiques……..40
5. AdipoRon……...41

C. Autres adipokines.....42

1. Visfatine……42
2. Chémérine……..44

D. Adipokines et poumon ……45

1. Leptine et poumon……45
2. Adiponectine et poumon……46

V. MACROPHAGES ET POLARISATION……47

A. Définition et origine……..47

B. Fonctions des macrophages 49

C. Les macrophages pulmonaires.....51

1. Origine……...51
2. Fonction……53

D. La polarisation des macrophages.....53

1. Concept de la polarisation……..53
2. Agents inducteurs d'une polarisation M1/M2 des macrophages……...55
3. Marqueurs de polarisation M1/M2 des macrophages……59

E. Plasticité du macrophage……..64

F. Polarisation des macrophages et pathologie……66
1. Polarisation des macrophages et infections……...66
2. Polarisation des macrophages et athérosclérose……67
3. Polarisation des macrophages et tumeurs……..68

VI. MODULATION DE LA POLARISATION DES MACROPHAGES AU COURS DE L'OBESITE..69

A. Tissu adipeux et polarisation des macrophages……69

B. Adipokines et polarisation des macrophages.....72
1. Leptine et polarisation des macrophages……...72
2. Adiponectine et polarisation des macrophages……..73
3. Autres adipokines……...75

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE RECHERCHE.....76

MATERIELS ET METHODES.....77

I. METHODES D'ISOLEMENT ET CULTURE DES EXPLANTS ET CELLULES PULMONAIRES HUMAINS 78

A. Isolement et culture des explants de parenchyme pulmonaire humains……...78

B. Isolement et culture des macrophages pulmonaires humains.....78
1. Isolement des macrophages……...78
2. Culture et traitement des macrophages……..79
3. Transfection des macrophages par les siRNA……...79

C. Isolement et culture des cellules épithéliales bronchiques humaines 80

II. DOSAGE IMMUNOLOGIQUE DES MEDIATEURS SECRETES 81

A. Dosage des cytokines ……..81

B. Dosage des adipokines 81

III. ANALYSE DES TRANSCRITS PAR POLYMERASE CHAIN REACTION ……....82

A. Extraction des ARN……82

B. Vérification de la qualité des ARN……....82

C. Transcription inverse……83
D. Réaction en chaîne polymérase……83
IV. WESTERN BLOT……....84
V. EXPRESSION DES RESULTATS ET ANALYSES STATISTIQUES……....85

RESULTATS.....87

ARTICLE N°1.....87

L'obésité, facteur de mauvais pronostic au cours de l'épidémie de Grippe A (H1N1) 2009 : rôle des adipokines dans la modulation des défenses respiratoires

Rev Pneumol Clin. 2011 Sep;67(4):244-9. doi: 10.1016

ARTICLE N°2.....97

Adiponectin inhibits the production of TNF-α, IL-6 and chemokines in human lung macrophages

Soumis à Thorax, en cours de révision

ARTICLE N°3.....145

Dual effect of Adiponectin on human lung bronchial epithelial cells

Prêt pour soumission

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....……169

ANNEXES 174

Brevet européen N° 17306792.7 déposé en Décembre 2017……..173

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

Br J Pharmacol. 2015 Sep;172(17):4319-30. doi: 10.1111/bph.13210……..174

Human lung and monocyte-derived macrophages differ with regard to the effects of β2-adrenoceptor agonists on cytokine release

Respir Res. 2017 Jun 21;18(1) :126. Doi : 10.1186/s12931-017-0613-y……186

The role of Toll-like receptors in the production of cytokines by human lung macrophages
Accepté pour publication dans Journal of Innate Immunity, Octobre 2018……..196

Bitter taste receptors (TAS2Rs) in human lung macrophages: receptor expression and inhibitory effects of TAS2R agonists
Article soumis Pharmological Research.....208

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 243

Avant-Propos

Ce travail de recherche trouve son origine dans mon activité de médecin pneumologue. En 2009, alors médecin en formation, je constate les dégâts de l'épidémie de grippe A H1N1. La grippe saisonnière avait en effet été particulièrement virulente, responsable de 323 décès selon l'Institut de Veille Sanitaire. Mais, plus que par sa virulence, nous étions surtout surpris par les catégories de patients sévèrement touchés, plutôt inhabituelles pour ce type d'épidémie. Parmi celles-ci : les femmes enceintes et les sujets obèses. Pour la première fois, les sujets obèses apparaissaient comme particulièrement vulnérables face à l'infection grippale. Ceci persistait après abstraction de leurs comorbidités et suggérait donc une susceptibilité infectieuse respiratoire spécifique. Le lien entre obésité, mécanismes de régulation énergétique et immunité était déjà un sujet de recherche exploré depuis plusieurs années. Nous avons décidé de nous intéresser au retentissement de l'obésité sur l'immunité pulmonaire et plus particulièrement sur le fonctionnement des macrophages pulmonaires.

Le terme de macrophage décrit littéralement une cellule de grande taille capable de « manger » des pathogènes et/ou débris cellulaires. Outre ces propriétés phagocytaires, le macrophage est une cellule clé de l'immunité innée, impliquée dans les mécanismes de réparation tissulaire, inflammation et orientation de l'immunité adaptative. Ce terme recoupe un ensemble de cellules éminemment hétérogènes. En fonction de leur localisation dans le corps humain, les macrophages acquièrent certaines spécificités fonctionnelles. On distingue les monocytes circulants des macrophages tissulaires qui se décomposent eux-mêmes en sous-populations en fonction de l'organe concerné : macrophages péritonéaux, macrophages pulmonaires, cellules de Kuppfer, microglie... Les macrophages pulmonaires sont les seuls qui sont constamment et de façon directe exposés aux composés exogènes externes (pathogènes, particules inorganiques, allergènes). Cette position leur confère un double rôle de protecteur contre les agressions extérieures et de garant de l'intégrité tissulaire pulmonaire.

En fonction de leur environnement, les macrophages peuvent adapter leur fonctionnement ; on parle de polarisation. On distingue très schématiquement deux stades différents de polarisation : les macrophages M1 sont les effecteurs des propriétés microbicides et participent à la réponse inflammatoire initiale alors que les macrophages M2 sont plutôt impliqués dans les mécanismes de résolution de l'inflammation, de réparation tissulaire, et d'immunotolérance. La polarisation des macrophages représente en fait un spectre bien plus

large d'états d'activation, réversibles et finement régulés. Des variations du phénotype des macrophages ont été associées à diverses pathologies respiratoires, aigues ou chroniques (infections, asthme, BPCO…).

Nous nous sommes intéressés aux modifications de la polarisation des macrophages pulmonaires en lien avec l'obésité. Au cours de l'obésité, le fonctionnement des adipocytes change et leur production de cytokines est altérée. Les adipokines sont des cytokines relarguées par le tissu adipeux. Avec la prise de poids, la concentration plasmatique de leptine s'élève et celle de l'adiponectine baisse. Nous avons étudié l'impact de ces adipokines sur la polarisation des macrophages.

Il existe des divergences inter-espèces importantes et les techniques de culture des macrophages peuvent influer sur leur polarisation. Ceci limite la transposition des données issues des modèles murins ou à partir de macrophages dérivés de monocytes circulants différenciés *in vitro*. Nous nous sommes ainsi attachés à utiliser des macrophages pulmonaires humains isolés à partir d'explants de parenchymes de patients opérés.

Dans un premier temps, nous avons étudié la production d'adipokines (leptine, adiponectine) par le parenchyme pulmonaire humain ; nous avons étudié la corrélation entre cette production et l'IMC des sujets et vérifié l'expression de leur récepteur sur les macrophages isolés. Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'impact de concentrations variables d'adipokines (leptine, adiponectine, chémérine, visfatine) sur l'état de polarisation de ces macrophages, en se focalisant sur leur production de médiateurs de l'inflammation (cytokines, chimiokines). Dans une dernière partie, nous avons élargi à l'effet des adipokines sur d'autres cellules clé du système respiratoire : les cellules épithéliales bronchiques. Nous avons en effet étudié la production d'adipokines par des explants de bronche et l'effet de concentrations croissantes d'adipokines sur la production de cytokines-chimiokines par des cellules épithéliales bronchiques humaines.

Ce travail a bénéficié d'un soutien financier de l'association Cardif-Assistance et de la Fondation Franco-Américaine Maréchal FOCH

Valorisation des travaux de recherche

- **Article n°1 :**

L'obésité, facteur de mauvais pronostic au cours de l'épidémie de Grippe A (H1N1) 2009 : rôle des adipokines dans la modulation des défenses respiratoires

Hélène Salvator, Philippe Devillier, Elisabeth Rivaud, Emilie Catherinot, Patrick Honderlick, Louis-jean Couderc.

Rev Pneumol Clin. 2011 Sep;67(4):244-9. doi: 10.1016

- **Article n°2**

Adiponectin inhibits the production of TNF-α, IL-6 and chemokines in human lung macrophages

Hélène Salvator, Stanislas Grassin-Delyle, Emmanuel Naline, Marion Brollo, Charlotte Abrial, Tatiana Victoni, Louis-Jean Couderc, Philippe Devillier

Soumis à Thorax

- **Article n°3**

Dual effect of Adiponectin on human lung bronchial epithelial cells

Hélène Salvator, Stanislas Grassin Delyle, Emmanuel Naline, Marion Brollo, Caroline Fournier, Louis-Jean Couderc, Philippe Devillier

Prêt pour soumission

- **Article n°4**

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

Charlotte Abrial, Stanislas Grassin-Delyle, **Hélène Salvator**, Marion Brollo, Emmanuel Naline and Philippe Devillier

Br J Pharmacol. 2015 Sep;172(17):4319-30. doi: 10.1111/bph.13210

- **Article n°5**

Human lung and monocyte-derived macrophages differ with regard to the effects of β2-adrenoceptor agonists on cytokine release

Tatiana Victoni , **Hélène Salvator** , Charlotte Abrial , Marion Brollo , Luis Cristovao Sobrino Porto , Vincent Lagente , Emmanuel Naline , Stanislas Grassin-Delyle, Philippe Devillier

Respir Res. 2017 Jun 21;18(1) :126. Doi : 10.1186/s12931-017-0613-y

- **Article n°6**

The role of Toll-like receptors in the production of cytokines by human lung macrophages
Stanislas Grassin-Delyle, Charlotte Abrial, **Hélène Salvator**, Marion Brollo, Emmanuel Naline and Philippe Devillier
Accepté pour publication dans Journal of Innate Immunity, Octobre 2018

- **Article n°7**

Bitter taste receptors (TAS2Rs) in human lung macrophages: receptor expression and inhibitory effects of TAS2R agonists
Stanislas Grassin-Delyle, **Hélène Salvator**, Nikola Mantov, Charlotte Abrial, Marion Brollo, Christophe Faisy, Emmanuel Naline, Louis-Jean Couderc and Philippe Devillier
Article soumis Pharmological Research

- **Brevet européen N° 17306792.7 déposé en Décembre 2017**
- **Communications orales en congrès**
  - *Adipokines differently modulate human lung macrophage polarization* ***P2T Poitiers 2014***
- **Posters en congrès**
  - *Obésité et immunité respiratoire : effet des adipokines sur la polarisation des macrophages pulmonaires humains.* ***P2T Toulouse 2011***
  - *Adiponectin acts as an anti-inflammatory cytokine on the release of M1- and M2-cytokines by human lung macrophages.* ***ERS Barcelone 2013***

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1. Interprétation de l'Indice de Masse Corporelle selon la définition de l'OMS

Figure 2. Prévalence de l'obésité dans le monde en fonction du sexe.

Figure 3. Principales localisations des dépôts de tissu adipeux.

Figure 4. Structure du tissu adipeux.

Figure 5. Fonctions de l'adipocyte.

Figure 6. Principales étapes de l'adipogénèse et facteurs régulateurs.

Figure 7. Transformation du tissu adipeux au cours de l'obésité.

Figure 8. Coupes histologiques de tissu sous cutané de sujets obèses avant et trois mois après chirurgie bariatrique.

Figure 9. Leptine et ses récepteurs

Figure 10. Voies de signalisation de la leptine après fixation sur son récepteur ObRb

Figure 11. Effets de la leptine sur les cellules de l'immunité innée et adaptative

Figure 12. Structure protéique de l'adiponectine

Figure 13. Etapes pour la formation des oligomères d'adiponectine

Figure 14. Différentes formes d'adiponectine et leur poids moléculaire chez l'homme

Figure 15. Voies de signalisation de l'Adiponectine

Figure 16. Structure biochimique de l'AdipoRon

Figure 17. Propriétés des sous-populations de macrophages en fonction de leur localisation anatomique.

Figure 18. Voies de signalisation des principaux agents polarisants M1/M2 des macrophages

Figure 19. Les voies métaboliques de l'acide arachidonique

Figure 20. Spectres d'état d'activation des macrophages

Figure 21. Schéma représentant les modifications de polarisation des macrophages au cours d'un processus inflammatoire.

Figure 22. Facteurs impliqués dans la modulation du phénotype des macrophages associés au tissu adipeux au cours de l'obésité

Figure 23. Isoformes d'adiponectine présentes dans du sérum humain

Figure 24. Isoformes d'adiponectine dans du sérum (colonnes 1 et 2) et dans du parenchyme pulmonaire humain (colonnes 3 et 4)

Figure 25. Production de TNF-α, IL6, CCL3, CCL5, CXCL8 par des macrophages pulmonaires humains en présence de leptine (A), Visfatine (B) et chémérine (C) ± LPS

Figure 26. Dosage des cytokines-chimiokines TNF-α (A), CCL2 (B), CCL3 (C), CXCL1 (D), CXCL8 (E) dans les surnageants de macrophages transfectés par des SiRNA AdipoR1 et AdipoR2

Figure 27. Schéma récapitulatif de l'action de l'adiponcetine et AdipoRon sur la production de cytokines et chimiokines par des macrophages pulmonaires humains et des cellules épithéliales bronchiques humaines.

Tableau 1. Principales adipokines connues : source de production, récepteurs, effet biologique

Tableau 2. Principaux marqueurs de polarisation M1/M2.

LISTE DES ABREVIATIONS

Ac	anticorps
ADN	*acide désoxyribonucléique*
Akt	protéine kinase B
AMPc	a*enosine MonoPhosphate cyclique*
AMPK	adenosine monophosphate protein kinase
APN	adiponectine
APPL1	*containing a phosphotyrosine binding domain and leucine zipper motif*
Arg1	*arginase-1*
ARN	*acide ribonucléique*
ARNm	ARN messager
ATM	adipose tissu macrophages
BEGM	*bronchial epithelial growth medium*
BPCO	broncho-penumopathie chronique obstructive
BMI	*body mass index*
BSA	albumine de sérum bovin
CCR	*CC chemokine receptor*
CFU-GM	*coloning forming unit of granulocyte and macrophage cells*
CFU-ML	*coloning forming unit of myeloid and lymphoid cells*
CMKLR1	chemokin like receptor 1
COX	cyclooxygenase
CSF	*colony-stimulating factor*
CysLT	cystéinyl leucotriène
DMSO	diméthylsulfoxyde
ELISA	*enzyme-linked immunosorbent assay*
EPA	acide eicosapentaénoïque
ERK	*extra cellular-signal regulated kinase*
FATP	fatty acid transportor
G3P	glycéraldehyde 3 phosphate
GAPDH	glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GLUT4	transporteur de glucose 4
GM-CSF	*granulocyte macrophage colony stimulating factor*
GPR1 G	*protein-coupled receptor 1*
HTA	hypertension artérielle
IFN	interféron
Ig	mmunoglobuline
IL	interleukine
ILCs	***i****nnate lymphoids cells ILCs*
I**MC**	indice de masse corporelle
IRF	i*nterferon regulator factor*
IRS	*insulin receptor substrate*
Jak	janus-kinase
JNK	cJun N-terminal kinase
LBA	lavages broncho-alvéoalaires
LDL	l*ow density lipoprotein*
LOX	lipoxygénase
LPS	lipopolysaccharide
MAP kinase	m*itogen activated protein kinase*
MARCO	*macrophage receptor with collagenous structure*
M-CSF	*macrophage colony stimulating factor*
MDM	macrophages dérivés de monocytes
MRC1	*mannose receptor (3) 1*
MyD88	*myeloid differenciation primary response gene 88*
NAD	nicotinamide dinucleotide
NADPH	nicotinamide adénine di-nucléotide phosphate
NAMPT	nicotinamide phosphoribosyltransférase
NF-κB	*nuclear factor κB*

NLR	NOD (nucleotide-binding oligomerization domain)-like receptors
NO	monoxyde d'azote
OMS	organisation mondiale pour la santé
OR	*odds ratio*
P38 MAPK	p38 mitogen-activated protein kinase
PAMP	*pathogen associated molecular pattern*
PCR	*polymerase Chain Reaction*
PGES	*prostaglandin E synthase*
PI3K	phosphoinositide 3 kinase
PKC	protéine kinase C
PLA2	phospholipase A2
PLC	phopholipase C
PPAR	*peroxisome proliferator activated receptor*
PRR	*pathogen recognition receptor*
PTP1B	protein tyrosine phosphatase 1B
ROS	*reactive oxygen species*
RPMI	roswell park memorial institute
RT-qPCR	*reverse transcriptase-quantitative polymerase chain reaction*
SAHOS	syndrome d'apnée hypopnée obstructive du sommeil
SAT	subcutaneous adipose tissue
S.E.M	*standard error of mean*
siRNA	silencer acide ribonucleotide
SDRA	syndrome de détresse respiratoire aigue
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis
SOCS	*supressor of cytokine signaling*
STAT	*signal transducer and activator of transcription*
SVF	sérum de veau fœtal
TAM	*tumour associated macrophages*
TG	triglycérides
TGF-β	*transforming growth factor-β*
TGM2	transglutaminase-2
TLR	*receptor toll-like*
TNF-α	*tumor necrosis factor-α*
TRIF	T*IR-domain containing adapter-inducing Interferon*
VAT	visceral adipose tissue
VEGF	*vascular endothelial growth factor*
VIH	virus de l'immunodéficience humaine

INTRODUCTION

I. Obésité : définition, épidémiologie et impact socio-économique

A. Définition

L'obésité se caractérise par une augmentation plus ou moins homogène de la masse adipeuse. Elle est classiquement définie par un Index de Masse Corporelle (IMC) ou BMI (Body Mass Index) supérieur à 30 kg/m^2. Cet indice, qui rapporte le poids au carré de la taille, a été inventé en 1832 par le statisticien Lambert Quételet pour décrire au mieux « l'homme moyen » mais son utilisation a surtout été généralisée à partir du début du XXe siècle par les compagnies d'assurance pour stratifier le risque de leurs assurés en fonction du poids. L'IMC est encore utilisé comme un standard, reconnu en 1997 par l'OMS (Organisation Mondiale pour la Santé), pour décrire l'état nutritionnel d'un individu (Figure 1).

IMC (kg/m^2)	Interprétation
< 16.5	Dénutrition
Entre 16.5 et 18.5	Maigreur
Entre 18.5 et 25	Corpulence normale
Entre 25 et 30	Surpoids
Entre 30 et 40	Obésité
> 40	Obésité morbide

Figure 1. Interprétation de l'Indice de Masse Corporelle selon la définition de l'OMS

C'est un outil d'analyse simple, reproductible, principal marqueur de l'obésité dans les publications internationales. Cependant, cet indice est très imparfait car il ne peut pas s'appliquer aux enfants, ne prend pas en compte la masse musculaire et ne permet pas de décrire le type de répartition des graisses. On distingue en effet deux principaux types d'obésité : gynoïde *versus* androïde, selon la localisation préférentielle du gras (dans le tissu

sous cutané des cuisses et des membres dans le premier cas ou dans le secteur intra abdominal dans le deuxième). Le rapport tour de taille / tour de hanche est utile pour décrire cette répartition, étant particulièrement élevé dans le cas de l'obésité androïde. Ceci n'est pas qu'une simple description esthétique mais prend son importance en pathologie puisque l'obésité androïde est associée à un dépôt de tissu adipeux en péri-viscéral, corrélé de façon plus forte au risque cardiovasculaire.

B. Epidémiologie de l'obésité dans le monde et en France

L'obésité est considérée actuellement comme une réelle pandémie. Sa prévalence n'a cessé de croître dans le monde au cours des cinquante dernières années pour atteindre des chiffres vertigineux. Selon les estimations de l'OMS en 2016, 13% de la population mondiale (650 millions) était obèse et 39% (1.9 milliard) en surpoids (1). Une analyse globale et systématique des données épidémiologiques mondiales faisait état en 2014 de 37% d'hommes adultes et 38% de femmes présentant un IMC > 25 kg/m2 (2). Et en 2016, on comptait 671 millions d'adultes et 124 millions d'enfants de plus de quatre ans obèses et près de 1.3 billions d'adultes et 213 millions d'enfants en surpoids (3). La répartition de l'obésité est bien-sûr très inégale en fonction des pays, surtout fréquente dans les pays développés et particulièrement aux Etats-Unis où l'obésité concerne maintenant 17% des enfants et 35% des adultes (3) (4) (Figure 2).

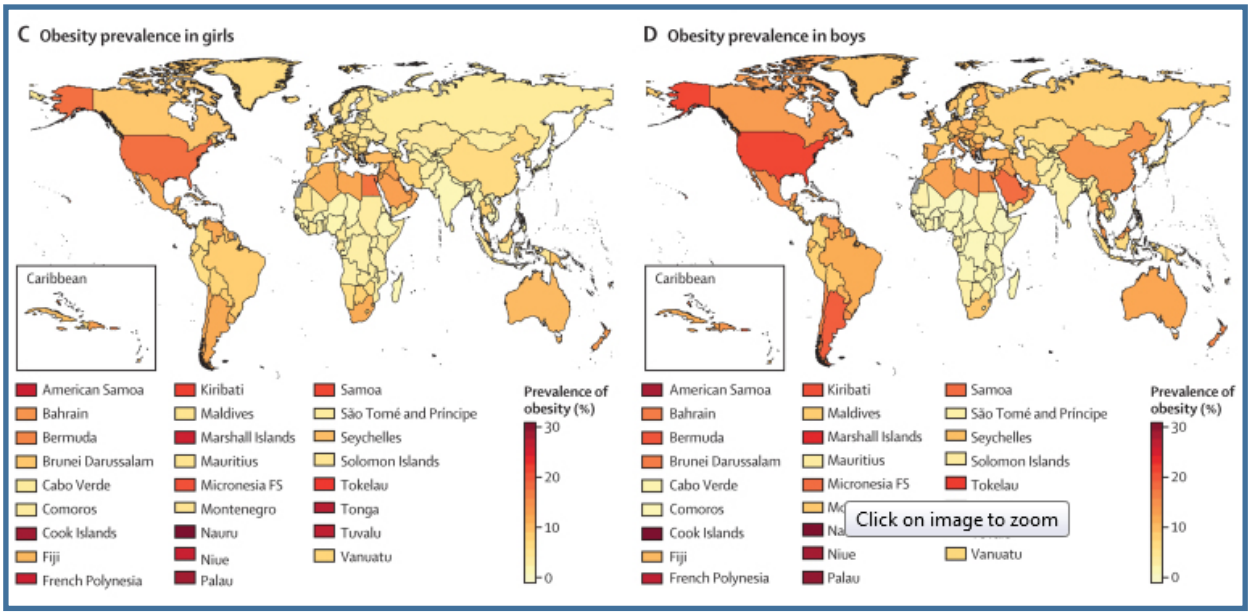


Figure 2. Prévalence de l'obésité dans le monde en fonction du sexe.
Cartes extraites de NCD Risk Factor Collaboration, Lancet 2017

En France, selon le rapport Obepi-Roche 2012 portant sur plus de 25000 sujets, 32,3% des adultes sont en surpoids et 15% présentent une obésité (5). L'obésité est plus fréquente chez les femmes (15,7% des femmes versus 14,3% des hommes) et chez les personnes de plus de 55 ans. Sa prévalence est également plus importante dans les catégories socioprofessionnelles défavorisées. Depuis 1997, la prévalence de l'obésité n'a cessé d'augmenter : augmentation de 3,6 kg en moyenne soit un poids moyen de 72,5 kg et augmentation de 5,3 cm de tour de taille soit un tour de taille moyen de 90,5 cm (5).

C. L'obésité : un enjeu de santé publique

On remarque toutefois que l'augmentation de la prévalence de l'obésité a ralenti ces dernières années (2). L'augmentation relative du nombre de personnes obèses en France comme dans l'ensemble des pays développés a significativement diminué: en France, une augmentation de 3,4% entre 2009 et 2012 contre une augmentation de 10,7% entre 2006 et 2009 et une augmentation de 18,8% entre 1997 et 2000 (5). Cette inflexion est probablement à mettre au crédit des récentes politiques de santé publiques volontaristes visant à réduire le surpoids et l'obésité dans plusieurs pays développés. En effet, les dirigeants politiques et les commissions internationales semblent avoir pris la mesure de cette épidémie et de ses conséquences sur la santé des individus. L'OMS a adopté en 2004 une Stratégie Mondiale pour l'alimentation, l'exercice physique et la santé, qui tient une place importante dans le Plan d'action Mondiale pour la lutte contre les maladies non Transmissibles 2013-2020 (6). Aux Etats-Unis, la lutte contre l'obésité a été particulièrement médiatisée par la « first lady» Michelle Obama qui a initié le programme « Let's Move » en 2010, favorisant une alimentation saine et l'exercice physique auprès des jeunes américains. Enfin, en France le Plan National Obésité 2010-2013 a cherché à intensifier les actions de préventions, coordonner le dépistage et la prise en charge médicale ainsi que favoriser la recherche sur le surpoids et ses conséquences (7).

Si les diverses institutions gouvernementales se mobilisent, c'est que l'obésité et le surpoids représentent un véritable fléau sanitaire et un poids croissant dans les dépenses de santé.

Aux États-Unis, les CDC (Centers for disease control and prevention) ont évalué les dépenses de soins de santé liées à l'obésité à 75 milliards de dollars, au début des années 2000. L'OMS estimait, en 2006, que, dans la région européenne, l'obésité et la surcharge pondérale chez les adultes représentaient jusqu'à 6 % des dépenses de santé. En France, selon une étude publiée dans La Presse médicale en 2007, les coûts médicaux liés à l'obésité sont estimés entre 2,1 et 6,2 milliards d'euros, soit entre 1,5 et 4,6 % de la dépense courante de santé en 2002 (8). Si

l'on rapporte ce calcul aux chiffres de prévalence actuels, on se rapproche plutôt d'un coût médical de l'obésité de près de 7% des dépenses de santé en France.
L'impact socio-économique lié à l'obésité et ses complications est considérable et pourrait même à terme menacer notre système de protection sociale. Ces considérations ont largement incité les gouvernements successifs à missionner des rapports d'étude (9), mettre en place des campagnes d'information et des plans d'action (10) et même à légiférer sur la prévention de l'obésité et l'amélioration de la prise en charge des patients en surpoids (11).

II. Pathologies associées à l'obésité

L'accumulation de tissu gras se fait de façon plus ou moins homogène et retentit sur tous les systèmes et organes. Outre le souci esthétique, l'obésité entraîne diverses maladies chroniques, responsables d'une morbidité spécifique et d'un surcroît de mortalité.
Il est établi que l'obésité réduit, en moyenne, l'espérance de vie de dix années. Selon l'OMS, plus de 2,8 millions de personnes meurent chaque année dans le monde des conséquences de l'obésité et du surpoids (1). En Europe, on estime que près d'un million de décès par an sont imputables à l'obésité et que 40 % des pertes d'années de vie en bonne santé sont directement liées à des déterminants nutritionnels.
Le surpoids est considéré actuellement par l'OMS comme l'un des principaux facteurs de risque de maladies non transmissibles, à l'origine de maladies métaboliques, pathologies cardiovasculaires, maladies respiratoires chroniques. Il expose les sujets au risque infectieux et favorise même la croissance de certaines tumeurs.

A. Maladies métaboliques

1. Diabète de type 2

L'épidémiologie de l'obésité et celle du diabète de type 2 sont étroitement liées, l'incidence de ces deux pathologies étant parallèlement croissante au cours des dernières décennies. La prise de poids excessive est un facteur de risque de développer un diabète ; les sujets diabétiques sont majoritairement en surpoids ou obèses (12) (13) . En France, en 2012, 16% des sujets obèses présentaient un diabète nécessitant traitement, ce qui est 7 fois plus élevé que chez des sujets de poids normal et parmi une cohorte de sujets diabétiques, près de la

moitié (43%) étaient obèses (5). Le phénomène qui sous-tend cette relation est l'insulinoresistance. Les difficultés de stockage des triglycérides dans le tissu adipeux dues à une mauvaise répartition des graisses (principalement en péri-viscéral dans le compartiment intra-abdominal) vont entrainer une augmentation des acides gras circulants et des médiateurs de l'inflammation. Ceux-ci vont perturber les voies de signalisation de l'insuline. Le glucose n'est plus capté par les cellules (foie, muscle) et on constate une hyperglycémie chronique. En réponse, les cellules ß des ilots de langherans pancréatiques vont augmenter leur production d'insuline mais cette hyperproduction entraînera progressivement un dysfonctionnement cellulaire et une fibrose du tissu pancréatique.

2. *Dyslipidémie*

Le tissu adipeux, hypertrophié en cas d'obésité, présente des difficultés pour stocker les lipides ingérés. Il en résulte des anomalies quantitatives et qualitatives des lipides circulants : hypertriglycéridémie, hypoHDL-cholestérolémie. L'insulinorésistance augmente également par elle-même la libération dans la circulation d'acides gras. Ces éléments vont interagir avec les constituants de la paroi vasculaire et favorisent l'athérogénèse.
En France, en 2012, 25,9% des adultes obèses étaient traités pour une dyslipidémie, ce qui correspond à 2,7 fois plus que des sujets de corpulence normale (5).

3. *Syndrome métabolique*

Pour décrire le risque métabolique associé à l'obésité, il a été proposé la définition du syndrome métabolique, qui associe au moins trois critères parmi les suivants :

- Augmentation du tour de taille > 102 cm chez l'homme et > 88 cm chez la femme.
- Taux de triglycérides > 1,50 g/l
- HDL cholestérol < 0,40 g/l chez l'homme et < 0,50 g/l chez la femme
- Glycémie à jeun > 1,0 g/l et/ou traitement anti-diabétique
- Hypertension artérielle

L'existence du syndrome métabolique est très fortement corrélé au risque cardiovasculaire (14).

4. *Stéatohépatite métabolique*

Autrement appelée NASH (non alcoholic steatohépatitis), la prévalence de cette affection est croissante. Elle concerne aux alentours de 25% de la population en Europe (15) et il s'agit de la deuxième cause de transplantation hépatique aux Etats Unis (16).

La stéatose consiste en une augmentation des acides gras libres intra-hépatiques faisant suite à un stress oxydatif. Elle peut évoluer vers la fibrose hépatique constituant la cirrhose (17). Elle est directement liée à l'insulinorésistance et considérée comme un précurseur du syndrome métabolique.

B. Maladies cardiovasculaires

Le surpoids est un facteur de risque majeur de maladies cardiovasculaires (18). Ceci est particulièrement vrai dans le cas d'une obésité « androïde », qui se complique d'une accumulation de lipides dans le tissu adipeux viscéral et de la survenue d'un syndrome métabolique (19). Le risque cardiovasculaire diminue avec la réduction de la masse grasse, notamment après chirurgie bariatrique (20).

1. Hypertension artérielle

Dans l'étude Obepi en France en 2012, près de 35% des sujets obèses étaient traités pour une hypertension artérielle (HTA) contre 17.4% dans la population générale, soit un risque relatif de 3.6 associé à l'excès de poids (5). Les mécanismes physiopathologiques en jeu sont probablement multiples : activation du système rénine-angiotensine par la synthèse de l'angiotensinogène dans le tissu adipeux viscéral, activation du système nerveux sympathique, insulino-resistance …

2. Maladie coronarienne

Le lien entre surpoids et survenue de maladie coronarienne a été bien établi par plusieurs grandes études de cohorte : la Framingham Heart Study, la Manitoba Study la Harvard School of Public Health Nurses Study… (21) (22) (23).

Cette relation serait due aux remaniements vasculaires artériels secondaires aux dépôts de lipides et à l'infiltration par des macrophages spumeux constituant l'athérome (24).

Dans une étude pathologique, l'examen post-mortem des artères de jeunes hommes décédés révélait que l'étendue des lésions vasculaires artérielles (stries lipidiques, plaques fibreuses, calcifications) était directement associée à l'obésité et à la taille du pannicule abdominal (25).

3. Insuffisance cardiaque chronique

Un IMC élevé prédispose à l'insuffisance cardiaque congestive par le biais de la coronaropathie mais également l'augmentation du volume sanguin et l'HTA qui majorent la

post-charge (26) (27). On estime que le risque d'insuffisance cardiaque congestive augmente de 5% pour les hommes et de 7% pour les femmes pour chaque augmentation de 1 point d'IMC. En revanche, chez les patients suivis pour insuffisance cardiaque, le surpoids n'est pas un forcément un facteur de gravité puisqu'une obésité modérée est même associée à une diminution de la mortalité (28).

C. Maladies respiratoires chroniques

La dyspnée est une plainte fréquente chez les sujets obèses (29) (30). D'un point de vue fonctionnel, l'obésité est caractérisée par une ventilation à bas et faible volume avec une diminution de la capacité résiduelle fonctionnelle (31). Il existe des anomalies de la compliance thoracique du fait de l'accumulation de tissu gras au niveau thoracique. On note une augmentation des résistances bronchiques même s'il n'y a pas de trouble ventilatoire obstructif constitué. Enfin, il existe des perturbations des rapports perfusion/ventilation (32) (33). Il en résulte que le coût respiratoire à l'effort est plus important pour les sujets obèses et corrélé à la dyspnée à l'effort (34).

Les pathologies respiratoires chroniques sont surreprésentées parmi les sujets obèses, en particulier les maladies bronchiques. Ceci s'expliquerait par des modifications anatomiques caractérisées par l'accumulation de tissu graisseux dans les parois bronchiques mais également par le relargage à partir du tissu adipeux de divers médiateurs favorisant inflammation et hyperréactivité bronchique.

1. Asthme

Il est maintenant bien reconnu que l'obésité expose à un risque accru de développer un asthme, même si l'on doit être prudent sur la validité de cette relation quand l'asthme est auto-déclaré dans les études (35) (36). Dans une méta-analyse, sur la base d'études examinant l'incidence de l'asthme chez environ 333 000 personnes obèses, les auteurs ont indiqué que les personnes en surpoids ou obèses présentaient une augmentation de 50% du risque de développer un asthme (odds ration (OR) : 1,5 ; IC à 95% : 1,27-1,8). Il existait également une relation croissante entre l'augmentation de l'IMC et le risque d'asthme (37)

Dans une étude de cohorte finlandaise, l'OR atteignait 3,0 (IC95% : 1,64-5,5) (38). A nouveau, le risque semble lié à la répartition des graisses, étant particulièrement important en cas d'obésité abdominale, du moins chez les femmes (39).

Les sujets obèses ont également plus de risque de souffrir d'un asthme sévère et plus difficile à contrôler avec les traitements inhalés classiques (40) (41). Des études de clusters réalisées parmi de larges populations de patients asthmatiques, montrent que l'asthme du sujet obèse se rapproche d'un cluster d'asthme sévère qui partage comme caractéristiques cliniques : un début tardif à l'âge adulte, une éosinophilie dans les crachats peu importante, une prédominance du sexe féminin, un contrôle difficile avec recours plus fréquent aux structures de soins et aux corticoïdes oraux (42) (43) (44).

2. Broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO)

La BPCO, caractérisée par un trouble ventilatoire obstructif non complètement réversible, est également fréquente chez les sujets obèses. Dans la Tucson Prospective Cohort Study (299 sujets avec un BMI moyen à 24), 25% des patients BPCO étaient obèses contre 16% parmi sujets avec BMI < 30 kg/m2 (OR 1.80, IC 95% : 1.32 à 2.46) (45). Steuten et al. ont étudié la prévalence de l'obésité dans une grande population de patients atteints de BPCO aux Pays-Bas : la prévalence globale de l'obésité était de 18% chez les sujets BPCO, contre 10% dans la population générale (46). Par contre, de façon paradoxale, il est très clair que le surpoids confère un avantage en terme de survie dans le cas d'une BPCO sévère (47).

A nouveau, pour expliquer le lien entre maladie bronchique et obésité, sont évoqués à la fois les contraintes anatomiques imposées par l'accumulation de tissu graisseux mais également l'inflammation systémique générée par les adipocytes, les acides gras circulants et l'insulinorésistance (48).

3. Le syndrome d'apnée-hypopnée obstructives du sommeil (SAHOS)

Le SAHOS est caractérisé par la survenue répétée d'interruption ventilatoire au cours du sommeil, responsable d'un sommeil non réparateur et d'une fatigue diurne. L'obésité prédispose au SAHOS en raison de l'accumulation de graisse autour du cou, entrainant une augmentation de la pression extraluminale et une propension à l'affaissement des voies aériennes supérieures (49). Dans la Sleep Heart Health Study, la proportion de sujets atteints de SAHOS est de 32 % en cas d'obésité contre 12% chez des sujets de poids normal. Dans les obésités morbides, la proportion de SAHOS atteint les 60%. Les données de la cohorte du sommeil du Wisconsin montrent qu'une augmentation de 20% du poids était associée à une augmentation de 70% de l'index d'apnée-hypopnée (IAH), alors qu'une réduction de 20% du poids était associée à une diminution de 48% de l'IAH (50). Lorsque le SAHOS est associé à une BPCO, on appelle cela un Overlap Syndrome.

4. *Le syndrome obésité-hypoventilation SOH*

Le SOH se définit par l'existence hypoventilation alvéolaire avec hypercapnie diurne (PaO2 < 70 mmHg, PaCO2 ≥ 45 mmHg) chez un sujet obèse (IMC > 30 kg/m2) qui n'a, par ailleurs, pas d'autre affection respiratoire pouvant expliquer les anomalies gazométriques (49).

Selon une étude française, parmi 174 patients souffrant de SAHOS et candidat à une ventilation en pression positive, le pourcentage de patients avec hypercapnie diurne répondant au diagnostic de SOH était de 11% et atteignait 23,6 % des sujets ayant un IMC > 40 kg/m2 (51). Selon une étude nord-américaine, parmi 277 patients obèses hospitalisés aux urgences, 31 % avaient un SOH (52).

D. Infections respiratoires

Il existe un lien entre surpoids et risque infectieux. L'obésité est par exemple un facteur de risque établi pour les infections du site opératoire, les infections nosocomiales, les parodontites et les infections cutanées (53).

On remarque la propension de ces sujets aux infections respiratoires en particulier. Par exemple, Baik et al. ont montré dans une large étude de cohorte américaine que l'obésité et la prise de poids étaient corrélées au risque d'acquisition de pneumopathie aigue communautaire chez les sujets féminins (risque relatif : 2.2 sur une période de suivi de 20 ans) (54). Dans une étude polonaise, l'incidence des infections des voies aériennes supérieures était deux fois plus importante chez des enfants obèses par rapport aux sujets de poids normal (55).

Mais c'est surtout avec l'exemple de la grippe A H1N1 2009 que l'on retrouve cette susceptibilité marquante aux infections respiratoires. Au cours de cette épidémie, l'obésité est ressortie comme un facteur de risque important de grippe grave. Les sujets obèses étaient en effet nettement surreprésentés parmi les cas hospitalisés, les sujets hospitalisés en soins intensifs, et parmi les décès, que ce soit aux USA, Mexique ou en Europe ; ceci en comparaison avec la prévalence de l'obésité dans la population générale de chacun des pays concernés (56) (57) (58) (59). En France, entre Juillet et Novembre 2009, sur 244 cas de grippe hospitalisés, les sujets obèses représentaient 21% des patients hospitalisés et 30% des décès (60).

Le Haut conseil de la santé publique (HCSP) en France a intégré en 2011 ce facteur de risque dans le calendrier vaccinal et l'obésité est désormais reconnue comme une comorbidité devant faire recommander la vaccination antigrippale annuelle (61).

E. Autres pathologies

1. Cancers

Plus récemment, plusieurs études épidémiologiques ont pointé l'association entre l'augmentation de l'obésité et le risque de développer certaines tumeurs malignes, comme les cancers digestifs (cancer colorectal, cancer de l'œsophage et de l'estomac, du pancréas, du foie), les cancers gynécologiques (cancer du sein post ménopausique, de l'endomètre, de l'ovaire) ainsi que le lymphome non hodgkinien, le myélome multiple (62).

Le surpoids et l'obésité augmentent aussi le risque de décès chez les patients atteints de cancer, en relation avec leurs effets pathophysiologiques sur la croissance tumorale et les difficultés qu'ils engendrent dans la prise en charge thérapeutique (risque opératoire, adaptation des posologies de traitements anti cancéreux). Aux États-Unis, on estime que les effets du surpoids et de l'obésité pourraient expliquer 14% des décès par cancer chez les hommes et 20% des décès par cancer chez les femmes, alors que le maintien d'un poids normal à un indice de masse corporelle (IMC) <25 kg/m2 pourrait prévenir 90 000 cas de cancer par an (63). Le rôle de la perte de poids intentionnelle dans la prévention de l'incidence et de la mortalité anticancéreuses a été démontré dans des études de chirurgie bariatrique. Dans une étude suédoise sur 4000 sujets obèses, les auteurs ont comparé le devenir de 2010 patients ayant bénéficié d'une chirurgie bariatrique à celui de 2036 contrôles. Après un suivi médian de 10,9 ans, la perte de poids après chirurgie bariatrique était associée à une réduction de 40% de l'incidence du cancer (64).

Actuellement, le lien entre obésité et cancer est expliqué par plusieurs mécanismes : augmentation de facteurs de croissance tumoraux tels que l'insuline et le facteur de croissance analogue à l'insuline (IGF-1), rôle des adipokines dans la régulation de la croissance cellulaire et de l'immunotolérance, inflammation de bas grade et augmentation du stress oxydatif, altération du microbiome intestinal (65)

2. Complications ostéo-articulaires

L'arthrose est fréquente chez les sujets en surpoids, principalement la gonarthrose dont le risque de survenue est 3 à 4,8 fois plus élevé respectivement chez une femme et un homme obèse par rapport à un sujet de poids normal. Le facteur mécanique est évident pour les articulations portantes mais on évoque également le rôle pro-inflammatoire des médiateurs du

tissu adipeux. D'autres pathologies rhumatismales sont fréquentes : la goutte du fait de l'hyperuricémie, les tendinopathies, l'ostéonécrose aseptique des têtes fémorales …

3. Complications dermatologiques

De nombreuses dermatoses bénignes sont plus fréquentes chez les sujets obèses, principalement due à un facteur mécanique : mycose des plis, hyperkératose plantaire mais également acanthosis negricans (hyperpigmentation des gros plis), hyperhydrose, acné.…

III. Le tissu adipeux

Le tissu adipeux est un tissu conjonctif complexe qui représente, chez un individu normal, 20% du poids du corps. On distingue le tissu adipeux blanc, majoritaire, et le tissu adipeux brun.

A. Localisation

La graisse brune est surtout abondante chez les mammifères hibernants car elle est impliquée dans la thermogénèse. Dans l'espèce humaine, elle est présente principalement au début de la vie. Elle se répartit dans la région interscapulaire, autour des gros vaisseaux, des reins et du cœur.

Le tissu adipeux blanc est majoritaire chez l'homme adulte et se distingue en deux sous-types selon sa localisation :

- *Tissu adipeux sous-cutané, le SAT* (Subcutaneous adipose Tissue): prédomine sur la nuque et les épaules chez l'homme, sur la poitrine, les hanches, les cuisses et les fesses chez la femme.
- *Tissu adipeux viscéral, le VAT* (Visceral Adipose Tissue) : localisé surtout au niveau du mésentère, des épiploons et des régions rétropéritonéales. On retrouve également du tissu adipeux au sein d'organes profonds comme le cœur (graisse péricardique), les poumons et les reins. Il existe de la graisse dans la moelle osseuse et de façon diffuse autour des vaisseaux en péri-adventitiel.
- enfin, le tissu adipeux constitue un tissu de soutien et de protection essentiel au niveau des orbites, des mains et pieds.

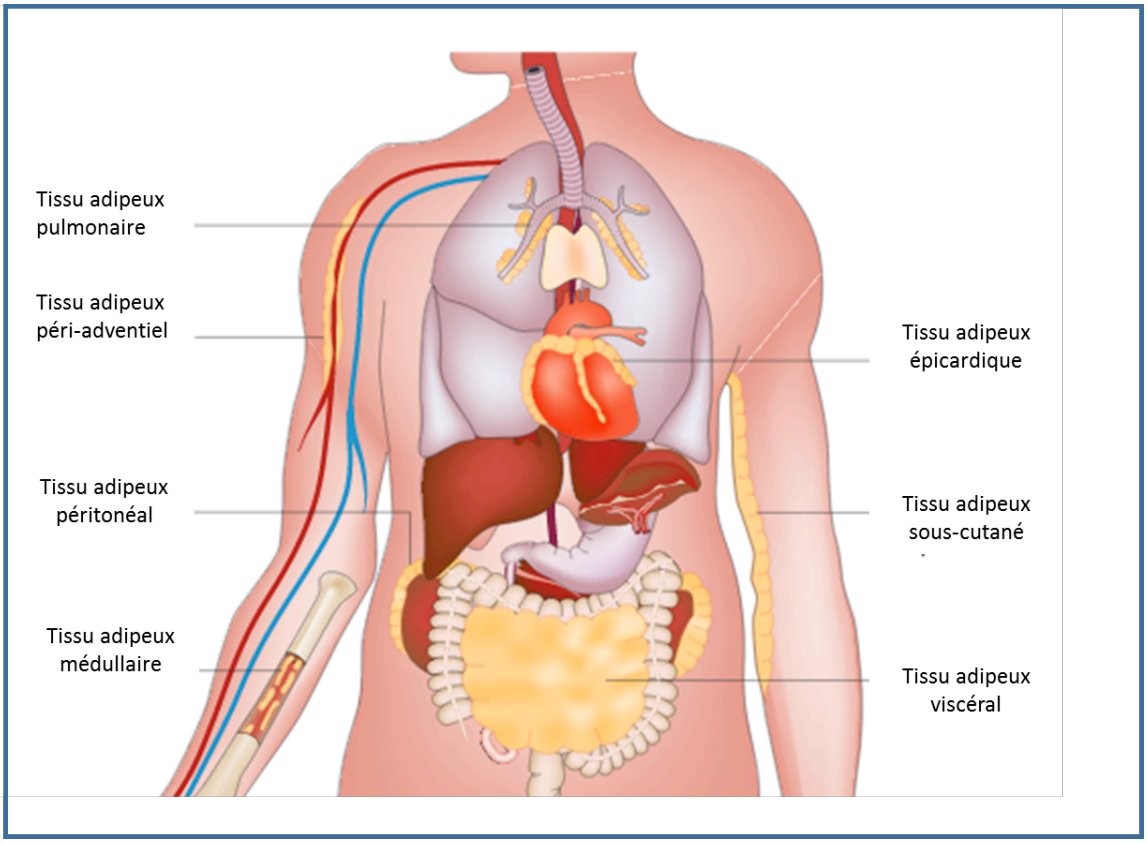


Figure 3. Principales localisations des dépôts de tissu adipeux.
D'après Ouchi et al., nature review immunology 2011 (66)

B. Structure

Le tissu adipeux est un tissu conjonctif complexe composé en majorité d'adipocytes. Ceux-ci sont des cellules de forme polyédrique renfermant une volumineuse vacuole lipidique. Ils sont groupés en lobule au sein d'un tissu de soutien comprenant des fibres de réticuline et du collagène, des capillaires sanguins, des fibres nerveuses sympathiques noradrénergiques, des fibroblastes et des cellules du système immunitaire (macrophages, éosinophiles, mastocytes et cellules NK mais également lymphocytes B, T4, Treg). L'ensemble du tissu entourant les adipocytes matures est appelé fraction stroma vasculaire (FSV).

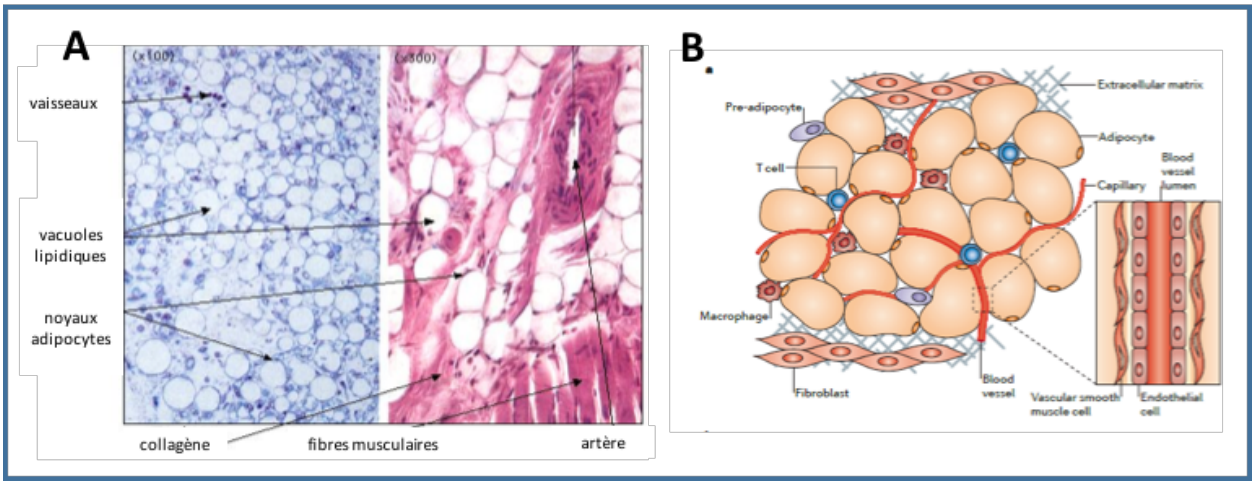


Figure 4. Structure du tissu adipeux.

A : Coupe histologique. B : représentation graphique issue de Ouchi et al. (66).

C. Fonction des adipocytes

1. *Synthèse des lipides : lipogenèse*

Les triglycérides alimentaires et le glucose en excès pénètrent dans l'adipocyte via des récepteurs transmembranaires GLUT1 et 4. L'expression de ces récepteurs à la membrane est favorisée par l'insuline. La dégradation du glucose va fournir les groupements acétyl-coA qui seront ensuite associés pour former des acides gras.

2. *Stockage des lipides*

Le stockage se fait au sein de la vacuole lipidique. Le tissu adipeux blanc renferme la quasi-totalité des triglycérides stockés dans l'organisme et représente la plus importante réserve énergétique de l'organisme qui peut être mise à contribution lorsque les réserves de glucides sont épuisées (jeûne, efforts physiques, lutte contre le froid) ou inutilisables (diabète grave)

3. *Libération des lipides*

Les principaux régulateurs de la lipolyse sont les catécholamines via l'activation des récepteurs ß3 adrénergiques et les glucocorticoïdes qui vont activer les lipases dégradant les triglycérides en acides gras non estérifiés

4. *Sécrétion de médiateurs*

Les adipocytes sont également capables de sécréter tout un panel de médiateurs intercellulaires. Parmi ceux-ci, on trouve les adipokines (leptine, adiponectine, resistine,…) spécifiques du tissu adipeux, des cytokines inflammatoires comme le TNF-α ou l'IL-6 ainsi que des facteurs angiogéniques (favorisant sa propre vascularisation), des prostaglandines, des œstrogènes, de l'angiotensinogène, des protéines du complément, etc...

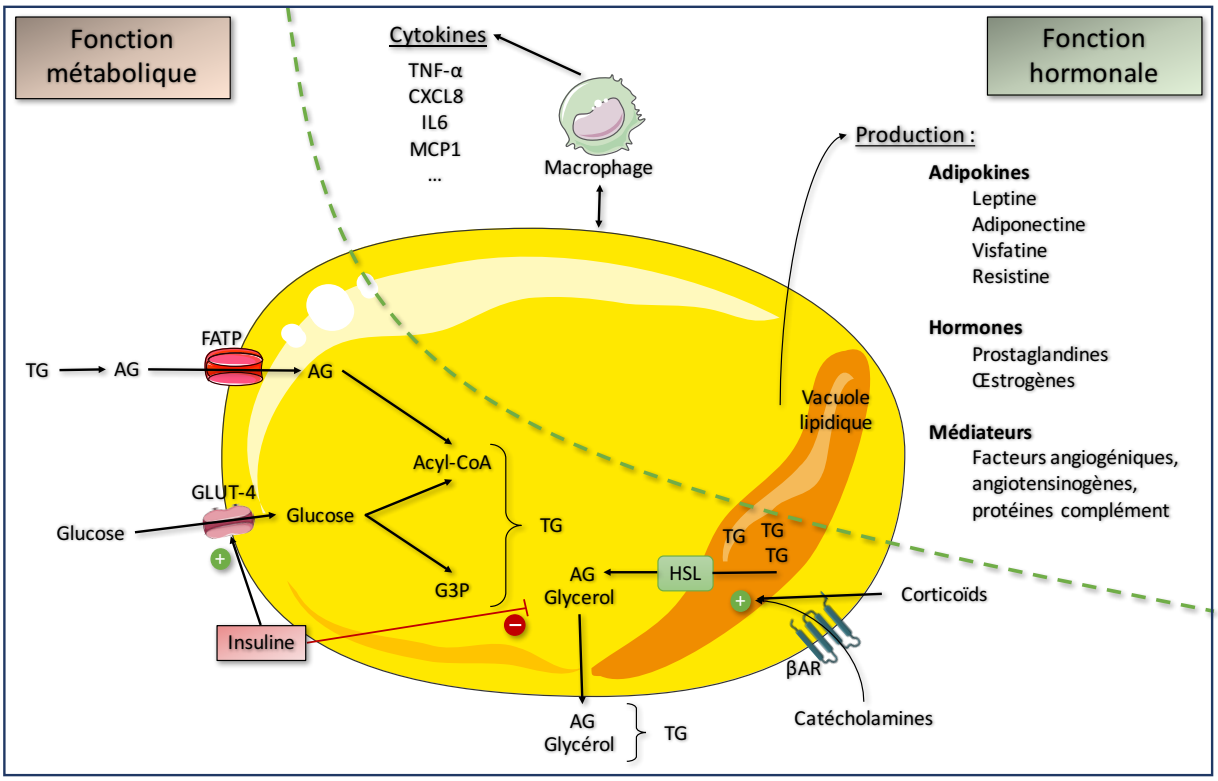


Figure 5. Fonctions de l'adipocyte.

FATP: Fatty Acid Transportor; AG : Acide Gras; TG: triglycérides; GLUT4: Transporteur de Glucose 4; G3P: Glycéraldehyde 3 Phosphate; HSL: Lipase Hormonosensible; ßAR : récepteur ß adrénergique

D. Adipogénèse

La différenciation, régénération et croissance du tissu adipeux constituent des processus continus tout au long de la vie. Les études sur le renouvellement adipocytaire en utilisant le carbone14 dans le tissu adipeux suggèrent qu'environ 10% des cellules adipeuses du corps

sont régénérées chaque année (67). Toutefois il existe une grande hétérogénéité dans le tissu adipeux en termes d'origine cellulaire, de développement et de spécialisation des adipocytes, qui dépend de la localisation du tissu, de l'âge et du gain de poids.

On estime que les précurseurs des adipocytes dérivent des cellules souches mésenchymateuses, probablement du mésoderme. Les progéniteurs adipocytaires peuvent provenir des cellules mésenchymateuses recrutées à partir de la moelle osseuse (68) mais il existerait également des progéniteurs résidents dans le tissu stromal vasculaire capables de se différencier en adipocytes matures ; les adipocyte-derived stem cells ADSC (69) (70).

La croissance du tissu adipeux se fait à la fois par hypertrophie (augmentation en taille des adipocytes) et par hyperplasie (augmentation en nombre des adipocytes).

L'adipogenèse est un processus de développement en deux étapes dans lequel une cellule mésenchymateuse indifférenciée se différencie en un pré-adipocyte puis un adipocyte chargé de lipides. À la suite de ce processus, les gouttelettes lipidiques deviennent la caractéristique dominante de la cellule. Parmi les facteurs impliqués dans ce processus de différenciation, on peut citer le récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes (PPAR) et les protéines de liaison à l'amplificateur CCAAT (C/EBPa, C/EBPb et C/EBPm) (71). Sous l'influence de plusieurs facteurs tels que l'insuline, les glucocorticoïdes et les agents qui augmentent l'AMPc, l'expression de PPARy est augmentée, ce qui induit alors l'expression des facteurs C/EBP. Ces facteurs, dans une boucle de régulation positive, vont superviser la différenciation adipocytaire (72). PPARy est l'élément déterminant de ce processus. Des modèles murins montrent que la diminution de PPARy empêche la formation de tissu adipeux blanc (73) ; chez les mammifères, des mutations naturelles de PPARy sont associés à la lipodystrophie (74). PPARy est à la fois suffisant et nécessaire pour la différenciation des adipocytes gras blancs puisque la surexpression de PPARy peut récupérer la différenciation adipocytaire dans les cellules déficientes en C/EBP, alors que l'inverse ne se vérifie pas (75).

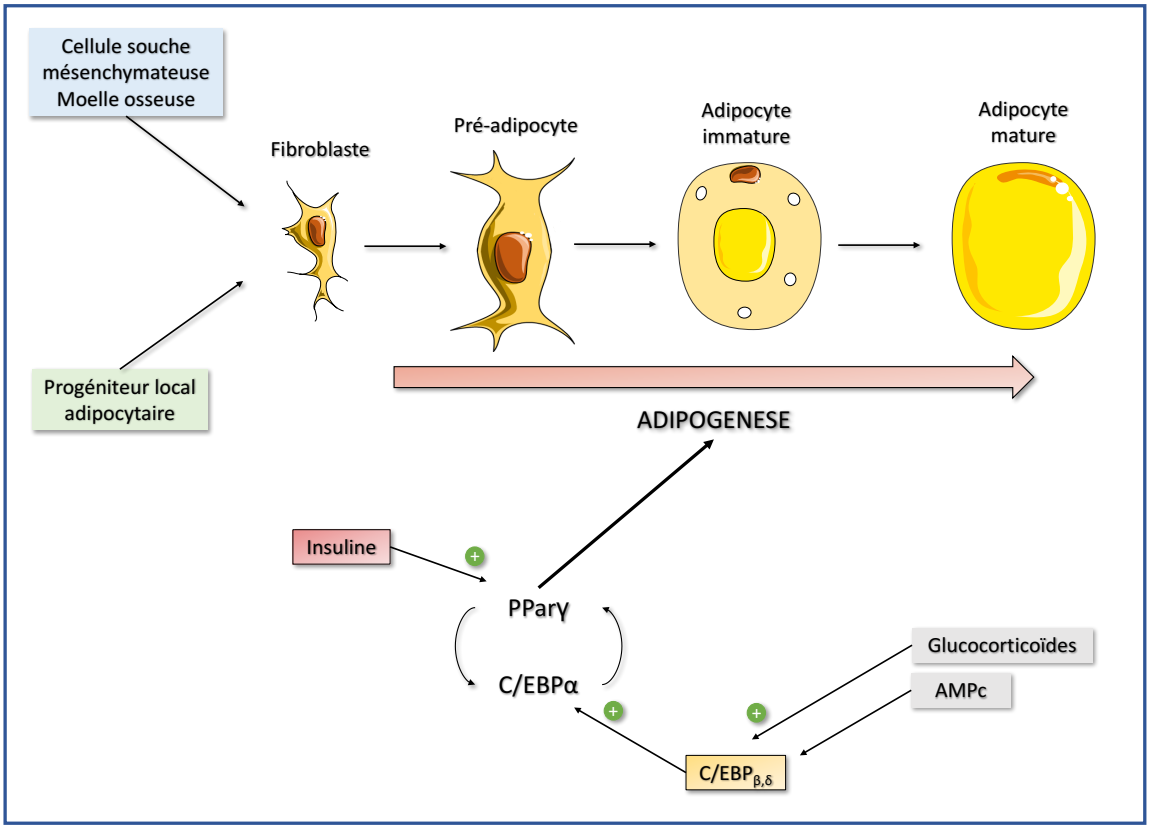


Figure 6. Principales étapes de l'adipogénèse et facteurs régulateurs

Cependant, lors du développement de l'obésité, les adipocytes subissent une hypertrophie en raison de l'augmentation du stockage des triglycérides. Au sein du tissu adipeux en expansion, il se produit alors des changements qualitatifs défavorables comprenant une raréfaction vasculaire, une nécrose adipocytaire, une modification des profils de production de médiateurs par les adipocytes et l'augmentation de l'infiltration du tissu par les cellules immunitaires, notamment les macrophages. Ces phénomènes sont induits en grande partie par l'hypoxie locale (76) ; la pression partielle en oxygène est en effet diminuée au sein du tissu adipeux de sujets obèses (77) et le facteur HIF1-α (hypoxia-inducible factor α) est surexprimé (78), participant au recrutement local de macrophages et à l'augmentation des cytokines inflammatoires.

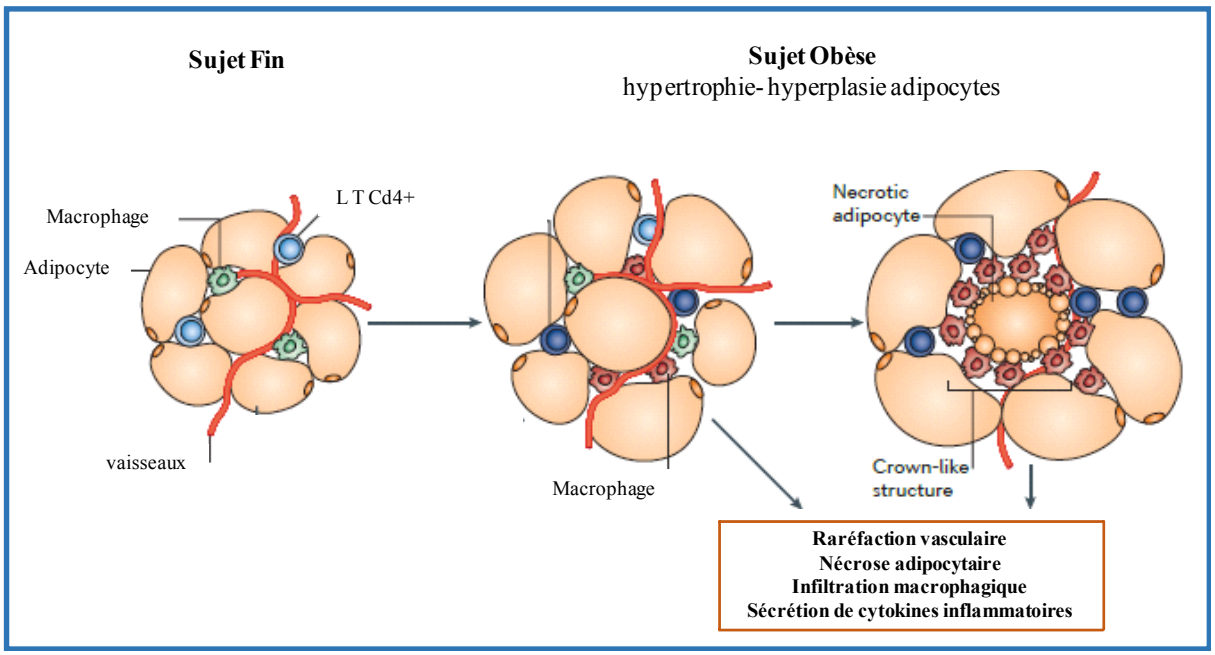


Figure 7. Transformation du tissu adipeux au cours de l'obésité. D'après Ouchi et al (67).

E. Les macrophages dans le tissu adipeux

Au côté des adipocytes matures, la fraction stroma vasculaire du tissu adipeux est riche en cellules immunitaires et tout particulièrement en macrophages. L'obésité s'accompagne d'une augmentation en nombre des adipocytes mais également des macrophages résidents. Plusieurs études ont montré chez la souris et chez l'homme que le tissu adipeux était le siège d'une infiltration par des macrophages, dont le nombre et l'état d'activation sont proportionnels à la masse grasse (79) (80). Ces macrophages, appelés ATM (adipose tissular macrophages), se répartissent en couronne autour des adipocytes. Une réduction de poids importante après chirurgie bariatrique se traduit par une diminution du nombre de ces macrophages, comme le montre l'étude anatomopathologique de Cancello et al. (81) (Figure 8). Un autre type de cellules immunitaires associées au tissu adipeux, les adipose type 1-innate lymphoids cells (AT1-ILCs), présentent une activité cytotoxique envers les macrophages et sont importantes pour réguler leur nombre à l'état stable (82).

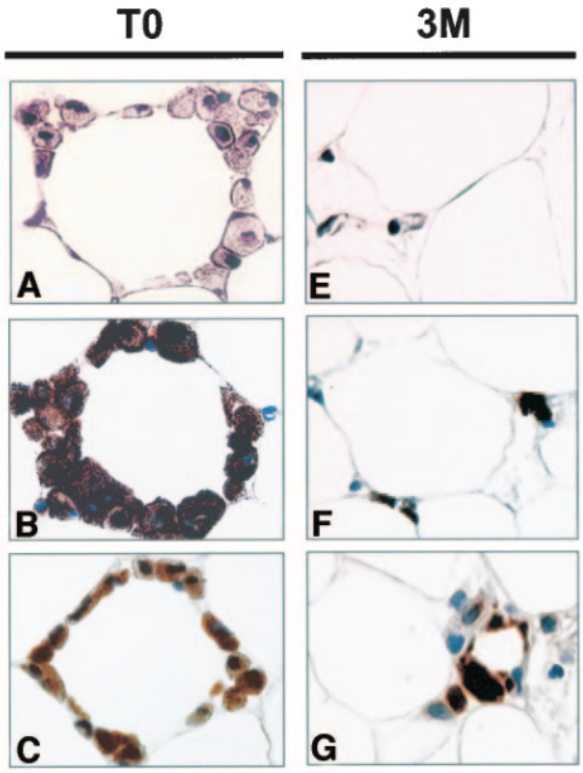


Figure 8. Coupes histologiques de tissu sous cutané de sujets obèses avant et trois mois après chirurgie bariatrique. Issue de Cancello et al. Diabetes 2005 (81)

Les macrophages sont mis en évidence par coloration à l'hématoxyline- l'éosine (A; X100), immunomarquage HAM56 (B; X100) et CD68 (C; X100). Les mêmes marquages sont utilisés sur du tissu adipeux trois mois après la chirurgie de l'obésité (E, F, G).

Ces macrophages dérivent majoritairement de précurseurs médullaires comme le montrent des expériences de transplantation de moelle osseuse chez des souris irradiées (79). Ils pourraient être recrutés au sein du tissu adipeux par l'expression de molécules chemo-attractrices comme le MCP-1, augmenté en cas d'obésité (81), ou le facteur de transcription HIF1-α induit par l'hypoxie locale secondaire à l'hypertrophie des adipocytes. Les macrophages se déposent préférentiellement en couronne autour d'adipocytes nécrotiques et jouent un rôle fondamental dans la clairance des débris cellulaires et lipides relargués (83). Ils sont également la principale source de production de nombreux médiateurs inflammatoires (TNF-α, CXCL8, MCP-1, IL-6,…), qui vont ensuite agir de façon paracrine ou être relargués dans la circulation sanguine. Ils sont ainsi supposés être les principaux acteurs à l'origine de l'inflammation chronique locale et systémique lors de l'obésité (84) (85). Ces médiateurs inflammatoires sont

associés de façon forte aux complications systémiques liées à l'obésité : dysrégulation métabolique et insulinoresistance (86), risque cardio-vasculaire (87), complications hépatiques, maladie thrombo-embolique ou encore développement de certaines tumeurs (88).
Le dialogue entre adipocytes et macrophages au sein du tissu adipeux ressort donc comme l'un des mécanismes essentiels impliqués dans les modifications métaboliques, inflammatoires et immunitaires associées à l'obésité.

IV. Les adipokines

Les adipokines regroupent un ensemble de protéines produites principalement par les adipocytes. C'est en 1987 que l'on décrit pour la première fois une cytokine, l'Adipsin, dont la production dépend du tissu adipeux (89). Quelques années plus tard, en 1994, la recherche sur le tissu adipeux prend une autre dimension avec la découverte de la leptine, cytokine produite par les adipocytes et ayant un rôle majeur dans la régulation de l'appétit et du métabolisme énergétique. Plusieurs travaux ont ensuite permis de caractériser le spectre de production des cellules adipocytaires et, en 2002, le concept d' « adipokines » est adopté pour décrire ces protéines produites par le tissu adipeux et capables d'avoir une influence systémique après passage dans la circulation (90). Elles sont nombreuses, plus ou moins spécifiques du tissu adipeux et impliquées dans des fonctions variées comme la régulation énergétique, l'insulinorésistance, la modulation immunitaire, la régulation des fonctions reproductrices…Les plus connues et les plus étudiées d'entre elles sont la leptine et l'adiponectine.

	Source	Récepteurs	Fonction
Leptine	Adipocytes	Récepteurs leptine ObRa, b, c, d, e, f	Contrôle de l'appétit Métabolisme : oxydation des acides gras, captation glucose Immunorégulation : activation des cellules granulocytaires, prolifération lymphocytaire, polarisation Th1
Adiponectine	Adipocytes	AdipoR1/2 T cadhérine	Métabolisme : oxydation des acides gras, insulinosensibilité Vasoprotecteur Immunorégulation : anti-inflammatoire
Visfatine/ NAMPT	Adipocytes Macrophages	TLR4 ? CCR5 ?	Biosynthèse de NAD Sécrétion d'insuline Immunorégulation : chemoattractant pour les monocytes, production cytokines inflammatoires Association à certains cancers et au SDRA
Chémérine	Adipocytes Foie, rein, pancréas, organes génitaux	CMKLR1 GPR1 CCRL2	Adipogénèse Captation glucose
Résistine	Monocytes Adipocytes (souris)	TLR4	Insulinorésistance (souris) Sécrétion cytokines inflammatoires Activation endothéliale
SRFP5	Adipocytes	WNT5a	Suppression du signal pro-inflammatoire induit par WNT
ANGPTL2	Adipocytes	?	Inflammation vasculaire
Lipocalin 2	Adipocytes Macrophages	?	Insulinorésistance Sécrétion cytokines inflammatoires : TNF

Tableau 1. Principales adipokines connues: source de production, récepteurs, effet biologique
NAD : nicotinamide dinucléotide ; SDRA : Syndrome de Détresse Respiratoire Aigue

A. Leptine

1. Gene et structure

La leptine est une protéine codée par le gène Ob, cloné pour la première fois en 1994 par l'équipe de J.Friedman. Il est situé sur le chromosome 7 et composé de 3 exons séparés par 2 introns. Le produit de ce gène est une protéine de 16 kDA et 167 acides aminés qui appartient à la famille des cytokines hélicoïdales de type IL-6 et partage une homologie de structure avec des facteurs de croissance tels que le G-CSF et la GH.

La leptine est produite en majeure partie par les adipocytes du tissu adipeux blanc et accessoirement par le muscle squelettique, l'hypophyse ou l'épithélium gastrique. Elle est présente dans le sang sous forme monomérique et son taux circulant est habituellement de 5 à 25 ng/ml. Mais la concentration plasmatique de leptine est proportionnelle au niveau de masse adipeuse de l'organisme ; chez le sujet obèse elle peut atteindre 60-100 ng/ml. La sécrétion de la leptine est pulsatile, elle suit un rythme circadien diurne, augmente après un régime hypercalorique et est stimulée par l'insuline.

2. Récepteurs

Il existe 6 isoformes du récepteur de la leptine qui possèdent tous un même domaine extracellulaire commun. Leur domaine intracellulaire différencie les 4 isoformes courtes ObRs (obRa principalement) de l'isoforme longue ObRb. Enfin l'isoforme circulante ObRe est caractérisée par l'absence de domaine transmembranaire (91).

Seule la forme longue ObRb permet d'induire un signal intracellulaire. Les isoformes courtes ont un rôle important dans le transport de la leptine à travers la barrière hémato-encéphalique et l'isoforme circulante ObRe, dite « binding protein » permet de stabiliser la leptine circulante et régule la proportion de leptine libre dans le plasma.

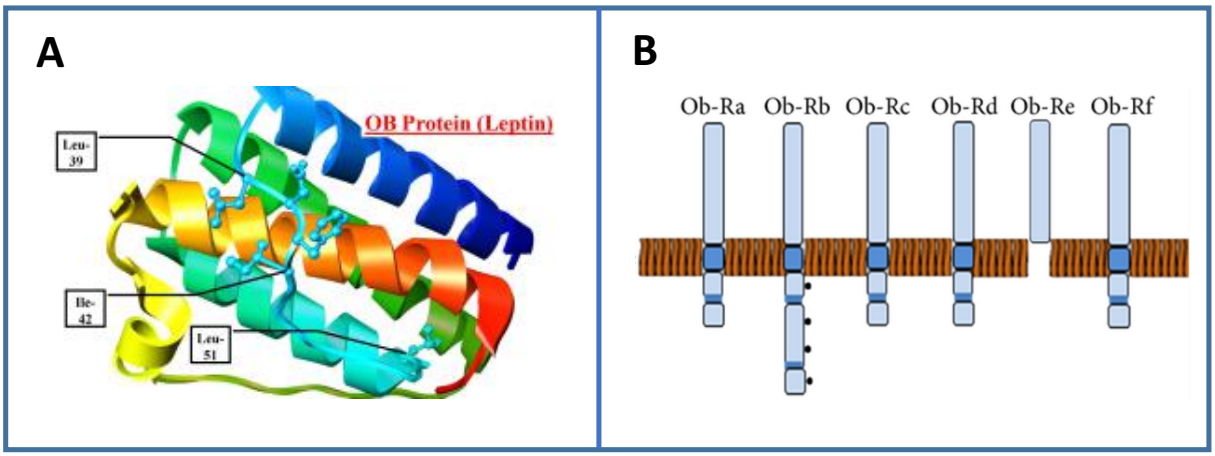


Figure 9. Leptine et ses récepteurs

A : schéma de la structure tridimensionnelle de la Leptine. B : représentation des six isoformes des récepteurs à la leptine ; seule la forme longue Ob-Rb possède un domaine intracellulaire fonctionnel

3. *Voies de signalisation*

La leptine se fixe sur son récepteur à la surface membranaire sous la forme d'un homodimère pour former un complexe tétramérique 2(ObR-Ob). Le récepteur n'a pas de fonction tyrosine kinase intrinsèque mais interagit avec les kinases JAK2 (Janus Kinase 2) via son domaine Box1. Ceci permet la phosphorylation de plusieurs résidus tyrosine : TYR^{905}, TYR^{1077}, TYR^{1138}. Chacun de ces sites de phosphorylation va induire une voie de signalisation spécifique qui dépendra également du tissu dans lequel se trouve la cellule (système nerveux central, tissu adipeux, muscles périphériques), rendant compte des différentes fonctions de la leptine (92) (93) (94) :

- On observe un recrutement des facteurs de transcriptions STAT : principalement STAT3 (dans le tissu adipeux, le muscle, le foie et l'hypothalamus) mais également STAT 1 (dans le tissu adipeux) et STAT 5 (dans l'intestin) (95) (96) (97). Cette voie est impliquée dans le contrôle de la balance énergétique et dans la régulation de la prolifération cellulaire
- Le récepteur de la leptine, via son site TYR^{985}phosphorylé ou via le recrutement de JAK2, va activer la protéine SHP2 (SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase) qui déclenche la voie MAPK (mitogen activated protein kinase) via la phosphorylation de la protéine membranaire RAS ; les effecteurs de cette voie seront les facteurs de transcriptions ERK1/2, impliqués dans l'homéostasie énergétique et

dans la différenciation cellulaire, mais également les protéines p38 et JNK (c-Jun N-terminal kinase), protéines de stress cellulaire (98).

- Enfin l'activation du récepteur de la leptine va également mettre en jeu la voie de signalisation des PI3K (phosphoinositide 3-kinase), soit par action directe, soit par l'intermédiaire du facteur IRS1/2 (Insuline receptor Substrate). Ceci mènera à l'activation des protéines AkT (protein kinase B) et de la PKC (protein kinase C). La PKC est nécessaire pour le fonctionnement de la voie MAPK citée ci-dessus. La protéine Akt est importante dans les processus de survie cellulaire. Cette voie IRS/PI3K est essentielle pour médier l'effet anorexigène de la leptine au niveau neurologique central. Elle rend compte de l'interaction entre les deux hormones, leptine et insuline (99).

Ces voies de signalisation sont régulées négativement par deux principaux acteurs : la protéine SOCS3 (Suppressor of Cytokine Signaling 3) et PTP1B (ProteinTyrosine Phosphatase 1B). Leur transcription est activée par les protéines STAT, assez précocement (à partir de 2h) après l'activation du récepteur de la leptine. Elles vont en retour inhiber les protéines JAK et STAT ainsi que les IRS. Il est intéressant de noter que les animaux KO pour SOCS3 et PTP1B présentent une sensibilité accrue à l'insuline et une résistance à l'obésité induite par l'alimentation (100) (101).

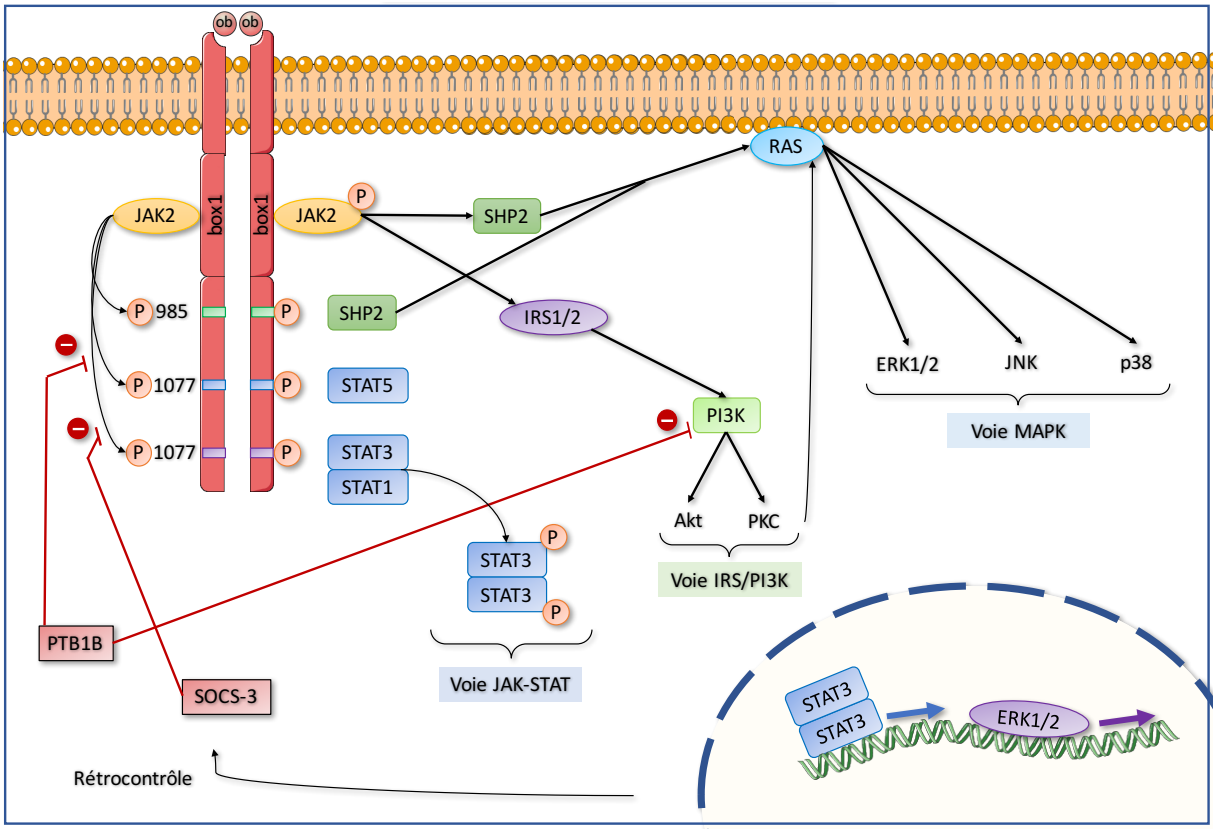


Figure 10. Voies de signalisation de la leptine après fixation sur son récepteur ObRb

4. *Effets biologiques*

Les récepteurs à la leptine sont présents sur de nombreux types cellulaires comme les neurones hypothalamiques, les macrophages, les cellules des muscles squelettiques, les hépatocytes, les pneumocytes de type 2, les cellules épithéliales bronchiques… Ceci rend compte de la variété de ses fonctions :

- Sa principale fonction est la régulation de l'appétit et de la balance énergétique, en inhibant la prise alimentaire et en augmentant la thermogenèse par innervation sympathique du tissu adipeux brun.

  Via ses diverses voies de signalisation : JAK/STAT3, MAPK et surtout IRS/PI3K, la leptine stimule la transcription du neuropeptide anorexigène POMC (proopiomelanocortin) et inhibe l'expression du neuropeptide Y (NPY) orexigène (102) (103).

  Ainsi, les animaux déficients pour le gène de la leptine (souris ob/ob) ou de son récepteur ObRb (souris db/db) présentent une obésité due à une hyperphagie et à une dépense énergétique réduite. Le traitement des animaux par de la leptine exogène augmente la dépense énergétique et réduit le poids des souris ob/ob (104). Les

humains déficients en leptine montrent une dépense énergétique normale au repos mais sont nettement hyperphagiques (105).

Cependant l'obésité humaine due à une déficience congénitale en leptine est rare. Au contraire, chez le sujet obèse, les taux circulants de leptine sont très élevés alors même qu'elle semble inactive sur la prise alimentaire : c'est le postulat de la résistance à la leptine. Ainsi, les niveaux élevés de leptine pourraient être un moyen de compenser le manque de réponse à l'hormone.

Les mécanismes conduisant au phénomène de résistance à la leptine seraient multiples (106): i) échec de l'hormone à traverser la barrière hémato-encéphalique et à agir sur ses neurones cibles (107), ii) réduction de l'expression des récepteurs de la leptine, iii) défaillance de la voie de signalisation de la leptine aux niveaux central et périphérique (108), iv) interactions entre les voies de signalisation de la leptine et divers médiateurs inflammatoires surexprimés en cas de surpoids ou modulés par des habitudes alimentaires (régime riche en sucre) (109) (110) (111), v) et enfin modulation des effets de la leptine par les variations de compositions du microbiome intestinal (112).

- La leptine agit également sur le métabolisme au niveau périphérique en régulant le métabolisme du glucose et des lipides dans le foie, le muscle squelettique et le tissu adipeux. Elle inhibe la lipogenèse de novo (113), active l'oxydation des acides gras (114). L'activation de l'AMPK induite par la leptine régule la glycolyse et la néoglucogenèse dans le muscle squelettique (115). La leptine augmente les niveaux protéiques du transporteur de glucose (GLUT) 4 et réduit l'expression et l'activité des principaux régulateurs négatifs de GLUT4 (116). Elle améliore la sensibilité à l'insuline dans les tissus périphériques, tels que le muscle, par la voie de signalisation PI3K (117).
- La leptine joue un rôle immunorégulateur qui a été bien détaillé (118) (119). Elle est essentielle pour la défense antimicrobienne. Il a été montré chez des souris Ob/Ob déficientes en leptine, une surmortalité et un défaut de clairance bactérienne par rapport aux souris normales après instillation de *Streptococus pneumoniae* ou *Klebsiella pneumoniae* (120) (121). Les récepteurs de la leptine (ObRb et ObRa) se retrouvent à la surface de la plupart des effecteurs du système immunitaire expliquant son action tant sur l'immunité innée qu'adaptative (122).

  La leptine induit l'activation, le recrutement et la prolifération cellulaire des cellules phagocytaires : polynucléaires neutrophiles, macrophages, éosinophiles et cellules dendritiques (123) (124) (125). Elle favorise la phagocytose (126) et augmente

l'explosion oxydative ainsi que la sécrétion de médiateurs inflammatoires (IL6, leucotriènes B4…) (127) (128) (129).

Dans l'immunité adaptative, la leptine influence l'homéostasie thymique en réduisant l'apoptose des cellules T thymiques (101). Sur les réponses lymphocytaires T naïves, la leptine augmente la prolifération et la sécrétion d'IL-2 par l'activation de la MAPK et de la PI3K (130). Sur les lymphocytes T mémoires, la leptine favorise la différenciation T helper 1 (TH1) en augmentant la sécrétion d'interféron-γ (IFN-γ) et de TNF (131). La leptine a également des effets anti-apoptotiques sur les cellules T matures et sur les précurseurs hématopoïétiques (132).

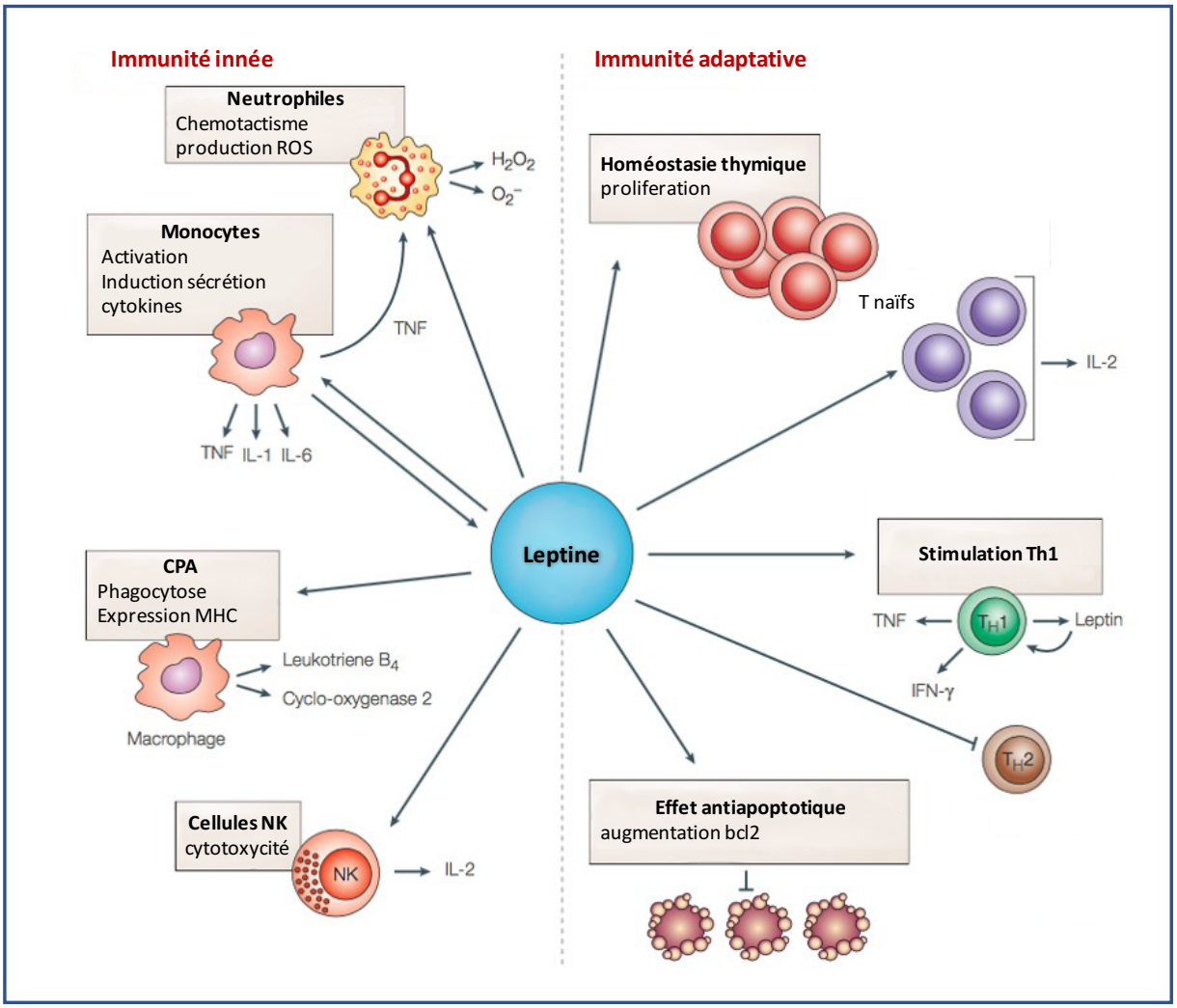


Figure 11. Effets de la leptine sur les cellules de l'immunité innée et adaptative.

D'après La Cava et Matarese. Nature reviews immunology, 2004 (118)

- Enfin, la leptine est également impliquée dans certains processus inflammatoires articulaires (133), dans les phénomènes de régulation de la reproduction (134) et l'activation endothéliale (135).

B. Adiponectine

1. *Gène et Structure*

D'abord appelée « Adipocyte complement-related protein of 30 kDa » ACRP30 du fait de son analogie structurelle avec le facteur du complément C1q, l'adiponectine a été identifiée pour la première fois en 1995 comme une protéine sécrétée par des adipocytes murins (136). Elle a ensuite été isolée dans le tissu adipocytaire humain ainsi que sous forme circulante dans le plasma humain (137).

L'adiponectine (APN) est codée par le gène *APM1/ACDC/ADIPOQ* gène (Accession ID: D45371) situé sur le chromosome 3 en position 3q27. Il est composé de 3 exons et de 2 introns et s'étend sur 16kb (138). Seuls 2 exons sont traduits en une protéine de 244 acides aminés chez l'homme. Elle est composée de 4 domaines avec une séquence signal dans le domaine amino-terminal, suivie d'une région variable sans spécificité, d'un domaine collagène et d'un domaine globulaire carboxy-terminal. Sa masse est de 30 kDa chez la souris et de 28 kDa chez l'homme (139). La région hypervariable N-terminale contient un résidu cystéine (Cys-39 chez la souris ou Cys-36 chez l'homme) qui est essentiel dans les modifications post-transcriptionnelles et notamment la formation de multimères.

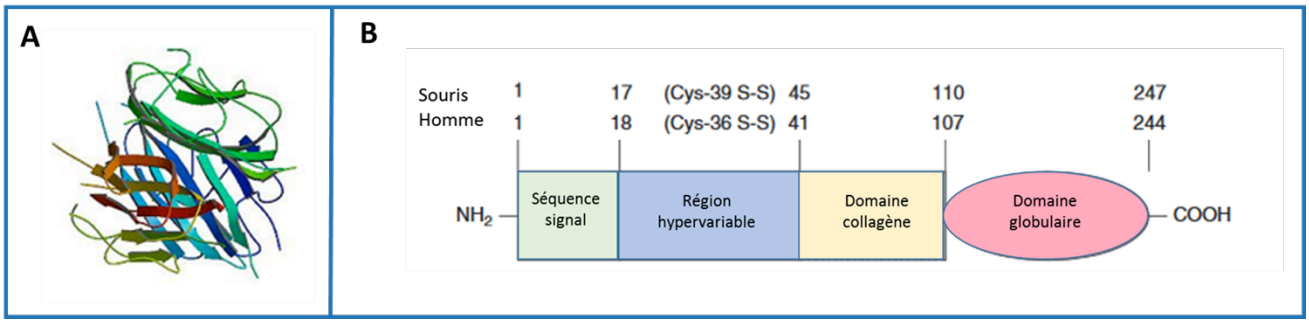


Figure 12. Structure protéique de l'adiponectine

A : Schéma structure tridimensionelle. B : représentation graphique des différents domaines protéiques du monomère. D'après Fang and Judd, comprehensive physiology 2018 (140)

2. *Sécrétion et régulation*

Les concentrations circulantes d'adiponectine sont importantes, de l'ordre de 5 à 30 mg/L, représentant 0.01% à 0.05% des protéines plasmatiques. Il s'agit de la plus abondante des adipokines. Cette concentration varie en fonction du sexe, elle est significativement plus élevée chez la femme (141), et elle subit un rythme nycthéméral avec des chutes en milieu de

nuit (142). Elle dépend également du statut nutritionnel mais au contraire de la leptine, les taux circulants d'adiponectine diminuent chez les sujets obèses (143) (144) (145). Une perte de poids (10-20%) due à un régime hypocalorique est associée à une augmentation de près de 50% des taux sériques d'adiponectine (146)

Des analyses de liquide baignant des explants de tissu adipeux ont montré que l'APN est plus volontiers sécrétée par les adipocytes du tissu sous-cutané que du tissu péri-viscéral et par les adipocytes de petite taille (72).

Suite à sa production, le monomère d'adiponectine subit des modifications post-traductionnelles intra-adipocytaires importantes qui jouent un rôle crucial dans la formation d'oligomères et sont essentielles pour la liaison ultérieure du ligand à ses récepteurs membranaires. L'assemblage des multimères d'adiponectine se fait en effet par une série complexe d'étapes dans le réticulum endoplasmique (ER) et l'appareil de Golgi (147) (148)

- Formation de trimères par hydroxylation et glycosylation sur des résidus proline et lysine dans le domaine collagène ainsi que par interactions hydrophobes entre les têtes globulaires (149).
- L'adiponectine trimérique est retenue par la protéine chaperon du réticulum endoplasmique ERp44. La formation de ponts disulfures entre les résidus Cys-39 est alors est stimulée par l'enzyme ER oxydoréductase Ero1. Ils permettent la formation d'oligomères d'ordre supérieur (2 à 6 trimères) (150) qui sont stabilisés par la protéine Dsba-L (151) (152).

Les phénomènes induisant un stress du réticulum endoplasmique peuvent entrainer une diminution de production d'adiponectine et/ou variations des ratios entre ses isoformes (153).

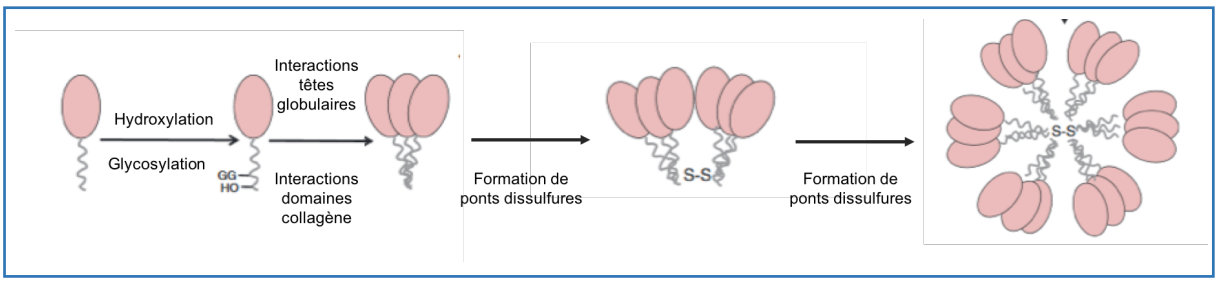


Figure 13. Etapes pour la formation des oligomères d'adiponectine

On retrouve ainsi l'adiponectine dans la circulation sous différentes formes moléculaires (**Figure 13**): la forme dite LMW (low molecular weight) correspondant aux trimères, la forme

MMW (medium molecular weight) correspondant à des hexamères (assemblage de 2 trimères) et la forme dite HMW (high molecular weight) qui correspond à un assemblage de 3 hexamères. Il existe également une forme d'adiponectine globulaire, générée localement par des élastases leucocytaires qui clivent l'adiponectine dans son domaine collagène, résultant en un fragment globulaire de 18 à 25 kDa.

La forme HWM de l'adiponectine est majoritaire (> 80%) car il s'agit de la forme la plus stable. La forme trimérique présenterait une durée de vie plus courte car plus sensible à l'action protéolytique des protéases membranaires (154) (147).

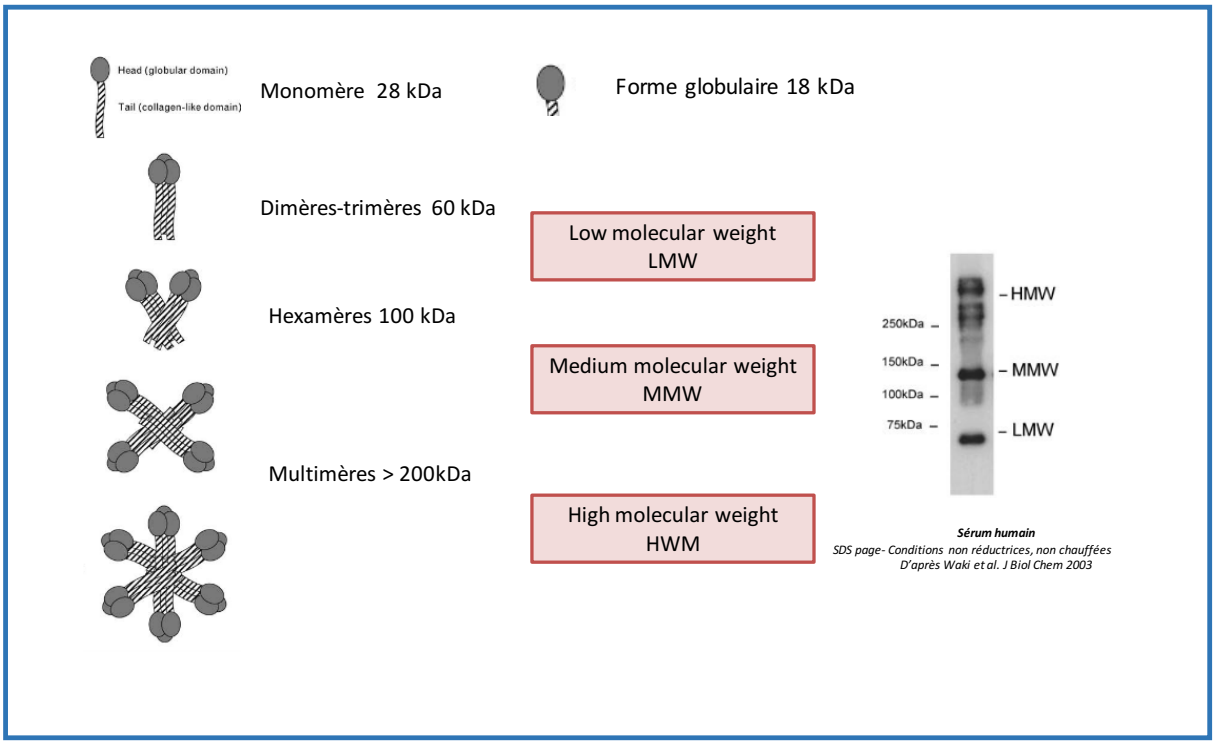


Figure 14. Différentes formes d'adiponectine et leur poids moléculaire chez l'homme.

3. *Récepteurs et voies de signalisation*

Le récepteur de l'adiponectine existe sous deux isoformes : AdipoR1 et AdipoR2, auxquelles s'ajoute la T-cadhérine, co-récepteur qui peut également fixer l'APN dans certains tissus.

AdipoR1 et 2 sont des récepteurs de type 7 domaines transmembranaires mais ils diffèrent des autres récepteurs couplés aux protéines G sur plusieurs points : leur domaine N-terminal est intracellulaire, leur domaine C-terminal extracellulaire, ils ne sont pas couplés à une protéine G et présentent une large cavité au sein de leurs hélices transmembranaires et un site catalytique liant le zinc (155) (156).

Ces deux récepteurs ont une expression ubiquitaire mais AdipoR1 est plus exprimé dans le muscle squelettique et AdipoR2 est majoritaire dans le foie. AdipoR1 présente une affinité forte pour la forme globulaire d'adiponectine alors que AdipoR2 lie indifféremment forme globulaire et forme longue. La T-cadhérine est exprimée, elle, principalement sur les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses. Ses mécanismes de transduction ne sont pas encore complément compris mais elle pourrait agir comme un co-récepteur qui fixerait principalement les formes de haut poids moléculaires d'adiponectine et elle serait impliquée dans la migration et prolifération cellulaire endothéliale (157) (158)

La protéine APPL1 (containing a phosphotyrosine binding domain and leucine zipper motif), identifiée récemment, est une protéine adaptatrice qui se fixe sur le domaine intracellulaire des récepteurs AdipoR1 et AdipoR2 et peut médier une partie de leur signalisation (159). La signalisation du signal induit par l'APN passe par les voies AMPK, p38 MAPK et l'activation du facteur de transcription PPAR-α.

- APPL1 va activer une phosphatase qui va permettre à la Liver kinase B1 (LKB1) d'être relarguée dans le cytosol. LKB1 va alors phosphoryler et activer AMPK (160). APPL1 est également responsable de l'activation du facteur de transcription PPARα, d'une petite GTPase rab5 et de p38 MAPK. Enfin APPL1 favorise les interactions entre le facteur IRS1/2 et le récepteur à l'insuline, favorisant l'action de l'insuline via la voie PI3K-Akt (161).

  APPL1 est un régulateur majeur de l'action de l'adiponectine sur la régulation énergétique. L'inactivation d'APPL1 dans un modèle murin génère une insulino-résistance sans diminuer le nombre de récepteurs à l'insuline (161).
- Indépendamment d'APPL1, l'adiponectine va induire l'activation de la phospholipase C qui augmente la concentration intracellulaire de calcium. La kinase Ca^{2+}/calmoduline-dependent protein kinase CAMKK-b va être stimulée et active la voie AMPK (162)
- Les récepteurs AdipoR présentent également une activité céramidase intrinsèque et sont capables d'hydrolyser la céramide en sphingoside 1 phosphate (S1P (163)). S1P est un lipide qui favorise la survie et la prolifération cellulaire (164). L'inactivation de adipoR1 et R2 dans des fibroblastes embryonnaires de souris diminue l'activité céramidase induite par l'adiponectine, baisse la concentration de S1P, alors que la surexpression des adpipoR dans le foie fait baisser le contenu en céramide et améliore la sensibilité à l'insuline (165).

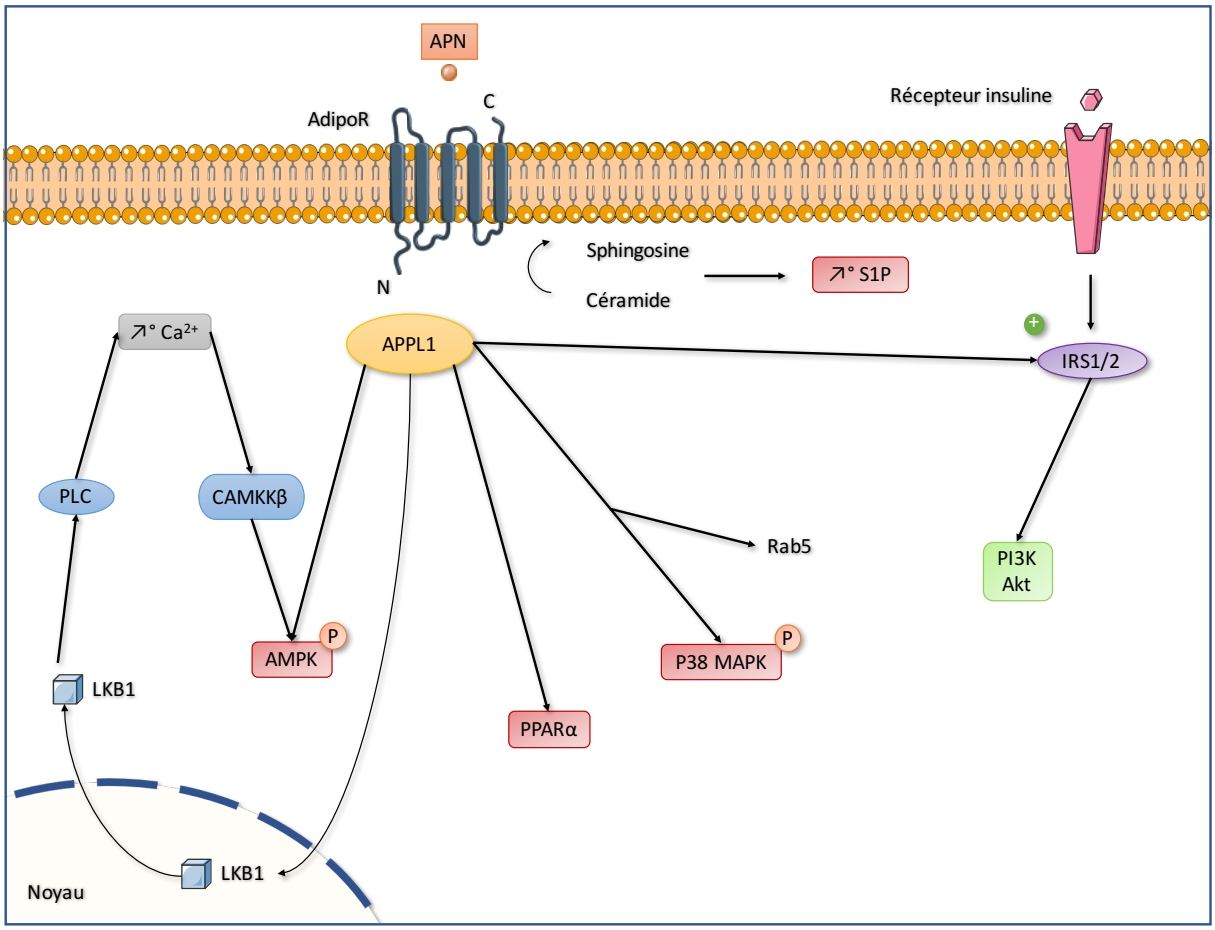


Figure 15. Voies de signalisation de l'Adiponectine

4. *Effets biologiques*

La fonction de l'adiponectine dépend de son isoforme, du type de récepteur mis en jeu et de la cellule cible.

- L'adiponectine est un facteur clé de la régulation énergétique, capable de moduler la sensibilité à l'insuline, le métabolisme glucidique et lipidique dans divers organes.

Plusieurs observations cliniques soutiennent une association entre la concentration d'APN et les dysfonctionnements métaboliques liés à l'obésité. Les niveaux plasmatiques d'adiponectine sont corrélés à l'accumulation de graisse viscérale (166). La concentration plasmatique d'adiponectine est diminuée chez les patients atteints de diabète de type 2 et les niveaux élevés d'adiponectine sont associés avec un risque plus faible de développer du diabète (167).

Les souris obèses génétiquement ob/ob ou suite à un régime hypercalorique présentent des taux d'APN circulant diminués et une insulino-résistance ; l'administration d'APN

recombinante chez ces souris améliore leur sensibilité à l'insuline et diminue le contenu en triglycérides dans les muscles et le foie (168)

L'oxydation des acides gras et la diminution du contenu en triglycérides améliorent sensiblement la sensibilité à l'insuline du muscle squelettique. Dans la cellule du muscle squelettique, l'adiponectine favorise l'oxydation des acides gras par une action AMPK-dépendante et diminue ainsi l'élévation des acides gras plasmatiques faisant suite à un repas riche en graisse (169).

Dans le foie, il a été montré que l'adiponectine augmente l'utilisation du glucose et diminue la néoglucogénèse, favorisant l'insulinosensibilité (170) (171). Ceci passe par la voie AMPK qui va diminuer l'expression des enzymes importantes de la néoglucogenèse, la phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) et la glucose-6-phosphatase (G6Pase) (172).

APPL1 interagit avec le facteur IRS1/2 et favorise la signalisation intra-cellulaire de ce récepteur à l'insuline (173). Elle promeut également la sécrétion d'insuline par les cellules des ilots pancréatiques (174). L'activation du facteur PPARα dans le foie va augmenter l'expression des gènes des enzymes impliquées dans l'oxydation des acides gras (175). La céramide induit une insulino-résistance par des mécanismes multiples. L'activité céramidase des récepteurs à l'adiponectine est un des facteurs expliquant la régulation de l'insulinosensibilité (165). Cette activité céramidase protège également les cellules des ilots pancréatiques de la lipotoxicité (165)

- Dans la cellule endothéliale, l'adiponectine inhibe l'adhésion monocytaire et diminue la transformation des macrophages en cellules spumeuses alors qu'elle exerce un effet pro-angiogénique, anti-apoptotique et stimule la production de monoxyde d'azote NO (176)(177)(178), exercant ainsi un effet vasoprotecteur.
- Les récepteurs à l'adiponectine ont été identifiés sur des cellules immunitaires, en particulier sur les macrophages (179).

5. *AdipoRon*

En 2013, Okada-Iwabu et al. identifiaient pour la première fois une molécule synthétique qui agit comme un agoniste des récepteurs AdipoR (180). Cette molécule, appelée AdipoRon, lie à la fois AdipoR1 et AdipoR2 et induit *in vitro,* dans les cellules musculaires et hépatiques, les mêmes voies de signalisation que l'adiponectine, à savoir la phosphorylation de l'AMPK et l'activation de PPAR-α. Son effet s'exerce de façon concentration-dépendante, entre 5 à 50 µM. *In vivo*, l'AdipoRon améliore la sensibilité à l'insuline dans un modèle murin soumis à

un régime hypercalorique. De façon intéressante, les auteurs montraient également que l'AdipoRon diminuait l'expression des cytokines pro-inflammatoires TNF-α, IL-6 et CCL2 dans le tissu adipeux et réduisait l'expression de marqueurs membranaires associés à un phénotype M1 (comme le CD11c) (180).

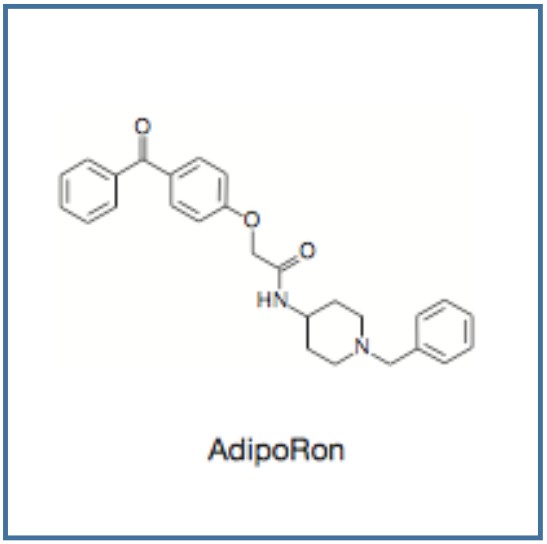


Figure 16. Structure biochimique de l'AdipoRon

Depuis, de nombreux travaux dans des modèles animaux ont souligné l'effet bénéfique de cette molécule synthétique dans la prévention et/ou traitement des complications métaboliques dues à l'excès de poids et des maladies qui y sont associées (181): dysfonction endothéliale, athérosclérose (182), néprhopathie diabétique (183), ischémie myocardique (184), toxicité hépatique (185).

C. Autres adipokines

1. Visfatine

La visfatine est également appelée NAMPT (nicotinamide phosphoribosyltransférase) ou Facteur favorisant la colonie de cellules pré-B (186).

La (NAMPT) est une phosphoribosyltransférase et l'enzyme-clé qui catalyse la formation nicotinamide dinucléotide NAD dans un certain nombre de cellules (187). Une modification post-transcriptionnelle (acétylation de la lysine 53) contrôle sa libération cellulaire et caractérise la forme extracellulaire eNAMPT. Celle-ci a été décrite pour la première fois en

1994 sous l'appellation PBEF (Pre-B enhancer factor) en raison de sa capacité à réguler la différenciation des lymphocytes B (188). Enfin, eNAMPT est également appelée visfatine depuis qu'il a été décrit qu'elle était produite par les adipocytes et possédait une action de régulation du métabolisme à l'instar d'autres adipokines (189). Les taux circulants de visfatine sont augmentés chez les sujets obèses et diabétiques, particulièrement corrélés avec l'adiposité viscérale ; ils diminuent après perte de poids (190) (191) (192).

Les récepteurs et voies de signalisation de la visfatine ne sont pas encore bien décrits. Le récepteur de l'insuline avait été proposé dans un premier temps mais cette publication a été rétractée deux ans plus tard (193). Actuellement, deux récepteurs sont suggérés pour médier les actions de la visfatine ; le Toll-Like récepteur 4 (TLR4) et le récepteur de chimiokine CCR5. Camp et al. ont démontré que eNAMPT se liait à TLR4 alors que Van der Bergh et al. ont trouvé une analogie structurale entre eNAMPT et CCR5 (194) (195).

La visfatine joue un rôle important dans la sécrétion d'insuline par les cellules ß du pancréas ; des souris déficientes en visfatine réduisent la biosynthèse de NAD et la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose dans le pancréas, contribuant à l'apparition d'une intolérance au glucose (196).

Le glucose et les LDL oxydés stimulent l'expression de NAMPT dans les adipocytes humains via la voie PI3-kinase-Akt (197) (198). L'expression de l'ARNm de NAMPT augmente pendant l'adipogenèse et est stimulée par des facteurs induisant une résistance à l'insuline tels que IL-6, la dexaméthasone, le TNF-α (199) (200).

Bien que certains rapports soient contradictoires, la majorité s'accordent plutôt sur les effets pro-inflammatoires de la visfatine, passant notamment par l'induction de la synthase inductible de l'oxyde nitrique (NOSi), l'activation des voies ERK1/2 (201), du facteur nucléaire NF-κB (202) et la stimulation de la production de cytokines inflammatoires (TNF-α, IL-6, IL-1β) (203) ou de chimiokines chemoatrractantes pour les monocytes comme MCP-1 (204). La production de cytokines inflammatoires et l'expression de NAMPT dans les adipocytes semblent donc être régulées par une boucle d'activation positive.

Par ailleurs :

- Le développement de nombreux cancers (cancer colorectal, ovarien, mammaire, gastrique, prostatique, thyroïdien bien différencié, carcinomes endométriaux, myélome, le mélanome et les astrocytomes) est associé à une augmentation de l'expression de NAMPT car elle est essentielle pour la reconstitution du NAD

intracellulaire qui est consommé rapidement par les cellules cancéreuses en division (205) (206).

- Des études de profils génomiques associés au développement d'un syndrome de détresse respiratoire aigue (SDRA) (induit par une infection ou un stress mécanique) ont fait ressortir la visfatine comme un biomarqueur de cette affection pulmonaire grave (207) (208) (209). La visfatine a été dosée à un haut niveau dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire des patients atteints de SDRA. Le rôle de cette cytokine dans la physiopathologie du SDRA n'est pas encore bien élucidé mais il a été montré qu'elle induisait la production de CXCL-8 par les cellules épithéliales et endothéliales pulmonaires, qu'elle augmentait leur perméabilité et qu'elle avait un pouvoir chemoattractant pour les polynucléaires neutrophiles au sein du parenchyme pulmonaire (210) (211).
- Enfin, il a été souligné le rôle de la visfatine dans la régulation du fonctionnement de diverses cellules immunitaires notamment les monocytes/macrophages, en induisant leur recrutement, prolifération, différenciation (212).

2. *Chémérine*

La chémérine est une protéine chémoattractante de 163 acides aminés exprimée dans différents tissus : le tissu adipeux mais également le foie, le rein, le pancréas et les organes génitaux. Elle est secrétée sous la forme d'un précurseur inactif, la prochémérine qui sera activée par clivage de sa partie carboxy-terminale par différentes enzymes (cathepsines, élastases) (213).

La concentration plasmatique de la chémérine est aux alentours de 4 nM chez l'homme (214) (215); elle augmente de façon parallèle à l'indice de masse corporelle et sous l'influence de plusieurs cytokines pro-inflammatoires (216). Ainsi, la concentration circulante de chémérine est associée à l'obésité, au syndrome métabolique qui l'accompagne et à certaines maladies inflammatoires chroniques comme la polyarthrite rhumatoïde (217) (218) (219) (220).

La chémérine peut se fixer sur trois récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G : CMKLR1 (chemokine like receptor 1, également appelé chemR23), GPR1 (G protein-coupled receptor 1) et CCRL2 (C-C chemokine receptor-like 2) (221). La forme

majoritaire sur les cellules immunitaires (monocytes-macrophages principalement) et les adipocytes est le récepteur CMKLR1 (222). L'activation de ce récepteur mobilise le calcium intracellulaire et inhibe l'accumulation d'AMPc (adénosine monophosphate cyclique) via une protéine G inhibitrice (Gi) ; elle induit également d'autres voies de signalisation en activant MAPK (mitogen activated protein kinase), ERK1/2 (extracellular regulated kinase 1/2) et P38, la PKB (protéine kinase B) dans les cellules musculaires lisses et endothéliales (223) (224) . Le récepteur GPR1 est surtout exprimé par des cellules du système nerveux (225) et CCRL2 fortement exprimé dans les cellules endothéliales pulmonaires pourrait réguler la biodisponibilité de la chémérine en la séquestrant (226).

La chémérine et son récepteur CMKLR1 jouent un rôle important dans l'adipogenèse et l'homéostasie métabolique. *In vitro*, l'invalidation du gène codant la chémérine, ou de celui codant son récepteur CMKLR1 dans des préadipocytes ou adipocytes matures réduit l'expression du gène codant le transporteur de glucose GLUT4 ou celui codant la lipase hormono-sensible (222). Chez la souris, une invalidation du gène CMKLR1 entraîne une diminution de l'adiposité et une augmentation de l'intolérance au glucose (227). Chez l'homme ou la souris, le promoteur du gène de la chémérine contient des sites de liaison pour PPARγ qui favorise l'adipogenèse (228). Chez l'homme, l'insuline augmente, *ex vivo*, l'expression de la chémérine dans des explants de tissus adipeux. *In vivo,* une hyperinsulinémie prolongée provoque une augmentation de la concentration de chémérine chez des individus sains (229).

D. Adipokines et poumons

1. Leptine et poumon

La leptine et son récepteur sont présents dans le système respiratoire et semblent jouer un rôle dans les principales affections pulmonaires : maladies bronchiques chroniques ou infections respiratoires.

La leptine et son récepteur ont été identifiés sur des cellules épithéliales bronchiques, des pneumocytes de type II et des macrophages pulmonaires. Leur expression est augmentée chez les sujets fumeurs (230). La leptine est dosable dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire et

dans des crachats induits, sa concentration est proportionnelle à l'IMC et évolue de façon parallèle aux concentrations plasmatiques (231).

Un rôle de la leptine dans la maturation pulmonaire a été suggéré. Elle est en effet exprimée par des pneumocytes II et lipofibroblastes fœtaux chez le rat et le lapin (232) (233). Des souris transgéniques inactivées pour le gène de la leptine présentent un défaut de maturation avec une diminution significative de la surface d'échange alvéolaire (234). L'ajout de leptine en anténatal chez le rat accélère la maturation et augmente la production de protéines du surfactant (235).

Chez des sujets atteints de BPCO, le taux de leptine dans les crachats est corrélé à la sévérité de l'obstruction et à l'infiltration neutrophilique (236). Le marquage de la leptine et de son récepteur est augmenté dans la muqueuse de biopsies bronchiques de sujets BPCO, en corrélation avec l'inflammation et l'obstruction bronchiques (237).

La perfusion de leptine exogène augmente l'hyperréactivité bronchique et le taux d'IgE chez des souris sensibilisées à l'ovalbumine après provocation à l'ovalbumine, sans augmenter le taux d'éosinophiles pulmonaires (238). Elle augmente l'inflammation pulmonaire dans un modèle murin exposé à l'ozone (239). Il existe des études contradictoires sur la corrélation entre les taux circulants et/ou pulmonaires de leptine et le développement d'un asthme. Cependant, une méta-analyse récente confirme que les taux sanguins de leptine sont plus élevés chez les sujets asthmatiques (240) ; cette association serait particulièrement robuste chez les femmes (241). Bruno et al. montraient que l'expression de la leptine et de son récepteur sur des biopsies bronchiques étaient diminuée chez des sujets adultes asthmatiques non contrôlés ; cette expression était inversement corrélée aux marqueurs de remodelage bronchique suggérant que ce dernier exercerait un rétrocontrôle négatif sur l'expression de leptine, notamment par le biais du facteur TGF-ß (242).

Enfin, les souris ob/ob déficientes en leptine présentent une altération de leur survie après l'administration de Klebsiella pneumoniae, Streptococcus pneumoniae et Mycobacterium abscessus, suggérant que la leptine est nécessaire pour une défense anti-bactérienne efficace (121) (120), probablement par stimulation de la phagocytose et recrutement de polynucléaires au site de l'infection pulmonaire (243).

2. Adiponectine et poumon

L'adiponectine et ses récepteurs sont également exprimés au sein du système respiratoire et pourraient jouer un rôle dans des pathologies respiratoires chroniques.

Miller et al. ont montré que l'adiponectine et AdipoR1 étaient exprimés par des cellules épithéliales bronchiques sur des coupes histologiques pulmonaires issues de patients atteints de BPCO mais pas chez des sujets sains (244). L'adiponectine est dosable dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire (245) et les taux sont plus élevés chez les sujets BPCO (6.2±1.8 ng/ml vs 3.3±0.6 ng/ml chez des témoins) (246). L'adiponectine et AdipoR1 sont exprimés par une lignée épithéliale alvéolaire pulmonaire A549, seulement après stimulation par le TNF (244), et par des cellules musculaires lisses bronchiques humaines (247).

Nakanishi et al ont constaté que des souris transgéniques KO pour l'adiponectine présentaient des anomalies pulmonaires qui se rapprochent de celles de la BPCO et un dysfonctionnement endothélial, reversible après l'injection d'adiponectine exogène (248). D'autres travaux ont confirmé que des souris déficientes en adiponectine présentaient un phénotype pulmonaire d'emphysème avec dilatation des espaces aériens (249) ainsi que de l'hypertension pulmonaire associée à une inflammation périvasculaire (250). Par contre, dans un autre modèle de souris exposées au long cours à la fumée de cigarette, la déficience en adiponectine serait plutôt protectrice car associée à un moindre degré d'inflammation pulmonaire et à moins de dégâts parenchymateux, en particulier pour ce qui concerne l'élargissement des espaces alvéolaires, caractéristique de l'emphysème (251).

L'obésité est associée au risque de développer un asthme et/ou un mauvais contrôle de l'asthme. Dans des études de population, des taux faibles d'adiponectine sériques seraient associés à un risque plus important de développer de l'asthme, du moins parmi les femmes (252). L'administration d'adiponectine recombinante dans un modèle de souris sensibilisées et exposées à l'ovalbumine par provocation bronchique, réduit significativement l'inflammation pulmonaire et l'hyperréactivité bronchique (253). Enfin, des taux sériques élevés d'adiponectine sont associés à la mortalité chez des sujets admis pour détresse respiratoire aigüe (254).

L'effet de l'adiponectine au niveau pulmonaire pourrait dépendre de l'isoforme et donc des capacités de production in situ de cette frome d'adiponectine et/ou de la diffusion à partir du sang jusqu'au parenchyme pulmonaire des formes de plus ou moins haut poids moléculaire. Chez la souris, la forme de haut poids moléculaire prédomine dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire et la T-cadhérine semble importante pour le transport de cette forme d'APN de la circulation vers le parenchyme pulmonaire (255). Chez l'homme, les concentrations d'adiponectine dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire ne sont pas corrélées à celles dans le sang (256). Cela pourrait s'expliquer également par des proportions

différentes de chaque isoforme entre la circulation sanguine et le poumon, même si cette hypothèse n'a pas été encore démontrée.

V. Macrophages et polarisation

A. Définition et origine

Les macrophages ont été décrits pour la première fois à la fin du XIX è siècle par le biologiste russe Metchnikoff comme des cellules mobiles capables de phagocyter des bactéries et de jouer un rôle important dans l'homéostasie tissulaire (257). Les macrophages sont présents dans tous les tissus de l'organisme. Ils sont essentiels pour la régulation immunitaire locale, jouent un rôle important dans le métabolisme et les phénomènes de réparation tissulaire. Leur morphologie et leur fonction varient en fonction du tissu dans lequel ils se trouvent, sous l'influence de nombreux facteurs de leur micro-environnement (258)

On a initialement décrit ces cellules comme l'étape finale de différenciation de progéniteurs sanguins issus de la moelle osseuse. En effet, un progéniteur commun aux cellules myéloides et lymphoides CFU-ML (Coloning Forming Unit of Myeloid and Lymphoid cells) formé dans la moelle osseuse va se différencier sous l'influence de facteurs de croissance (GM-CSF, M-CSF) et donner naissance à des monocytes capables de passer dans la circulation sanguine. Ces monocytes peuvent circuler dans le sang pendant 1 à 3 jours avant de mourir ou d'être recrutés dans un tissu sous l'influence de molécules chemoattractanctes. Cette migration vers le tissu se fait par diapédèse : reconnaissance de molécules d'adhésion et passage trans-endothélial. Elle s'accompagne de modifications morphologiques et fonctionnelles importantes, comme par exemple le switch d'expression de récepteurs membranaires avec la perte de CCR2 (CC chemokine Receptor type 2) et l'augmentation de CCR1 et CCR5 (259). Le monocyte se différencie alors définitivement en macrophage ou cellule dendritique myéloïde.

Cependant, des travaux plus récents ont prouvé que la moelle osseuse n'était pas la seule source de macrophages tissulaires mais qu'il existait un contingent de progéniteurs au sein de chaque tissu. Le programme international d'identification du génome *The International Genome Project* a mis en évidence une très grande diversité transcriptionnelle entre les différentes populations tissulaires de macrophages (260), préjugeant d'un long processus de spécialisation et probablement de progéniteurs déjà distincts. Il est reconnu qu'un certain

nombre de macrophages tissulaires ne dérivent pas de cellules souches hématopoïétiques mais de progéniteurs embryonnaires, déterminés avant la naissance et qui se maintiennent au cours de la vie (261) (262). Ces macrophages dits « résidents » seraient en effet capables de s'auto-renouveler par prolifération sans perte de fonction, ce qui les rend indépendants des progéniteurs hématopoïétiques (263) (264). Ils se spécialisent en fonction du tissu dans lequel ils se trouvent (265).

B. Fonctions des macrophages

Les macrophages jouent un rôle primordial à la fois dans la défense antimicrobienne et l'homéostasie tissulaire. La double nature des macrophages (protection de l'hôte et lutte contre les lésions tissulaires) est maintenue par de fins systèmes de régulation. La phagocytose, la clairance et la sécrétion de médiateurs par les macrophages contribuent aux défenses innées et adaptatives contre l'infection et soutiennent le processus d'inflammation ; les mêmes processus, mais avec des signaux sécrétés distincts, rétablissent l'homéostasie et favorisent la réparation tissulaire.

Les macrophages représentent l'un des éléments clés de l'immunité innée. Ils reconnaissent, phagocytent et détruisent les pathogènes qu'ils rencontrent (virus, bactéries, parasites, champignons). Cette reconnaissance se fait par l'interaction entre des motifs moléculaires associés aux pathogènes, les PAMPs (Pathogen Associated Molecular Pattern) et des récepteurs spécifiques les PRR (Pathogen Recognition Receptor) (266). Parmi ces PRR, certains sont associés à la membrane: on trouve les récepteurs Toll-Like (TLR), les récepteurs scavenger, les récepteurs au complément et les récepteurs de type lectine (266). Ils fonctionnent comme des récepteurs de surface (TLR1-2-4-5-6) ou au sein d'un endosome (TLR 3-7-9). D'autres sont situés dans le cytosol, les NLR (NOD (nucleotide-binding oligomerization domain)-like receptors), capables de reconnaître certains pathogènes à croissance intracellulaire, des particules virales ou encore des PAMPs internalisées dans des phagolysosomes (267). Ils vont induire la signalisation du NF-kB via le recrutement de la proteine RICK (receptor-interacting serine/threonine kinase) ou encore rendre fonctionnelle la structure multiprotéique inflammasome pour activer la caspase 1 (268).

Les PRR sont aussi capables de reconnaître des ligands endogènes, ce qui explique le rôle du macrophage dans la clairance de débris cellulaires et de cellules apoptotiques après un dommage tissulaire (269). L'activation des PRR va entrainer une cascade de réactions cellulaires au sein de la cellule : activation du cytosquelette, modification morphologique pour permettre l'internalisation des pathogènes/débris dans les vacuoles phagocytaires, sécrétion de médiateurs de l'inflammation (cytokines, chimiokines, espèces réactives de l'oxygène et de l'azote et métabolites lipidiques) (270).

Les macrophages sont des cellules présentatrices d'antigènes et sont donc également impliqués dans la réaction immunitaire adaptative via leurs interactions avec les lymphocytes T et B (271) (272).

Enfin, les macrophages sont les garants de l'homéostasie et de l'intégrité des tissus. Au sein d'un organe, ils interagissent avec les cellules non hématopoïétiques, permettent la résolution de l'inflammation pour limiter les dommages tissulaires et favorisent réparation et remodelage tissulaire (270).
Cette dualité dans la fonction du macrophage entre rôle microbicide et immunorégulation est particulièrement bien illustrée en pathogénie dans le cas d'une maladie appelée Granulomatose Septique Chronique (CGD, chronic granulomatous disease). Il s'agit d'une maladie génétique touchant l'enzyme NADPH oxydase et responsable d'une dysfonction de l'ensemble des cellules granulocytaires. L'enzyme NADPH oxydase étant déficiente, la production de dérivés actifs de l'oxygène (ROS *reactive oxygen species*) est considérablement réduite. Ces radicaux libres de l'oxygène sont essentiels dans la réponse anti-infectieuse et immunomodulatrice des cellules phagocytaires. Ils permettent tout d'abord la destruction des pathogènes, soit par action directe microbicide, soit de façon indirecte par leur rôle de messager intracellulaire (273)**.** Par ailleurs, les ROS jouent également un rôle immunomodulateur, organisant la résolution de l'inflammation générée par l'agression infectieuse, par la stimulation par exemple de Nrf2 (274)**,** facteur de transcription inhibiteur de l'inflammasomme ou l'activation du facteur de transcription PPAR-γ impliqué dans la reconnaissance et la digestion des cellules apoptotiques (275). Les patients atteints de CGD présentent à la fois des infections sévères et répétées (liées à des bactéries et champignons principalement) mais également des manifestations inflammatoires chroniques en lien avec une activation non contrôlée des médiateurs inflammatoires.

Les macrophages présentent donc plusieurs facettes et leur phénotype peut encore varier à un autre niveau en fonction du tissu dans lequel ils résident. Ils peuvent en effet acquérir une spécialité fonctionnelle et sont souvent décrits en sous-populations en fonction de leur localisation anatomique (Figure 17).

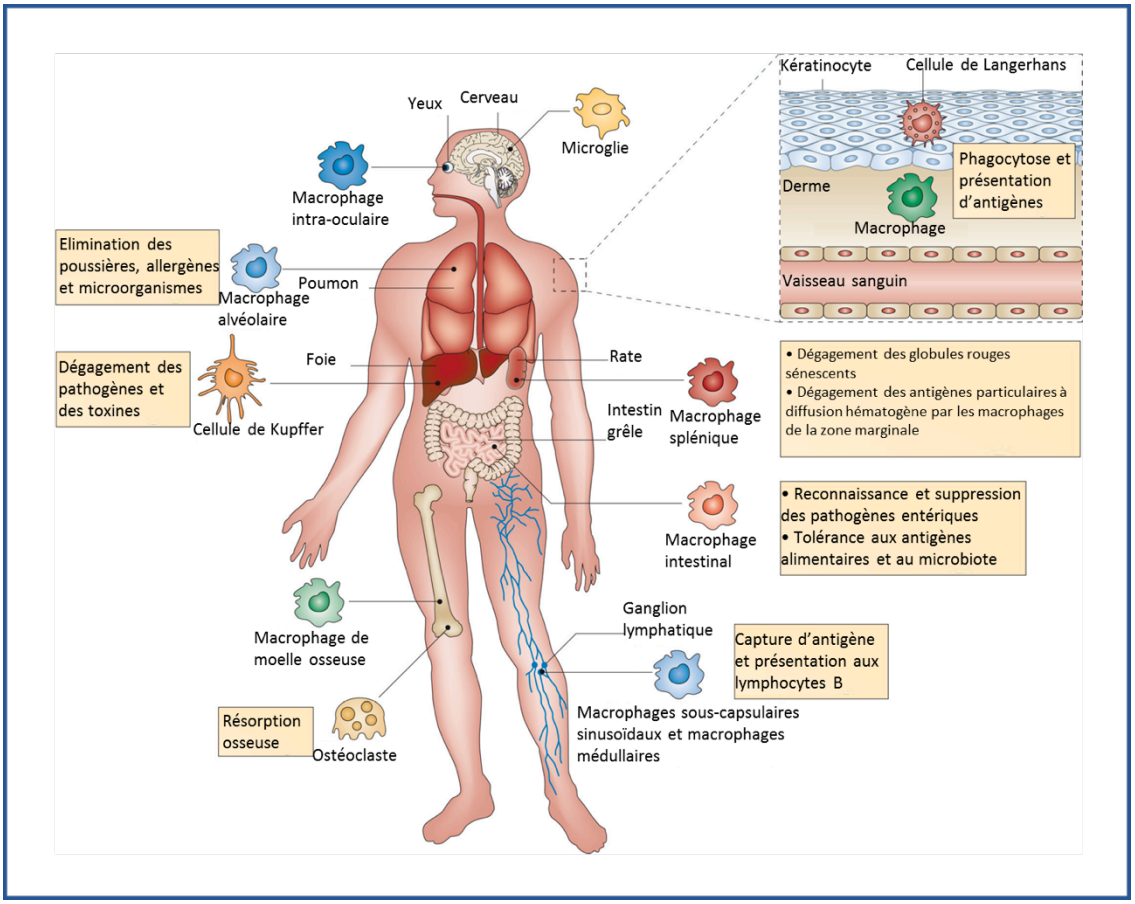


Figure 17. Propriétés des sous-populations de macrophages en fonction de leur localisation anatomique. D'après Murray et al., nature reviews immunology, 2011.

C. Les macrophages pulmonaires

Les macrophages pulmonaires ont pour particularité d'être en contact direct avec le milieu extérieur et jouent à ce titre un rôle clé dans la défense contre les agressions extérieures.

1. Origine

On distingue trois sous-populations, en fonction de leur localisation au sein du tissu pulmonaire : 1) Les macrophages alvéolaires sont présents à la surface des alvéoles pulmonaires et sont directement exposés aux particules inhalées. 2) Les macrophages

tissulaires résidents, situés dans l'espace entre l'épithélium alvéolaire et l'endothélium vasculaire. 3) Les macrophages intravasculaires présents au niveau de l'endothélium des capillaires sanguins.

A nouveau, deux théories ont été proposées sur l'origine des macrophages pulmonaires, deux mécanismes différents mais probablement complémentaires. La première suggère que les macrophages pulmonaires dérivent d'un précurseur médullaire, les monocytes sanguins étant chémoattractés vers le tissu pulmonaire. 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 (276). La deuxième théorie suppose que les macrophages pulmonaires dérivent d'un précurseur embryonnaire et que le pool de macrophages préformés avant la naissance est capable de s'auto-renouveler. Cette théorie s'est développée à partir des années 1980, lorsque l'on a amélioré les techniques permettant d'isoler et de caractériser les macrophages à partir de différentes parties du tissu. On a alors identifié clairement des sous-populations qui diffèrent par leurs marqueurs membranaires, leur production de cytokines, leurs fonctions biologiques, leur capacité de renouvellement (277) (278) (279). Dès 1986, une réplication *in situ* des macrophages pulmonaires est observée dans un modèle d'inflammation au carbone chez des souris déplétées en monocytes (280). En 2016, Tan et Krasnow ont étudié le développement des macrophages pulmonaires dans un modèle murin (281). Ils ont utilisé des souris transgéniques Runx1CreER exprimant la recombinase Cre inductible au tamoxifène sous contrôle du promoteur Runx1 qui est exprimé dans les cellules hématopoïétiques primitives situées exclusivement dans le sac embryonnaire. Ils ont prouvé qu'un sous-ensemble de pré-macrophages dérivés du sac vitellin ensemence le poumon tôt dans le stade embryonnaire et persistent sous la forme de macrophages interstitiels « primitifs » dans le sous-mésothélium et en péri-vasculaire chez les adultes. En outre, ils ont identifié une vague supplémentaire après la naissance qui donnent lieu à des macrophages interstitiels «définitifs» localisés de façon plus diffuse dans le parenchyme pulmonaire et censés provenir de la moelle osseuse (281). Les macrophages alvéolaires, identifiés par un marqueur membranaire distinct, prennent leur source également pendant le stade embryonnaire mais à partir d'un autre précurseur issu probablement du foie fœtal (282).

Les macrophages alvéolaires, comme la plupart des tissus d'origine embryonnaire peuvent s'auto-renouveler tout au long la vie avec une contribution minimale des monocytes circulants (282) (283). Dans le cas des macrophages interstitiels, des études de parabiose ont suggéré

qu'ils sont, au moins en partie, renouvelés par des monocytes sanguins chez les adultes. Tan et Krasnow ont utilisé pendant 4 mois des souris de type sauvage en parabiose avec des souris exprimant de façon ubiquitaire la protéine fluorescente GFP. Dans les poumons des souris WT, 17% des macrophages interstitiels étaient marqués GFP+, démontrant que des précurseurs circulants peuvent maintenir le pool de macrophages chez l'adulte, même si cela ne représente qu'une fraction des macrophages interstitiels (281). Ce phénomène parait d'autant plus important en situation de stress local.

Au final, on admet actuellement qu'il existe plusieurs sous-populations de macrophages au sein du tissu pulmonaire (alvéolaires/interstitiels), que les macrophages dérivent principalement de précurseurs embryonnaires, qu'ils possèdent une capacité d'auto-renouvèlement mais que les monocytes dérivés de la moelle osseuse peuvent renouveler une partie du pool des macrophages interstitiels (284).

2. Fonction

Le système respiratoire est la plus grande surface d'échange du corps humain avec le monde extérieur. De par leur localisation, les macrophages pulmonaires sont constamment exposés aux agents exogènes (agent microbien, particule allergénique ou issue de la pollution atmosphérique,…). Ils participent intensivement aux défenses antimicrobiennes par leurs activités 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. Les macrophages pulmonaires interagissent avec leur environnement *via* l'expression de nombreux récepteurs membranaires, y compris les PPR, les récepteurs aux cytokines, les récepteurs aux fragments constants des immunoglobulines et au complément pour les particules opsonisées (285).

Par contre, il existe une hétérogénéité fonctionnelle entre les macrophages alvéolaires et interstitiels. En tant que première ligne de défense, les macrophages alvéolaires ont une activité microbicide, enzymatique, phagocytaire et métabolique qui apparait nettement plus intense que les macrophages interstitiels (278). A l'inverse, les macrophages interstitiels présenteraient un profil plus immunotolérant, par notamment leur capacité de production d'IL-10 (286) (287) et un rôle de cellule présentatrice d'antigène plus important (288).

Dans tous les cas, ces cellules ont une grande plasticité et sont en constante interaction avec leur microenvironnement, ce qui détermine leur état d'activation ou polarisation.

D. La polarisation des macrophages

1. Concept de la polarisation

Le terme « polarisation » a été introduit en 1986 par Mosmann *et al* pour décrire deux sous-populations de lymphocytes *helper* murins, Th1 et Th2 en fonction du stimulus rencontré lors de leur activation (289). Cette distinction se base sur un profil différent de sécrétion de cytokines que sont principalement : l'Interféron-γ (IFN-γ) et pour le profil Th1 et l'Interleukine-4 (IL-4) pour le profil Th2. L'existence de ces profils a été confirmée chez l'homme au début des années 1990 (290). La réponse immunitaire de ces deux profils est fondamentalement opposée, la polarisation Th1 menant à une « réponse à médiation cellulaire» avec activation des lymphocytes T cytotoxiques et des macrophages, alors que la polarisation Th2 est associée à une « réponse à médiation humorale » impliquant l'activation des lymphocytes B et la production d'anticorps (291). La première est importante pour la destruction de pathogènes intracellulaires et l'autoimmunité spécifique d'organe alors que la seconde est plus impliquée dans la réponse aux infections par helminthes et les réactions allergiques par la production d'IgE et de cytokines de type Th2 (IL-4, IL-5,…) (292).

Quelques années plus tard, cette dichotomie Th1/Th2 s'est vue appliquée aux macrophages. En 1992, Stein et al. montre pour la première fois que l'IL-4 active les macrophages de souris d'une façon différente de l'IFN-γ, en induisant l'expression des récepteurs au mannose de type 1 (MRC1 ou CD206) et en diminuant la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire TNF-α (293).

En 2000, Mills et al. montraient que des macrophages murins stimulés par l'IFN-γ et ceux stimulés par IL-4 ne se comportaient pas de la même façon, notamment en ce qui concerne leur production de NO ou ornithine. Par contre, elle influençait ensuite différemment la réponse inflammatoire des lymphocytes Th via une augmentation respective de la production d'IFN-γ ou de TGF-β (294). Induisant des réponses lymphocytaires opposées Th1/Th2, cette différence entre sous-populations de macrophages a été nommée de la même façon : « polarisation M1/M2 » (294).

Plusieurs équipes se sont attachées à décrire et caractériser ces états de polarisation des macrophages, qui diffèrent en fonction des stimuli d'activation, de leur production de cytokines-chemokines, de l'expression de facteurs de transcription ou de marqueurs membranaires, de leur métabolisme d'acides aminées (295) (296) (297). Les macrophages M1 sont dits « pro-inflammatoires » alors que les macrophages M2 sont qualifiés

« d'immunorégulateurs ». Chacun de ces deux groupes peut être subdivisé en plusieurs catégories en fonction des acteurs ayant favorisé leur état de polarisation et des voies de signalisation induites (298) (299).

Cependant, même si la dichotomie M1/M2 est utile pour décrire les modifications immunologiques en pathologie, il est important de souligner que ces états d'activation sont réversibles. Le terme de polarisation devrait plutôt décrire un continuum d'états d'activation qui varie en fonction des modifications du microenvironnement dans lequel se trouve le macrophage.

2. Agents inducteurs d'une polarisation M1/M2 des macrophages

Agents polarisants M1

- Le lipopolysaccharide (LPS)

Le phénotype M1 peut être induit par l'activation des récepteurs TLRs. Le lipopolysaccharide (LPS), composant de la paroi des bactéries à Gram négatif et agoniste du TLR4, est considéré comme un des principaux inducteurs de la polarisation de type M1 (296) (300) (301). 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 Differenciation primary response gene 88*) dépendante. La stimulation de cette voie conduit à l'activation du facteur de transcription nucléaire NF-κB (*Nuclear Factor kappaB*) et du facteur de transcription AP-1 (*Activator Protein-1*) permettant l'expression de nombreux gènes pro-inflammatoires (302). L'activation du facteur de transcription NF-κB 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 (303). Une autre voie de signalisation est dite « MyD88-indépendante », interagit avec le domaine TRIF (*TIR domain-containing adapter-inducing Interferon-β*) pour aboutir à l'activation des IRF (*Interferon Regulator Factor*) et induire l'expression puis la sécrétion d'IFN-β. 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 (304). L'IFN-β, interféron de classe I, va agir de façon autocrine sur le macrophage en se fixant sur son récepteur composé des deux sous-unités, IFN-R1 et IFN-R2, et présent à la surface des macrophages dérivés de monocytes

humains. Il en résulte une activation des kinases Jak1 et Tyk2 (Tyrosine Kinase 2) et la phosphorylation des facteurs de transcription STAT1 et STAT2. Ces facteurs de transcription s'associent à l'IRF9 pour former un complexe qui régule de nombreux gènes (Figure 18).

- Interféron-γ (IFN-γ)

L'IFN-γ est un IFN de classe II produit essentiellement par les lymphocytes Th1, lymphocytes cytotoxiques ainsi que les cellules *Natural Killer* mais peut être également produit par des macrophages dans certains cas d'infection, comme l'infection respiratoire à mycobacterie (305). En réponse à l'IFN-γ, les macrophages vont produire de l'IL-12 qui va recruter et activer des lymphocytes Th1, à l'origine d'une boucle d'autoactivation (306).

L'IFN-γ se fixe sur son récepteur IFN-γR, composé de deux chaînes IFN-γR1 et IFN-γR2 associées aux Janus-Kinases 1 (Jak1) et Jak2. Il en résulte la phosphorylation et l'homodimérisation de STAT1 qui va induire la transcription de divers gènes impliqués dans les fonctions pro-inflammatoires des macrophages (307). Le facteur de transcription STAT1 induit également l'expression du facteur SOCS3 qui va limiter la polarisation M2 (Figure 18).

Il peut exister une synergie entre les différents agents inducteurs du phénotype M1 (308). L'IFN-γ sensibilise les macrophages à un second signal par du LPS. Ce « priming » peut passer par une augmentation de l'expression des TLR4 (308), une augmentation de production de l'IFN-β ou de son récepteur IFN-βR (309). A l'inverse, le LPS sensibilise la réponse à l'IFN-γ par le croisement de voies de signalisation communes entre les signaux IFN de classe I (IFN-β) et II (IFN-γ), notamment la phosphorylation de STAT1 (309). On considère donc que la stimulation concomittante par LPS et IFN-γ induit un-sous type spécifique de polarisation M1.

Agents polarisants M2

- Les interleukines Th2 (IL-4 et IL-13)

L'IL-4 et IL-13 sont des cytokines produites par des lymphocytes Th2 au cours de la réponse immunitaire de type allergique ou parasitaire. Elles ont également un rôle majeur dans l'induction de la polarisation M2 des macrophages.

Elles interagissent avec deux types de récepteurs hétérodimériques. Le récepteur de type I formé de deux sous-unités transmembranaires: IL-4Rα et IL-4Rγ et le récepteur de type II formé des sous-unités IL-4Rα et IL-13Rα1 (310). Les récepteurs de type I sont majoritairement exprimés par les cellules hématopoïétiques. 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-13Rα2 (forme soluble qui lie l'IL-13 avec une forte affinité et le séquestre). Dans les macrophages dérivés de monocytes humains, tout comme dans les macrophages pulmonaires humains, les chaines constitutives des deux types de sont exprimées (données UPRES EA 220). L'activation du récepteur de type I entraîne l'activation des kinases JAK1/2/3 et la phosphorylation des facteurs de transcription STAT6/STAT3 et IRS-2, tandis que la signalisation via le récepteur de type II active principalement STAT6. La signalisation IL-4 active également PI3-K et AKT (311). IL-4 est le principal agent induisant au sein du macrophage l'expression des gènes de la polarisation M2, appelée autrefois « polarisation alternative » (312). Parmi ceux-ci, la protéine SOCS1 est impliquée dans la régulation négative de la polarisation M1 (313) (Figure 18).

Enfin, les voies de signalisation de l'IL-4 et l'IL-13 interagissent également, par le biais du facteur STAT6, avec les récepteurs nucléaires de la famille des PPAR qui régulent la transcription d'une grande partie des gènes impliqués dans la polarisation M2 (314) (315).

- Autres agents polarisants M2

D'autres agents polarisants ont été décrits comme pouvant induire un état d'activation qu'on appelait « macrophages régulateurs M2b et M2c ». Cette appellation pouvait induire des erreurs dans l'interprétation de leurs fonctions. On préfère maintenant les catégoriser plus simplement en fonction de l'agent polarisant en jeu (299) :

- **M(IL10)** induit par la cytokine IL-10 : L'expression du récepteur à l'IL-10 (IL-10R) a été mise en évidence sur les macrophages alvéolaires chez l'Homme (316). Ce récepteur est couplé à la kinase Jak1 qui phosphoryle et active le facteur de transcription STAT3 qui va inhiber NF-κB et l'expression de cytokines pro-inflammatoires (317). L'IL-10 induit également l'expression du microARN-146b responsable de l'inhibition de la voie de signalisation du TLR4 (318).
- **M(Ic)** induit par des complexes immuns : des complexes antigène-immunoglobuline G (IgG) interagissent avec les récepteurs au fragment constant (Fc) des IgG (FcγR), exprimés à la membrane des macrophages. Ils peuvent agir en tant que co-signal, en association avec Il-1β ou LPS (297)

- **M(TGF-β)** induit par le TGF-β : le TGF-β libéré au cours des processus de réparation tissulaire. Le TGF-β interagit avec son récepteur hétérodimère formé des sous-unités TGF-βR1 et TGF-βR2. La signalisation intracellulaire passe par les facteurs de transcription Smad ou par l'activation des MAPkinases ou PI3K kinases, qui vont réguler négativement le NF-kB (319)

Enfin d'autres molécules peuvent encore agir comme des inducteurs accessoires de polarisation M2, à l'instar des prostaglandines ou des glucocorticoides.

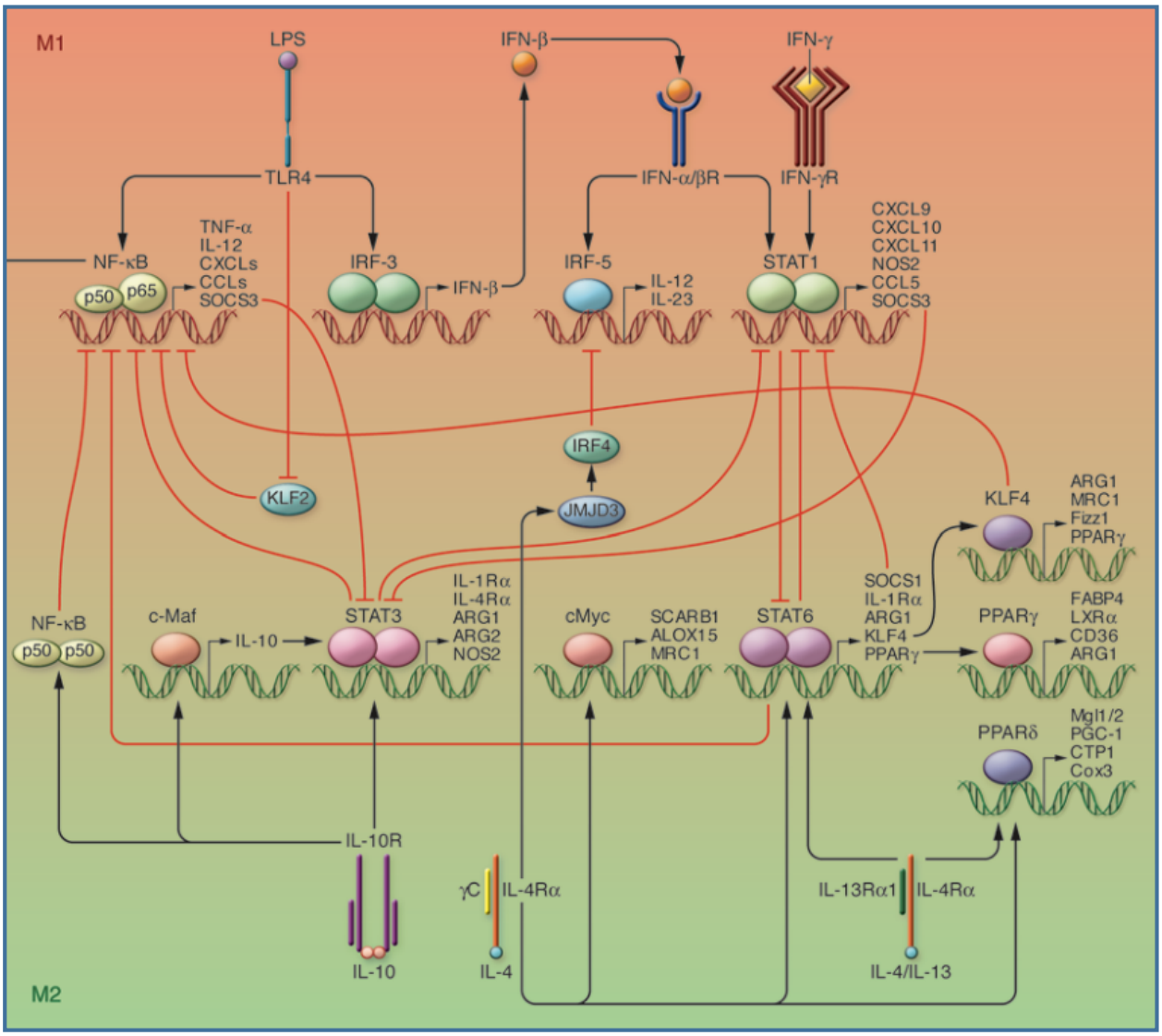


Figure 18. Voies de signalisation des principaux agents polarisants M1/M2 des macrophages. Daprès Sica et al. journal of clinical investigation 2012 ***(314)***

L'équilibre entre l'activation de STAT1 et STAT3 / STAT6 régule finement la polarisation et l'activité des macrophages. Une prédominance de l'activation de NF-κB et de STAT1 favorise la polarisation M1 des macrophages, entraînant des fonctions cytotoxiques et inflammatoires.

En revanche, une prédominance de l'activation de STAT3 et de STAT6 entraîne une polarisation M2 des macrophages, associée plus classiquement à l'immunotolérance, la réparation tissulaire et à la progression tumorale.

3. Marqueurs de polarisation M1/M2 des macrophages

En réponse aux agents inducteurs de la polarisation définis précédemment, les macrophages vont modifier leur fonctionnement. Ceci se retrouve dans le type de marqueurs de surface qu'ils expriment, dans leur profil de production des médiateurs de l'inflammation (cytokines, chimiokines, agents microbicides, métabolites lipidiques) ainsi que dans leurs activités enzymatiques et phagocytaires.

De nombreuses études se sont intéressées à l'identification des marqueurs de la polarisation des macrophages dans différents modèles : macrophages murins, monocytes circulants et de macrophages dérivés de monocytes humains, macrophages tissulaires (294) (320) (296) (321) (322). Même s'il existe des constantes, certains résultats peuvent être variables en fonction du modèle et des techniques d'étude. Il existe par exemple des divergences claires inter-espèces entre les macrophages murins et les macrophages dérivés de monocytes humains (313). Les macrophages tissulaires et ceux dérivés de monocytes circulants présentent des caractéristiques différentes (323). Notre équipe au sein de l'UPRES EA220 a récemment montré par exemple que les macrophages pulmonaires humains différaient des macrophages dérivés de monocytes sanguins en ce qui concerne l'effet des agonistes β2-adrénergiques et l'expression de leurs récepteurs (324). Gundra et al. ont montré (chez la souris) que des macrophages dérivés de monocytes et des macrophages tissulaires différaient en terme de marqueurs de polarisation M2 après une même stimulation par de l'IL-4 (325)

Chez l'homme, il existe également une grande hétérogénéité phénotypique entre macrophages résidents de différents organes (270). Enfin, le modèle expérimental utilisé peut également influencer le phénotype macrophagique observé.

L'ensemble de ces considérations peut expliquer les différences dans les marqueurs de polarisation publiés dans différentes études. Au sein du laboratoire UPRES EA 220, nous avons mené une étude afin de caractériser les marqueurs associés à la polarisation des macrophages pulmonaires humains. Les macrophages étaient issus d'explants de parenchyme de sujets opérés pour un cancer pulmonaire et ils étaient cultivés pendant 24h avant d'être traités soit par du LPS (induisant le phénotype M1), soit par de l'IL-4 ou IL-13 (induisant le

phénotype M2). Après 24h de stimulation, il a été réalisé à la fois une analyse transcriptomique (screening par puce microarray et RT-qPCR) et protéomique (se concentrant sur le relargage de cytokines-chimiokines). Cette étude non publiée révèle des différences majeures entre les macrophages exposés au LPS et à l'IL-4.

Le tableau ci-dessous résume les principaux marqueurs associés aux différents états d'activation des macrophages chez l'homme (macrophages dérivés de monocytes et macrophages tissulaires) publiés dans la littérature. Ces marqueurs appartiennent à différentes catégories de molécules : marqueurs membranaires, cytokines, chimiokines, En rouge sont indiqués les marqueurs identifiés dans notre laboratoire sur les macrophages pulmonaires humains.

	M(IL4)	M(Ic)	M(IL-10)	M(TGFb)	M(LPS)	M(LPS+IFNy)	M(IFNy)
Facteurs de transcription	STAT6 IRF4 SOCS1		STAT3	SMAD2	STAT1 IRF5 SOCS3	STAT1 IRF5	STAT1 IRF5
Cytokines		IL-10 IL-6	IL-10		TNFa IL-6 IL-1β IL23	TNF IL-6 IL-12	
Chimiokines	CCL13,17,18 CCL22,23,24,26	CCL1	CCL16,18 CXCL13		CCL2,3,4,5,8,15,19,20,24 CXCL1,2,3,5,8,9,10, 11,13,16		
Récepteurs membranaires	récepteur au mannose CD206 MRC1 CD36 CD200R		MRC1 CD16, 32, 163	CD16, 32, 163	CD38 CD197 Marco CD16, 32, 64	CD80 Marco CD16, 32, 64	CD80
Médiateurs lipidiques	HPGDS 15LOX1			ALOX5	COX2 PGE2 15LOX2		
Autres	TGFb		TGFb		IDO1 NADPHox	IDO1	IDO1

Tableau 2. Principaux marqueurs de polarisation M1/M2.

Tableau résumant les publications sur les macrophages humains + travaux de l'équipe UPRES EA 220 sur des macrophages pulmonaires humains.

- *Facteurs de transcription*

Chaque état de polarisation s'accompagne d'une augmentation de l'expression des facteurs de transcription impliqués dans la signalisation du stimulus en jeu et de facteurs de transcription qui vont limiter la polarisation alterne. Par exemple, la signalisation du LPS via le TLR4 et la production d'IFN-β va induire la transcription de STAT1 et IRF5 qui contrôlent la

transcription de cytokines pro-inflammatoires mais également de SOCS3 qui inhibe la voie de polarisation M2

- *Chimiokines*

La polarisation M1 des macrophages dérivés de monocytes humains par le LPS et/ou l'IFN-γ 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 (296) (320). Ces chimiokines sont impliquées dans le recrutement des lymphocytes Th1, lymphocytes cytotoxiques, *Natural Killer*, neutrophiles et monocytes.

La polarisation M2 des macrophages dérivés de monocytes humains par l'IL-4 et l'IL-13 induit un profil plus restreint de sécrétion de chimiokines spécifique de type CC que sont CCL13, 17, 18, 22, 23, 24 et 26 (303) (326) (313). Ces chimiokines sont impliquées dans le recrutement des lymphocytes Th2, lymphocytes T régulateurs (Treg), éosinophiles et basophiles.

Les monocytes M2b stimulés par le LPS et IgG secrètent CCL1 qui recrute des lymphocytes Treg, des cellules dendritiques immatures et des monocytes (327). La stimulation des monocytes par l'IL-10, le TGF-β et par les glucocorticoïdes induit l'expression des chimiokines CCL16, CCL18 et CXCL13 (296) (326) qui oriente la réponse immunitaire adaptative en recrutant les lymphocytes B.

- *Cytokines*

L'activation du TLR4 par le LPS induit la sécrétion de nombreuses cytokines pro-inflammatoires telles que TNF-α, IL-1β, l'IL-6 et l'IL-23 qui participent à l'activité microbicide des macrophages (326) (297).

La stimulation des macrophages dérivés de monocytes humains par de l'IFNγ entraine une production d'IL-12 (328). Cette production d'IL-12 participe à l'entretien de la polarisation M1 *via* l'activation des lymphocytes Th1 producteurs d'IFNγ. C'est une cytokine essentielle dans l'immunité spécifique contre les mycobactéries.

A l'inverse, lors d'une polarisation M2, la production de ces cytokines pro-inflammatoires est réprimée (296) (297). L'expression du TGF-β est augmentée dans les macrophages dérivés de monocytes humains stimulés par de l'IL-4 et IL-13 (328) ; il va contribuer à la régénération tissulaire en induisant la différentiation des fibroblastes en myofibroblastes et la production de collagène (329).

Les macrophages co-stimulés par le LPS et les complexes immuns produisent à la fois des cytokines pro-inflammatoires (TNF-α, l'IL-1 et l'IL-6) et des taux élevés d'IL-10, cytokine anti-inflammatoire (330). Il faut toutefois noter que dans les expériences réalisées à l'UPRES EA 220, et contrairement aux résultats sur MDM, les macrophages pulmonaires humains ne produisent pas d'IL-10.

La stimulation par IL-10, TGF-β et les glucocorticoïdes est également responsable de l'inhibition de l'expression des cytokines pro-inflammatoires (TNF-α, IL-1, IL-6, IL-12) (331).

- *Récepteurs membranaires*

Les macrophages polarisés de type M1 par le LPS et/ou l'IFN-γ expriment les récepteurs TLRs comme le TLR4 et son co-récepteur le CD14 ainsi que des récepteurs impliqués dans la l'opsonisation des pathogènes : les récepteurs au fragment constant des immunoglobulines FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) et FcγRIII (CD16) et le récepteur *scavenger* de type A, MARCO *(Macrophage Receptor with Collagenous Structure)* (332). La stimulation de MDM humains par de IFNγ induit spécifiquement l'expression du CD80, molécule de co-stimulation impliquée dans la présentation antigénique (333).

L'IL-4, l'IL-13 et l'IL-10 induisent fortement l'expression de MRC1, impliqué dans la reconnaissance et la phagocytose de certains pathogènes (293). L'IL-4 entraîne également l'expression des récepteurs de type lectines, comme la Dectin-1, impliqués dans la reconnaissance de pathogènes, l'expression du récepteur *scavenger* de type B, le CD36 qui participe à la reconnaissance et l'internalisation des lipoprotéines de faible densité (*Low Density Lipoprotein,* LDL) (334) et le récepteur CD200R qui induit une signalisation anti-inflammatoire (333) (335).

- *Production de médiateurs lipidiques*

Lors d'un phénomène inflammatoire, le catabolisme de l'acide arachidonique comprend plusieurs étapes d'oxydation menant à la formation d'eicosanoïdes selon deux voies différentes : celle des cyclooxygénases et celle des lipoxygénases (Figure 19). La sécrétion de ces médiateurs et l'expression des enzymes impliquées dans leur production sont significativement modifiées au cours des processus de polarisation des macrophages.

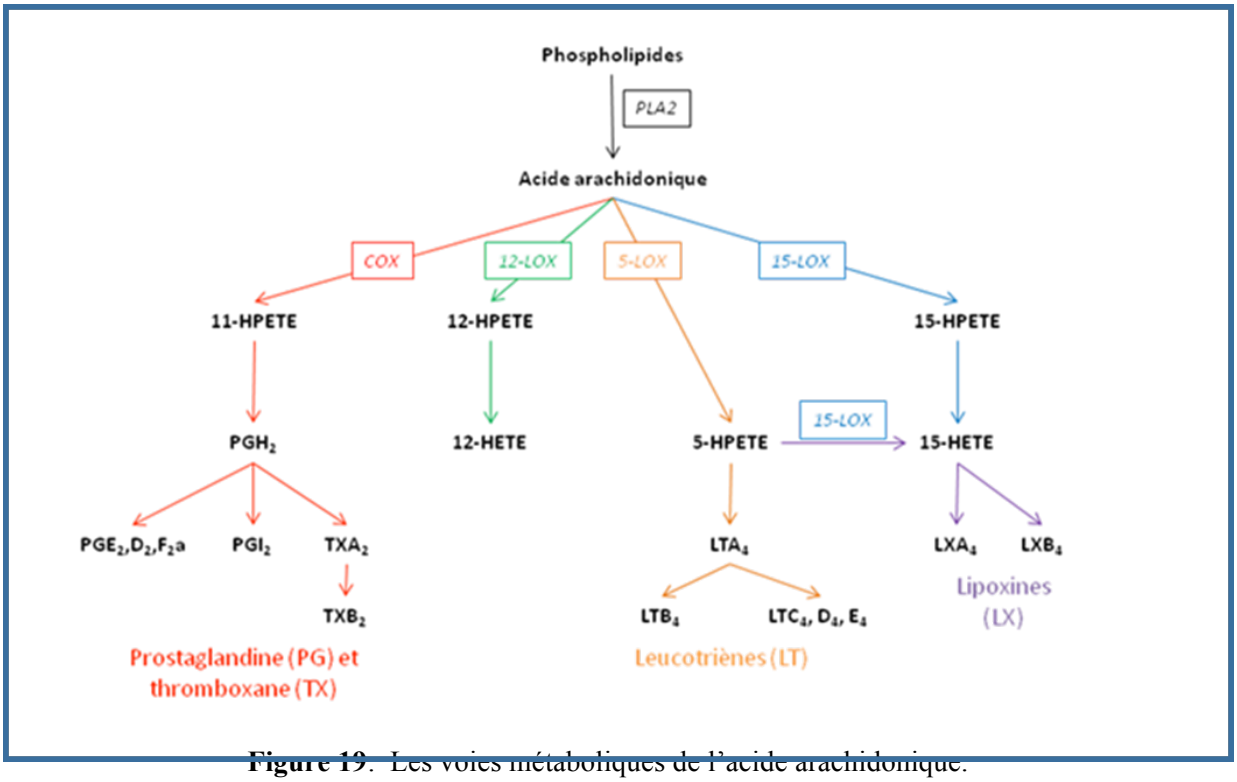


Figure 19. Les voies métaboliques de l'acide arachidonique.

Schéma reproduit avec l'accord de C. Abrial, UPRES EA220.

L'état de polarisation M1 est associé à l'expression de la cyclooxygénase de type 2 COX2 et à la production de prostaglandines PGE2 (336) (337). La PGE2 va alors jouer alors un rôle de rétrocontrôle négatif de l'inflammation en inhibant la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires, limitant la phagocytose et l'activité de la NAPH oxydase (338) (339).

La voie des lipoxygénases mène à la production de leucotriènes et lipoxines à partir de l'acide arachidonique. La 5-lipoxygénase (5-LOX) est responsable de la synthèse des leucotriènes impliqués dans l'amplification du signal inflammatoire du LPS (339). L'expression de la 5-LOX et la production des leucotriènes est diminuée dans des monocytes humains polarisés M2 (340).

La 15-lipoxygénase mène à la synthèse de lipoxines et existe sous deux isoformes : 15-LOX-1 et 15-LOX-2. Elles sont différemment exprimées en fonction de l'état de polarisation macrophagique, la 15-LOX-2 étant associée au phénotype M1 induit par le LPS alors que la 15-LOX-1 est exprimée dans les macrophages M2 stimulés par IL-4/IL-13 (341). Les lipoxines sont des médiateurs essentiels dans la résolution des processus inflammatoires. Elles constituent un signal d'arrêt du recrutement des polynucléaires neutrophiles. Elles favorisent l'élimination des cellules apoptotiques, la transition du phénotype M1 des macrophages vers un phénotype M2 avec production de TGF-β et d'autres médiateurs lipidiques comme les

résolvines et les protectines (342). Une augmentation des concentrations en lipoxines et résolvines est observée dans les macrophages dérivés de monocytes humains polarisés M2a par IL-4 (340).

E. Plasticité du macrophage

Les macrophages sont donc extrêmement hétérogènes et leur phénotype varie en fonction de leur environnement, selon leur localisation dans le corps humain et les processus physiopathologiques en jeu.

La dichotomie M1/M2 est utile pour décrire les sous-populations de macrophages en association aux pathologies mais le macrophage peut varier sur un large spectre d'états d'activation. On sait également que ce processus est réversible. Finalement, la polarisation des macrophages devrait etre considérée comme processus dynamique au cours duquel le phénotype de la cellule peut varier de façon continue sur une large palette (301) (Figure 20).

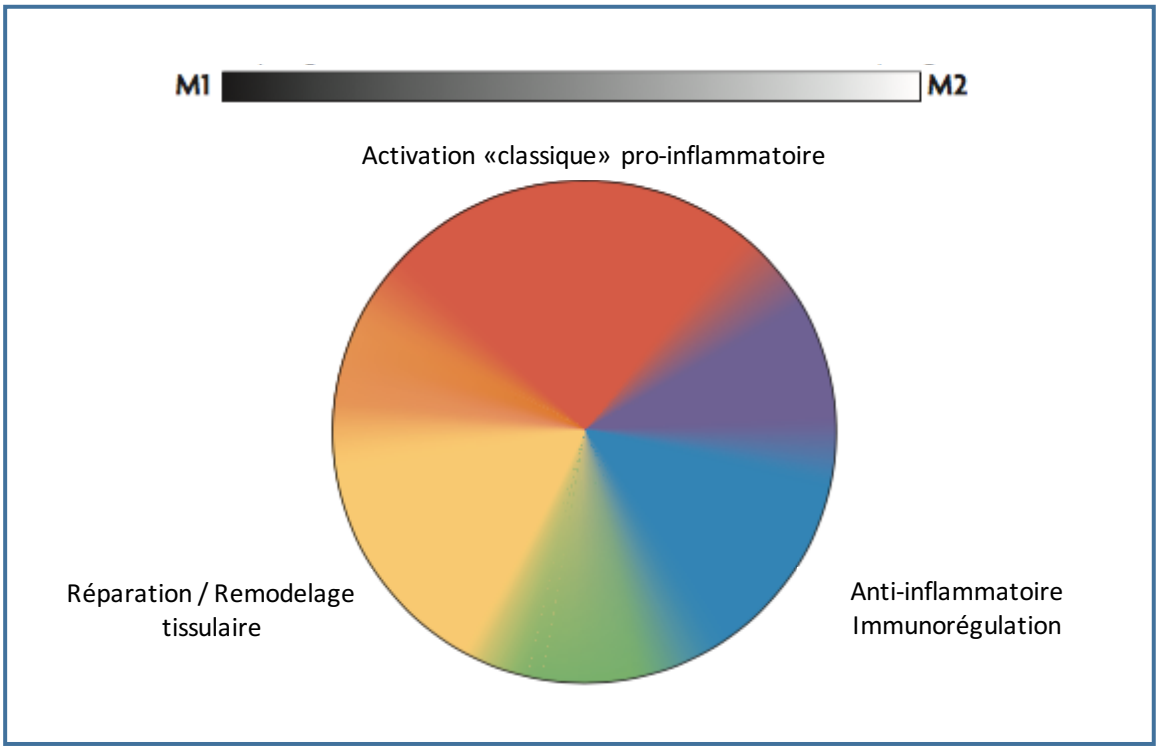


Figure 20. Spectres d'états d'activation des macrophages

Le phénotype des macrophages varie en changeant de couleurs/marqueurs d'activation sur une large palette. Représentation graphique issue de Mosser et al. Nat rev immunol 2008

Cette flexibilité rend compte de la double fonction du macrophage : protection d'un système contre les agressions extérieures et contribution à l'intégrité tissulaire par résolution de l'inflammation (343).

Après une agression (lésion tissulaire, infection…), les macrophages arrivent au site de l'aggression par la circulation sanguine locale via la diapédèse ou par recrutement des macrophages tissulaires résidents. Initialement, le milieu inflammatoire conduit les macrophages vers la polarisation M1 aux propriétés microbicides et vont activer la réponse lymphocytaire Th1. Dans la phase inflammatoire tardive, le changement du microenvironnement et le processus d'efferocytose vont conduire les macrophages M1 vers la polarisation M2. Les macrophages M2 vont orchestrer la résolution de l'inflammation par l'inhibition de la sécrétion des cytokines inflammatoires et la réparation tissulaire par la production de médiateurs ilpliqués dans la réparation de la matrice extra cellulaire (344).

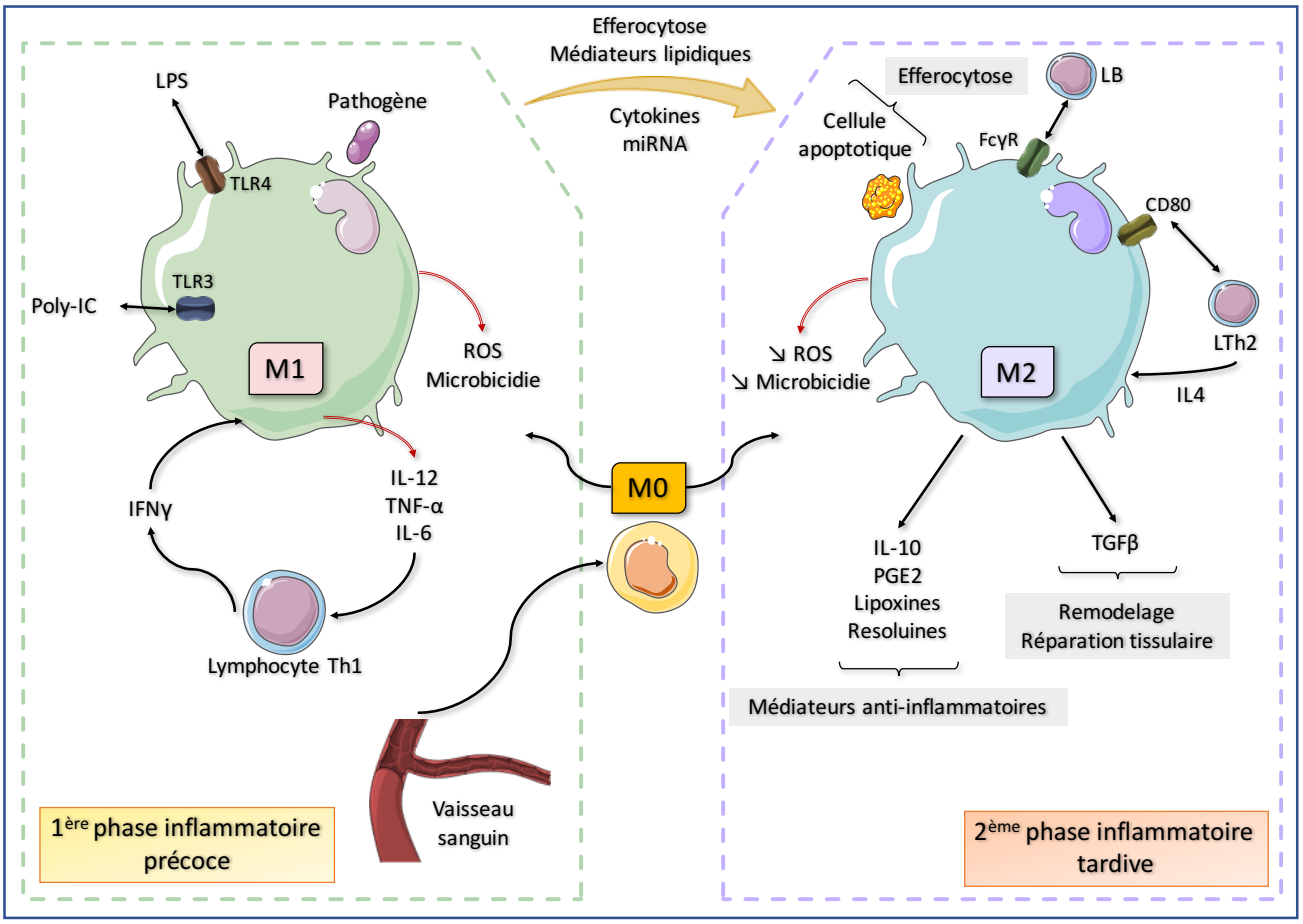


Figure 21. Schéma représentant les modifications de polarisation des macrophages au cours d'un processus inflammatoire.

Sur un même site, plusieurs états d'activation sont présents à des temps différents du processus (phase précoce/tardive). Il est plus probable que les macrophages M2 de la phase tardive dérivent des mêmes macrophages qui étaient présents sous la forme M1 à la phase aigüe plutôt que des vagues successives de recrutement de macrophages distincts à différents temps. Ces modifcations sont permises grace à la plasticité cellulaire des macrophages.

Il a été discuté de savoir si les macrophages M2 prédominants pendant la phase de réparation étaient dérivés d'un sous-ensemble de monocytes recrutés au cours d'une seconde vague sur le site lésionnel ou s'ils dérivaient des macrophages M1 initialement présents et qui avaient changé de phénotype.
Dans les travaux de Porcheray et al. et Xu et al., une même population de macrophages humains a été soumise successivement à des stimuli opposés. Ils ont montré que l'état d'activation de cette même population était rapidement et complètement réversible, en terme à la fois de morphologie, d'expression de marqueurs membranaires ou de production de cytokines (345) (346). Ces travaux suggèrent qu'un macrophage pourrait participer séquentiellement à la fois à l'induction et à la résolution de l'inflammation.
Le signal induit par l'efferocytose et la production subséquente des médiateurs lipidiques (PGE2, lipoxines, résolvines) semble essentiel pour le passage d'un phénotype pro-inflammatoire à un phénotype anti-inflammatoire. Ce phénomène est facilité en modifiant le miARN intracellulaire non codant dont l'expression est induite par l'efferocytose (347). Dans un contexte de diabète, le blocage de l'efferocytose empêche les macrophages polarisés M1 de changer de phénotype, même en cas de modification de leur environnement (348).

F. Polarisation des macrophages et pathologie

1. Polarisation des macrophages et infection

Les stimuli microbiens comme le LPS induisent une polarisation des macrophages en un phénotype M1. Ceux ci sont des effecteurs clés de la réponse de l'hôte contre les pathogènes bactériens. Ils soutiennent une production robuste de dérivés de l'oxygène et ont une

puissante fonction cytotoxique contre les cellules infectées (349) (350). De façon intéressante, certaines bactéries comme *Mycobacterium tuberculosis* pourraient échapper à cette réponse immunitaire cellulaire en déviant la polarisation des macrophages vers un phénotype M2 au sein de la structure immunotolérante qu'est le granulome (351). Il a en effet été montré, dans un modèle de granulome tuberculeux *in vitro*, que la polarisation des macrophages déviait au cours du temps d'un phénotype M1 vers un phénotype M2 (352). Ceci favorise la survie et la croissance bactérienne à l'intérieur du macrophage en bloquant la maturation du phagosome.

En ce qui concerne la réponse anti-virale, la polarisation des macrophages vers le phénotype M1 est essentielle, principalement à la phase précoce de l'infection. Le switch ultérieur vers un phénotype M2 permet de réduire les dommages tissulaires , comme dans le cas des bronchiolites induites par le virus syncytial qui peuvent générer des lésions épithéliales pulmonaires sévères.

Dans le cas du virus d'immmunodéficience humaine (VIH), la polarisation des macrophages joue un rôle important aux différents stades de l'infection (353). L'infection VIH chronique est en effet plutot associée à une polarisation de type M2. Ceci va de pair avec un dysfonctionnement des cellules monocytaires (défaut de migration, activité phagocytaire réduite, modification des profils de sécrétion cytokinique) qui favorise la survie et la réplication virale (354). Les stratégies thérapeutiques ciblant les macrophages et la modulation de leur état d'activation sont des voies de recherche prometteuses en terme de controle d'infection virale.

L'infection parasitaire est, à l'inverse, l'exemple type d'infection induisant d'emblée une polarisation M2 (355). Les glycanes exprimés par les helminthes interagissent avec les macrophages via les récepteurs de type lectine ou les TLR et orientent vers une activation alternative des macrophages M2 (356). L'IL-4 et l'IL-13 de cette voie Th2 vont organiser le piégeage des parasites dans des granulomes et favoriser l'expulsion des larves en stimulant la contraction des muscles lisses intestinaux. Les polynucléaires neutrophiles recrutés sur le site de l'infection produisent de l'IL-33 qui renforce la polarisation M2 des macrophages.

2. Polarisation des macrophages et arthérosclérose

L'athérosclérose est un remaniement de la paroi des artères à l'origine des accidents vasculaires (infarctus, accident vasculaire cérébral ischémique).

Les propriétés biologiques des macrophages de la plaque athérosclérеuse déterminent la taille, la composition et la stabilité des lésions (357). La polarisation des macrophages au sein de la plaque d'athérosclérose est un phénomène éminemment variable, modulé en grande partie par les produits d'oxydation des lipides présents en abondance. En 2010, il a été décrit un type de polarisation spécifique des macrophages situés dans la plaque d'athérosclérose, appelé "Mox". Celui ci se développe suite à l'activation par des phospholipides oxydés. Il se distingue des phénotypes conventionnels M1-M2 par un schéma d'expression génique différent, ainsi qu'une diminution de la capacité phagocytique et chimiotactique (358). La polarisation des macrophages au sein de la plaque d'athérosclérose semble même être plus complexe car il a été suggéré récemment plusieurs autres sous-populations de macrophages (359) : les populations M(Hb) et Mhem17, résistantes à la charge lipidique et induites respectivement par exposition à des complexes d'hémoglobine-haptoglobine et à des hèmes in vitro ainsi que la population M4, induite par la chimiokine CXC4 (360).

3. Polarisation des macrophages et tumeurs

Les macrophages associés aux tumeurs (TAM) sont les principales cellules immunitaires du micro-environnement tumoral et jouent un rôle clé dans le lien entre inflammation et cancer (361). Alors qu'ils peuvent présenter un phénotype M1 aux stades précoces de la transformation tumorale, ils acquièrent rapidement une polarisation M2, sous l'influence de différents facteurs : l'hypoxie tissulaire et les médiateurs anti-inflammatoires produits par la tumeurs. Ce phénotype M2 est associé à des fonctions promotrices de tumeurs, puiqu'ils sont dépourvus d'activité cytotoxique, produisent des facteurs de croissance pour les cellules cancéreuses et ont une activité immunosuppressive (362) (363). Les TAMs favorisent la croissance et la dissémination tumorales en inhibant l'immunité adaptative anti-tumorale à médiation Th1, en dégradant la matrice et en améliorant l'angiogenèse (364) (365). Le rôle de l'hypoxie tissulaire dans la modulation de la polarisation des TAM semble essentielle. Les

TAM se localisent préférentiellement dans les zones hypoxiques qui expriment le facteur de transcription HIF-1α (366).

De nouvelles thérapeutiques anticancéreuses ciblent le système immunitaire pour renforcer son action cytotoxique contre les cellules cancéreuses. L'immunothérapie, utilisée pour le traitement des tumeurs pulmonaires ou cutanées par exemple, agit sur les lymphocytes T en modulant la signalisation induite par le point de controle PD1/PDL1 (367). La régulation des états d'activation des TAM apparait également comme une cible thérapeutique prometteuse pour le controle de la croissance tumorale (368) (369).

VI. Modulation de la polarisation des macrophages au cours de l'obésité

A. Tissu adipeux et polarisation des macrophages

En état stable, chez un sujet fin, les macrophages du tissu adipeux présentent plutôt un phénotype M2 (370). Cette polarisation M2 est induite et maintenue par l'expression du facteur PPARγ, sous le contrôle de la cytokine anti-inflammatoire IL-4 (315) (371), ainsi que par l'infiltration du tissu en Lymphocytes T régulateurs (372). La production d'IL-4 au sein du tissu adipeux est contrôlée principalement par les éosinophiles qui représentent 5% des cellules de la fraction stromale vasculaire dans un modèle murin (373). Les *Adipose tissue type 2 innate lymphoid cells* (ICL2) sont essentielles pour l'attraction des éosinophiles au sein du tissu adipeux (374). La cytokine IL-33 contrôle la différenciation et le maintien à la fois des lymphocytes T régulateurs et des ICL2 résidents (375) ; le traitement de tissu adipeux avec de l'IL-33 augmente la production de cytokines anti-inflammatoire et protège de l'inflammation associée à l'obésité dans un modèle de souris génétiquement modifié ob/ob (376).

Les variations pondérales sont associées à des changements du tissu adipeux, tant au niveau des adipocytes que de la fraction stromale vasculaire. La prise de poids et l'hypertrophie du tissu adipeux s'accompagne d'une augmentation de l'infiltration tissulaire en macrophages (81) (377). De plus, les macrophages changent d'état de polarisation et s'orientent vers un phénotype M1, comme l'illustre l'augmentation des cytokines comme TNF-α, IFN-γ, IL-6 et IL-1β (378) (379) (380) (381). Lumeng et al. ont isolé des macrophages du tissu adipeux de

souris présentant un poids normal. Ceux-ci expriment des gènes associés au phénotype M2, dont IL-10, arginase 1. Lorsque ces souris prennent du poids après un régime hypercalorique, l'expression de ces gènes M2 diminue, au profit d'autres gènes associés au phénotype M1 comme TNF-α et iNOS. Ce switch de polarisation ne se fait pas lorsque les souris sont inactivées pour le gène CCR2 du récepteur à la chimiokine chemoatractante MCP-1 ; suggérant que les macrophages M1 pourraient être recrutés sur le site de l'inflammation à partir d'un pool de monocytes circulant (382). Chez l'homme, la réduction pondérale, suite à un régime pauvre en calorie ou à une chirurgie bariatrique, s'accompagne d'une diminution d'expression des cytokines pro-inflammatoires (TNFα, IL-6) dans le tissu adipeux alors qu'il y a une augmentation d'IL-10 (383) ; cette production est le fait des macrophages situés dans la fraction stromale vasculaire (384) (81).

La production de ces médiateurs inflammatoires par le tissu adipeux contribue à l'état d'inflammation chronique que l'on rencontre chez les sujets obèses et qui est à l'origine de nombre de complications métaboliques (insulinorésistance, diabète, dyslipidémie) et maladies inflammatoires chroniques (385) (386) (387).

Comprendre les mécanismes qui reprogramment les macrophages du tissu adipeux vers un phénotype pro-inflammatoire M1 est un enjeu important dans l'idée de développer des stratégies thérapeutiques anti-inflammatoires chez les sujets obèses. Les mécanismes sont probablement multiples, associant une combinaison de différents signaux de danger endogènes et exogènes (388).

Les acides gras saturés qui s'accumulent au cours de l'obésité activent directement les récepteurs TLR4 et TLR2 ou l'inflamasomme NLRP3 dans les macrophages, entraînant la libération de cytokines pro-inflammatoires (389) (390) (391). L'hypertrophie et l'hyperplasie des adipocytes vont générer localement des conditions de croissance défavorables (392), une hypoxie tissulaire (393) (394) (77), une augmentation du stress oxydatif. Ces changements sont associés à une augmentation de la mort cellulaire et les adipocytes nécrotiques vont alors libérer des signaux danger tels que l'ATP ou des dérivés lipotoxiques. Les cellules T CD8 + recrutées produisent de l'IFN-γ qui agit sur les macrophages en régulant l'expression des cytokines effectrices pro-inflammatoires et en augmentant l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II. Cela favorise la présentation de l'antigène des macrophages aux cellules T CD4 + et induit la polarisation et la prolifération des cellules Th1 qui seront-elles mêmes une source de production d'IFN-γ (395) (396).

Par ailleurs, des signaux exogènes peuvent également rentrer en compte dans l'activation des macrophages du tissu adipeux. Les taux de LPS sont élevés dans le plasma de souris obèses

(397) et on sait que, chez l'homme, un repas riche en graisses et glucides peut induire rapidement une augmentation de l'endotoxine LPS dans le plasma (398). Au cours de l'obésité, le microbiome intestinal subit des modifications significatives. Un régime hypercalorique entraine des changements important dans la composition du microbiome, ce qui s'accompagne d'une augmentation de la perméabilité de la barrière intestinale et de la translocation bactérienne (399) (400). Ce phénomène pourrait participer à l'inflammation du tissu adipeux en fournissant des PAMPS capables d'activer les cellules immunitaires résidentes. Mais à l'inverse, l'inflammation chronique peut être une cause elle-même d'altération du microbiome (401).

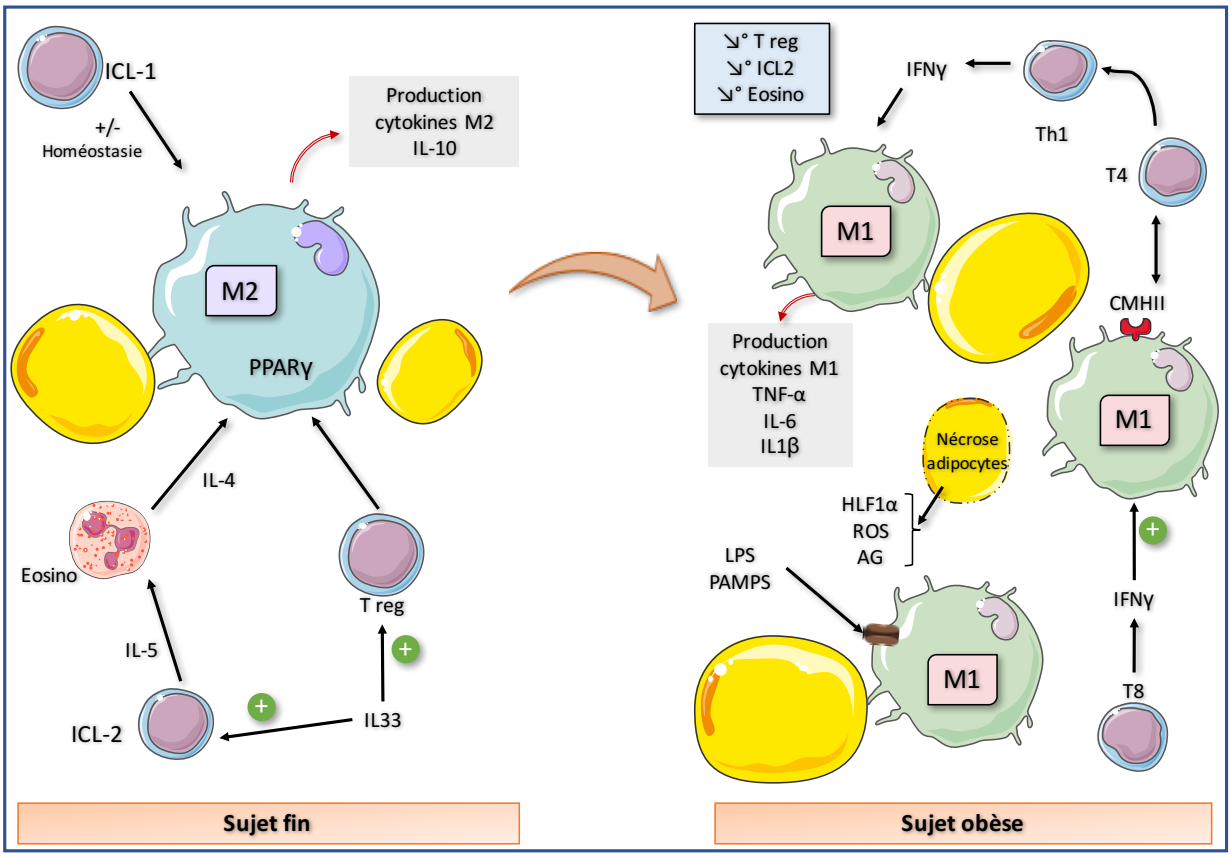


Figure 22. Facteurs impliqués dans la modulation du phénotype des macrophages associés au tissu adipeux au cours de l'obésité

Enfin, un mécanisme supplémentaire pouvant conduire à l'inflammation dans l'obésité, serait un changement de l'équilibre hormonal. Les taux d'adipokines secrétées par les adipocytes varient au cours de la prise de poids et de l'hypertrophie du tissu adipeux. Ces variations

peuvent influer sur les cellules immunitaires, localement ou à distance, et jouer sur la polarisation des macrophages.

B. Adipokines et polarisation des macrophages

Plusieurs équipes se sont intéressées à l'effet des adipokines sur le recrutement, l'activation et la fonction des macrophages. Les modèles utilisés sont variés : monocytes ou macrophages murins ou porcins, macrophages dérivés de monocytes humains. Il en résulte que la polarisation des macrophages est bien modulée par l'effet de ces adipokines mais leurs effets sont variables en fonction du modèle utilisé.

1. Leptine et polarisation des macrophages

Kiguchi et al. ont exposé des lignées de macrophages murins à de la leptine recombinante. Après 3h d'exposition à des concentrations de leptine de 1 et 100 ng/ml, l'expression de certaines chimiokines associées au phénotype M1 (CCL3-CCL4-CCL5) était significativement augmentée. Cet effet s'accompagnait d'une augmentation précoce (20 min) de l'expression du facteur de transcription STAT3 et était inhibé lors de l'ajout d'un inhibiteur de JAK2, ce qui est cohérent avec les voies de signalisation connues de la leptine dans les macrophages (402). Raso et al. ont également exposé des lignées de macrophages murins à de la leptine recombinante. Ils retrouvent une augmentation de la production de NO et de PGE_2 après 24 h de traitement par de la leptine 10 µg/ml ; cet effet est potentialisé lors d'une co-stimulation par de l'IFN-γ et apparait alors pour des concentrations de leptine plus faibles, à partir de 3 µg/ml (403).

Chez l'homme, des cellules mononuclées périphériques augmentent leur production de TNF-α et d' IL-6 après un traitement par de la leptine (250 ng/ml pendant 3j) (404). Dans une autre étude, Vaughan et al. échouait cette fois à retrouver l' effet inducteur de la leptine sur la production de cytokines par des macrophages dérivés de monocytes non stimulés (1 à 1000 ng/ml pendant 4h) ; la leptine potentialisait cependant l'effet du LPS sur l'expression de ces mêmes cytokines (405).

Finalement, la leptine pourrait induire un phénotype intermédiaire entre M1 et M2. En effet, lorsque l'on différencie des monocytes circulants en présence de leptine (25 ou 50 ng/ml

pendant 5 jours), les macrophages expriment des marqueurs membranaires identiques aux macrophages M2 différenciés en présence d'IL-4 (notamment mannose récepteur et CD163). Par contre, leur profil de production cytokinique en réponse à une stimulation par du LPS se rapproche plus de celui des macrophages M1 (différenciés en présence de IFNγ) avec des taux élevés de sécrétion de TNF-α, IL-6, IL1-β, et de MCP-1 (406).

2. Adiponectine et polarisation des macrophages

En ce qui concerne l'adiponectine, on retrouve, au contraire, un effet plutôt anti-inflammatoire et une orientation vers une polarisation M2. Il existe cependant des travaux contradictoires sur le rôle de l'adiponectine dans la polarisation des macrophages.

- Effet anti-inflammatoire de l'adiponectine

Les macrophages péritonéaux et du tissu adipeux de souris inactivés pour le gène de l'adiponectine présentent des marqueurs de phénotype M1 (expression de TNF-α, MCP-1 augmentées et celle de IL-10 et arginase-1 diminuées en comparaison aux souris sauvages) (407) ; ceci est renversé après transfection du gène de l'adiponectine. La même équipe a montré *in vitro* que des macrophages péritonéaux murins et des macrophages dérivés de monocytes humains traités par de l'adiponectine (30 µg/ml pendant 48h) diminuaient leur niveau d'expression de TNF-α et MCP-1, en situation basale et en réponse au LPS (407).

De même, des monocytes circulants de porc ont été traités avec de l'adiponectine (10µg/ml pendant 24h) avant d'être stimulés par du LPS. Wulster-Radcliffe et al. montraient que le pré-traitement par de l'adiponectine était responsable d'une diminution de l'expression et de la sécrétion de TNF-α et IL-6 induites par le LPS, alors que l'expression d'IL-10 était augmentée. Ceci s'accompagnait d'un défaut de translocation nucléaire du facteur NFkB (408).

L'adiponectine peut exercer son effet de façon paracrine. Dans les expériences de Lovren et al., des monocytes circulants humains ont été différenciés en macrophages soit en présence de LPS pour obtenir un phénotype M1, soit en présence d'IL-4 pour obtenir un phénotype M2, soit encore en présence d'IL-4 et adiponectine (10µg/ml 7 jours). L'incubation des macrophages M1 avec un surnageant de culture dérivé des macrophages M2 traités à l'adiponectine entraînait une inhibition de la sécrétion de TNF-α et de MCP1, plus prononcée que celle obtenue par le surnageant de cultures de macrophages M2 non exposés à l'adiponectine (409).

Un pré-traitement par de l'adiponectine (à la concentration de 10µg/ml pendant 24h) de monocytes issus de prélèvement médullaires ou des macrophages dérivés de monocytes entraînait une diminution des capacités de phagocytose et réduisait la sécrétion de TNF-α induite par le LPS mais pas celle d'IL1-β ou d'IL-6 (410).
Dans les travaux de Okamoto et al., des macrophages dérivés de monocytes humains étaient également soumis à un pré-traitement par de l'adiponectine (10µg/ml pendant 24h) avant d'être stimulés par du LPS. Les auteurs montraient que l'adiponectine diminuait l'expression et la sécrétion LPS-induites des chimiokines CXCL10 et CXCL9. L'adiponectine interférait sur la signalisation LPS-TLR4 par une inhibition de la phosphorylation du facteur de transcription IRF3. Ainsi, l'expression de IFNβ était diminuée et la signalisation induite par sa fixation sur son récepteur était impactée, notamment la phosphorylation de STAT1 (411).

- Effet pro-inflammatoire de l'adiponectine

Cependant les résultats de Cheng et al. étaient plus mitigés sur le rôle de l'adiponectine en tant qu'inducteur M2. Les auteurs ont en effet étudié le transcriptome de macrophages dérivés de monocytes humains en utilisant des puces Microarray Affimetrix. Ils se sont intéressés à l'expression de certains gènes associés distinctement aux phénotypes M1/M2. Ils ont montré qu'un traitement par de l'adiponectine (APN recombinante humaine produite dans des cellules de mammifères, à la concentration de 10 µg/ml pendant 24h) entrainait l'expression de 28 gènes associés au phénotype M1 (dont TNF-α, IL-6 mais pas CXCL9, CXCL10, IFN-γ, IL-12) et seulement trois gènes associés au phénotype M2 (CCL13, CCL18, CXCR4) ; la sécrétion de TNF-α et IL-6 était également significativement augmentée après traitement des macrophages non stimulés par de l'adiponectine 10 µg/ml (412). Ils en concluaient que l'adiponectine induisait sur des macrophages dérivés de monocytes humains une réponse plutôt pro-inflammatoire qui se rapprocherait plus d'un phénotype M1 que M2 (412).
L'équipe de Van stijn et al. ont différencié des monocytes circulants humains soit en phénotype M1 (en présence de LPS et/ou IFNγ) soit en phénotype M2 (en présence d'IL-4). Pendant le processus de différenciation, ils ont rajouté de l'adiponectine (forme longue, recombinante murine, 10 µg/ml) pendant 48h. Ils ont montré que l'adiponectine entrainait dans les macrophages M1 une augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires (TNFα, IL-12, IL-6) et restaurait l'expression des récepteurs à l'adiponectine AdipoR1 et 2. A l'inverse, dans des macrophages M2, l'adiponectine augmentait l'expression de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 et ne modifiait pas celle des AdipoR (413).

Aucune étude n'a jusqu'à présent étudié l'état d'activation des macrophages pulmonaires humains en présence d'adiponectine. Summer et al. ont montré que la concentration de la cytokine pro-inflammatoire TNF-α était plus importante dans le milieu de culture de cellules issues du liquide de lavage broncho alvéolaire de souris déficientes pour le gène de l'adiponectine. Le traitement de ces cellules par de l'adiponectine exogène réduisait la production de TNF-α induite lors d'une stimulation par du LPS (249).

3. Autres adipokines

L'effet de la visfatine recombinante a été étudié sur des monocytes CD14+ isolés à partir de cellules mononuclées humaines circulantes. Les auteurs ont montré que la visfatine (100 ng/ml) induisait une augmentation de la production de TNF-α, IL-6 et IL-1β dans le surnageant de ces cellules (414). Par contre, l'effet n'était plus aussi clair lorsque ces cellules étaient différenciées en macrophages, la visfatine n'induisant plus que la production d'IL-6 et non de TNF-α ni d'IL-1β (414). A l'inverse, Audrito et al. ont montré que le traitement par de la visfatine (200 ng/ml) pendant 5 jours de monocytes issus de patients suivis pour une leucémie lymphoïde chronique, induisait un profil de polarisation mixte M1/M2, avec l'augmentation de la sécrétion de CCL18, IL-6, CXCL-8 et CCL3 ainsi que de l'expression de CD163 et CD206 (415). Une autre étude sur une lignée de macrophages murins apporte des conclusions encore différentes. Un traitement par visfatine (200 ng/ml) pendant 24h induisait une augmentation de la sécrétion d' IL-6, CXCL8, IL1-β et TNF-α en situation basale mais réduisait la sécrétion induite par du LPS (10µg/ml) de ces mêmes cytokines (416).

Dans un modèle murin, des macrophages péritonéaux étaient traités par de la chémérine avant d'être stimulés par du LPS. La chémérine diminuait, à partir de 0,5 pM et de façon concentration-dépendante, la production de TNF-α, IL1-β, IL-6 CCL5, IL-12 alors qu'elle augmentait celle d' IL-10 et TGF-β (417). Son effet semblait dépendant du site de clivage de la prochémérine car des peptides synthétiques, semblables à la partie C-terminale mais de longueurs différentes, ne présentaient pas la même action inhibitrice *in vitro*. *In vivo*, l'injection de chémérine à des souris avant un challenge infectieux améliorait le pronostic du sepsis (417). Ces résultats sont en accord avec les expériences de Bondue et Luangsay qui ont montré que l'injection de chémérine chez des souris diminuait l'inflammation pulmonaire induite par une instillation de LPS ou dans un modèle de pneumonie virale (418) (419). Cependant, la même équipe échouait à reproduire *in vitro* l'effet inhibiteur de la chémérine

(forme complète) sur la sécrétion des cytokines LPS-induites de macrophages péritonéaux de souris ou de macrophages dérivés de monocytes circulants humains (420). Ces études contradictoires pourraient être expliquées par des différences dans le protocole expérimental (source génétique des souris, milieu de culture rendant actives ou non les protéases sécrétées par les macrophages, différences inter-espèces,…)

OBJECTIFS du travail de recherche

L'obésité entraîne une surmortalité et une morbidité spécifique. Elle modifie les mécanismes d'immunorégulation, fragilise le système respiratoire envers les infections respiratoires et induit un phénotype particulier d'asthme. La prise de poids s'accompagne de modifications de production des adipokines par les adipocytes. Ces adipokines sont capables d'agir de façon paracrine et/ou systémique et leurs récepteurs sont présents sur diverses cellules du système immunitaire. Les données disponibles concernant l'effet des adipokines sur la polarisation des macrophages sont contradictoires, fonction de l'origine et des modèles et des protocoles expérimentaux utilisés.

Nous avons étudié le rôle de certaines adipokines dans l'immunorégulation pulmonaire en utilisant des cultures primaires de macrophages et de cellules épithéliales bronchiques issus d'explants de parenchyme et de bronches pulmonaires humains.

Nous avons mesuré la production locale d'adipokines (leptine-adiponectine) par le parenchyme pulmonaire et des explants de bronches et étudié l'expression de leurs récepteurs sur des macrophages pulmonaires.

Nous avons aussi exploré l'effet des adipokines (leptine-adiponectine-visfatine-chémérine) sur la polarisation des macrophages. Pour cela, nous avons mesuré la production de cytokines-chimiokines en présence de concentrations variables d'adipokines, à l'état basal et lors d'une stimulation M1 (LPS) ou M2 (IL-4).

Enfin, nous nous sommes également intéressés à l'effet de ces adipokines sur d'autres cellules structurelles pulmonaires, les cellules épithéliales bronchiques, et sur des bronches humaines afin d'explorer leur rôle dans la régulation de la production des médiateurs inflammatoires et du tonus bronchique.

MATERIELS ET METHODES

I. Méthodes d'isolement et culture des explants et cellules pulmonaires humains

A. Isolement et culture d'explants de parenchyme humains.

Les tissus pulmonaires ont été obtenus à partir de pièces de lobectomie de sujets opérés pour cancer broncho-pulmonaire à l'hôpital Foch (Suresnes, France) ou à la clinique du Val d'Or (Saint Cloud, France). La zone réséquée a été prélevée à distance de la tumeur, en zone macroscopiquement saine. Ce programme de recherche a obtenu l'accord du Comité Consultatif pour la Protection des Personnes Ile-de-France VIII (Hôpital Ambroise Paré).

Les prélèvements ont été acheminés rapidement au laboratoire et le tissu pulmonaire a été découpé en petits fragments sous hotte stérile. Des fragments de parenchyme pulmonaire homogènes de 10 à 30 mg environ ont été ensuite lavés dans un milieu de culture supplémenté en glutamine et antibiotiques puis conservés 24h à +4°C. Le lendemain, les explants pulmonaires ont été placés dans des plaques de culture de 12 puits à raison de 30 à 60 mg de parenchyme immergés dans 3 ml de RPMI supplémenté.

Les différents stimuli et traitements d'intérêt ont été ajoutés dans chacun des puits avant de les laisser incuber 24h supplémentaires à 37°C et 5% CO_2. Au terme de cette stimulation, les surnageants ont été récupérés et centrifugés (3000 rpm, 5 minutes, 4°C) pour éliminer les débris cellulaires restants puis répartis dans des aliquots avant d'être congelés à -20°C. Par ailleurs, les fragments de parenchymes séchés ont été pesés pour chaque condition, ce qui a permis de rapporter les concentrations de cytokines dans les surnageants au poids sec des échantillons. La caractérisation de ce modèle d'explants de parenchyme pulmonaire a été publiée par le laboratoire en 2013 (421).

B. Isolement et culture des macrophages pulmonaires humains

1. Isolement des macrophages

Les macrophages pulmonaires ont été isolés à partir des mêmes pièces opératoires selon une technique préalablement décrite et utilisée dans le laboratoire depuis 2008 (422) (423) (424). Le tissu pulmonaire a été finement découpé et lavé abondamment avec du milieu de culture. Le liquide de lavage obtenu a été centrifugé (2000 rpm, 10 minutes, 25°C) afin de récupérer le culot cellulaire. Celui-ci a été remis en suspension dans du milieu supplémenté enrichi en

sérum de veau fœtal (SVF) 10% décomplémenté. Cette suspension cellulaire a été ajustée à 10^6 cellules.ml^{-1} et déposée dans une plaque de culture 24 puits à raison de 1 ml par puit. Cette plaque a été laissée au minimum 1h30 dans un incubateur à 37°C et 5% CO_2, pour permettre aux macrophages d'adhérer au support de culture avant d'être lavée doucement à trois reprises avec du RPMI pour éliminer les globules rouges et autres cellules non adhérentes. Enfin, 1 ml de milieu de culture enrichi en SVF 10% a été ajouté par puit et les plaques ont été maintenues dans l'incubateur (37°C et 5% CO_2) pendant 24h. La population cellulaire ainsi obtenue est constituée à plus de 95% par des macrophages, comme démontré en microscopie optique après coloration May-Grünewald-Giemsa et en immunohistochimie par marquage anti-CD68. La viabilité cellulaire estimée par marquage au bleu tryptan est supérieure à 90%.

2. Culture et traitement des macrophages

Le lendemain, les préparations de macrophages ont été lavées deux fois, le milieu de culture a été changé pour du RPMI supplémenté en antibiotiques, glutamine et SVF 1%. Ils ont été traités avec les différentes adipokines d'intérêt à dose croissante : leptine recombinante (1-10-100-1000 ng/ml, R&D®), adiponectine recombinante (3-10-30 µg/ml, R&D® et Biovendor®) et agoniste des récepteurs à l'adiponectine AdipoRon (5-10-25-50 mM, Tocris), visfatine recombinante (5-50-100-250-500 ng/ml, R&D®), chémérine recombinante (10-100-500-1000 ng/ml, R&D®). Après une heure d'incubation (37°C, 5% CO2) en présence de ces adipokines, du LPS (10 ng/ml), de l'IL4 (10 ng/ml) ou du Poly I :C (10 ng/ml) ont été ajoutés pour une durée d'exposition de 24 h. A la fin de cette exposition, une numération cellulaire a été déterminée par comptage au microscope inversé pour chacun des puits. Les surnageants ont été récupérés, centrifugés (3000 rpm, 5 minutes, 4 °C), aliquotés et congelés à -20°C. Dans certains cas, les macrophages ont été lysés et récupérés dans 1 ml de TRIzol® pour les analyses d'expression des transcrits (notamment des récepteurs de l'adiponectine) par RT-qPCR.

3. Transfection des macrophages par les siRNA

Au lendemain de l'isolement des macrophages pulmonaires humains, ces derniers ont été lavés avec du RPMI supplémenté en glutamine et antibiotiques. Les macrophages ont été comptés, décollés et repris dans du RPMI avec glutamine, répartis afin que chaque condition de transfection contienne au minimum 5.10^6 macrophages. Après centrifugation (2000 rpm,10 min, 25°C), les macrophages ont été repris très doucement dans 100 µL de la solution

Nucleofector® II contenu dans le kit de transfection pour macrophages humains (Amaxa® Human Macrophage Nucleofector® Kit, Lonza) supplémentée de 300 nM de siRNA spécifique du gène cible (siRNA AdipoR1, siRNA AdipoR2) ou d'un contrôle négatif appelé siRNA « scrambled ». Cette suspension est ensuite déposée dans une cuvette à transfection permettant de transfecter les macrophages par l'Amaxa® Nucleofector® II. Le programme de transfection appliqué aux macrophages est défini par l'Amaxa® Human Macrophage Nucleofector® Kit. Une fois la transfection réalisée, les macrophages sont repris dans 500 µL de RPMI complet à 10% de SVF et déposés dans une plaque 12 puits contenant dans chaque puits1 mL de milieu complet RPMI avec 10% de SVF et remis à l'incubateur (37°C et 5% CO_2). Le lendemain, ont été ajoutés de l'adiponectine à 10 µg/ml puis une heure après, du LPS (10 ng/ml). Comme décrit précédemment, les surnageants et cellules ont été récupérés pour dosages des cytokines et analyse par RT-qPCR.

C. Isolement et culture des cellules épithéliales bronchiques humaines

Les tissus pulmonaires ont été disséqués afin d'isoler les bronches segmentaires proximales. Celles-ci ont été placées dans du milieu DMEM-High glucose (Dulbecco's Modified Eagle's medium) complété avec de la L-glutamine, 10% de SVF, de l'HEPES et des antibiotiques et antifongiques (pénicilline, streptomycine, gentamycine, vancomycine, amphotéricine, ceftazidime et mycozap). Elles ont été conservées à + 4 ° C pendant trois à six jours. Le mucus endobronchique a été retiré et les bronches ont été sectionnées dans la longueur avant de rajouter de la protéase (protéase de pancréas de bœuf, 10 mg/ml) pendant une nuit à + 4 ° C. Le jour suivant, après avoir inhibé l'action de la protéase par du SVF, la paroi endobronchique a été grattée doucement afin de détacher les cellules épithéliales et les récupérer dans le milieu de culture qui a ensuite été centrifugé. Le culot cellulaire a été remis en suspension dans 12 ml de milieu de désagglutination (PBS +EDTA 2 mM +DTT 0.05 mg/ml + collagénase 0.25 mg/ml + chlorure de calcium 0.75 mg/ml + chlorure de magnésium 1 mg/ml + DNAse 10 µg/ml). Après ajout de SVF 10% et centrifugation, le culot a été repris dans du Bronchial Epithelial cell Growth Medium (BEGM) contenant des facteurs de croissance et additionné d'antibiotiques. Il a été placé en culture à 37°, à raison de 2 à 6 millions de cellules par flasque T25 pré-coaté avec du collagène (BD BioCoat). Le lendemain, puis tous les deux jours, le milieu de culture a été changé avec du Bronchial Epithelial cell Growth Medium (BEGM) contenant des facteurs de croissance + antibiotiques.

Lorsque les cellules étaient arrivées à confluence, elles ont été détachées avec de la trypsine (2 ml par flasque pendant 10 minutes), centrifugées et remises en suspension avec du BEGM dans une plaque 24 puits (1 ml par puits). Lorsque les cellules étaient arrivées à nouveau à confluence, les différents traitements pharmacologiques ont été ajoutés.

II. Dosage immunologique des médiateurs sécrétés

A. Dosage des cytokines

Le dosage des cytokines dans les surnageants de culture a été réalisé par la technique ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) à l'aide des kits *Human Duoset* commercialisés par R & D Systems Europe, Lille France. Cette technique permet la mise en évidence d'une protéine d'intérêt grâce au couplage spécifique antigène-anticorps.

Sur des plaques ELISA de moyenne ou haute sensibilité, un anticorps de capture est incubé une nuit à température ambiante. Le lendemain, après lavage de la plaque, les échantillons et les standards ont été dilués et déposés. La plaque a été lavée 2 heures après, et un anticorps de détection biotinylé a été ajouté. Il a été procédé à un nouveau lavage pour éliminer l'excès d'anticorps, puis mise en présence de la streptavidine conjuguée à l'enzyme HRP (Horseradish peroxidase). L'addition de substrat (H_2O_2-tetrabenzylbenzidine) a permis, par une réaction colorimétrique, la révélation des complexes formés et la quantification des cytokines présentes. La densité optique a été mesurée par un spectrophotomètre à 450 nm (lecteur de plaque 96 puits MRX II, Dynex Technologies, Saint Cloud, France).

Une courbe de régression a été construite à partir des densités optiques de la gamme standard et les calculs de conversion de la densité optique en concentration ont été effectués avec l'aide du logiciel GraphPad Prism©. Les limites de détection pour les différentes cytokines sont : 4 $pg.ml^{-1}$ pour CCL3, CCL13, CCL18 et CCL22, 8$pg.ml^{-1}$ pour TNF-α, CCL2, CCL4, CCL5 et CCL17, 9 $pg.ml^{-1}$ pour l'IL-6, 16 $pg.ml^{-1}$ pour CXCL1, CXCL8, CXCL10 et CCL24. Les résultats ont été exprimés en pg /100 mg de parenchyme ou en pg /10^6 macrophages.

B. Dosage des adipokines

Le dosage des adipokines dans les surnageants de culture a été réalisé par la technique ELISA à l'aide des kits suivants :

- Human total Adiponectin Immunoassay Quantikine (limite de détection : 0,246 ng/ml) de R&D Systems
- Human Leptin Immunoassay Quantikine (limite de détection : 7,8 pg/ml), R&D Systems
- Human Chemerin Immunoassay Quantikine (limite de détection : 4,13 pg/ml), R&D Systems
- Human Visfatin C-terminal Immunoassay Quantikine (limite de détection : 2,3 ng/ml) commercialisé par Phoenix Pharmaceutical.

III. Analyse des transcrits par Polymerase Chain Reaction (PCR)

A. Extraction des ARN

Les ARN ont été isolés par ajout de TRIzol après préparation des différents types de tissus/cellules étudiés :
- macrophages pulmonaires : après retrait du surnageant, les cellules adhérentes au support de culture ont été lysées par ajout de TRIzol (1 mL de TRIzol pour 6 puits et pipetage répétitif).
- explants de parenchyme et de bronches : les tissus ont été découpés finement dans du TRIzol à raison de 1 ml de TRIzol pour 50 à 100 mg de tissu puis cette préparation a été broyée par un broyeur cellulaire Potter.

Les ARN ont ensuite été isolés par ajout de chloroforme (200 µl pour 1 ml de solution) puis centrifugation (12 000 rpm, 15 minutes, 4°C). Les ARN totaux ont été précipités avec 500 µl d'isopropanol et laissés incuber une nuit à – 20°C. Le lendemain, les prélèvements ont à nouveau été centrifugés (12 000 rpm, 10 minutes, 4°C), le culot d'ARN a été récupéré et lavé avec 1 ml d'ethanol 75%. Après une nouvelle centrifugation (7500 rpm, 5 minutes, 4°C), le culot d'ARN a été séché et remis en suspension dans 20 µl d'eau RNase free.

La quantité d'ARN obtenue a été mesurée par spectrophotométrie (spectrophotomètre Biowave DNA ; Biochrom) : mélange de 2 µl d'ARN + 58µl de tampon TrisCl 10 mM pH 7.0 dans une cuvette UV RNase free. Les ARN ont ensuite été conservés à -80°C.

B. Vérification de la qualité des ARN

La vérification de la qualité des ARN a été effectuée grâce à un système d'électrophorèse capillaire Experion commercialisé par Biorad©. Cette technique permet une analyse qualitative sur l'état de conservation et la pureté des ARN extraits ainsi qu'une étude

quantitative pour des concentrations comprises entre 25 et 500 ng/µl, en se basant sur l'étude des ARN ribosomaux 18S et 28S. Une matrice de séparation a été déposée sur une puce puis 1 µl de chaque échantillon associé à un marqueur fluorescent, 5 µl d'un tampon de charge et enfin 1 µl d'un marqueur de bas poids moléculaire. La puce a été ensuite insérée dans une station d'électrophorèse. Les ARN ribosomaux 28S et 18S ont migré en fonction de leur poids moléculaire. L'interprétation de la qualité des échantillons est basée sur l'intensité de la fluorescence, le profil de migration et le rapport 28S/18S.

C. Transcription inverse

L'étape de transcription inverse a été réalisée grâce au kit SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix commercialisé par Invitrogen©. Pour chaque échantillon, ont été mélangés 0.4 µg d'ARN + 10 µl de tampon réactionnel + 2 µl d'enzyme, de l'eau PCR complétée jusqu'à 20µl. La solution obtenue a été incubée 10 minutes à 25°C- 30 minutes à 50°C puis 5 minutes à 85°C. Les ARN restants ont été éliminés par l'ajout de 1 µl de RNase H et incubation à 37°C pendant 20 minutes. Les échantillons d'ADN complémentaire ainsi obtenus ont été dilués à une concentration de 4 ng/µl.

D. Réaction en chaîne par polymérase quantitative

L'étude de la transcription des gènes de cytokines et des récepteurs de l'adiponectine a été réalisée par PCR quantitative, en utilisant des amorces spécifiques de chacun des gènes. L'analyse est basée sur la chimie TaqMan qui permet d'obtenir un signal fluorescent spécifique du gène étudié grâce à l'utilisation d'une sonde fluorescente spécifique. Pour l'étude des gènes 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 spécifiques 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.

IV. Western Blot

Une fragmentation mécanique des explants de parenchyme pulmonaire a été réalisée avec un broyeur vibrant, les fragments étant immergés dans 500 µl de tampon de lyse (Novagen, san Diego, USA) additionné d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases et phosphatases (Roche, Mannheim, Germany). Le dosage des protéines a été effectué grâce à un kit BCA (bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit (Pierce)) selon les instructions du fabricant.

Les extraits protéiques ont été séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE, Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis). Deux gels de concentrations différentes d'acrylamide ont été utilisés : un gel de concentration de 5 à 12% et un gel de concentration 10%. Le volume nécessaire à l'obtention de 50 µg de protéines a été calculé pour chaque échantillon.

Dans les conditions de dénaturation, ce volume d'échantillon a été mélangé à 5µl de tampon Laemmli (tampon Tris-Hcl 62,5mM pH 6,8, glycerol 2,5%, SDS 2% et bleu de bromophénol 0,01%) et 2 µl de 2βmercapto-éthanol à 5%. Le mélange a été ensuite chauffé à 70°C pendant 10 minutes. Lorsque l'on désirait étudier la protéine non dénaturée, l'échantillon était mélangé à 5 µl de tampon Laemmli seul, sans ajout de 2βmercapto-éthanol et le mélange n'était pas chauffé.

Les extraits protéiques ont été déposés dans le gel d'acrylamide, la migration s'effectuant à 200V pendant 45 minutes dans un tampon MOPS additionné d'anti-oxydant (Invitrogen®). Les protéines ont été ensuite transférées en milieu semi-sec sur une membrane de nitrocellulose à 200 mA pendant 45 minutes dans un tampon de transfert contenant Tris, glycine et éthanol.

Les sites non spécifiques ont été bloqués par incubation pendant deux heures à température ambiante sous agitation dans une solution de saturation contenant du Tween-TBS, du lait 5% et du BSA 0,1%. L'anticorps primaire d'adiponectine produit chez la chèvre (RetD®) a été déposé toute la nuit à 4°C à une concentration de 0,1µg/ml. Après rinçages, un anticorps secondaire spécifique de la chèvre et couplé à un système HRP (enzyme horseradish peroxydase) a été appliqué sur la membrane pendant deux heures à température ambiante. La révélation de l'immunoréactivité de la peroxydase liée à l'anticorps secondaire a été effectuée par chimioluminescence selon le kit ECL (enhanced chemiluminescence kit (GE Healthcare

Europe)). La membrane a été placée dans une caméra CDD (charged-coupled device camera, Biorad®) et la production lumineuse quantifiée. L'intensité du marquage protéique sur les bandes de Western blot a été analysée avec le logiciel ImageJ. La quantité relative de protéine immunoréactive exprimée en unités arbitraires a été obtenue en rapportant les valeurs de cette protéine à la valeur correspondante de βactine dans l'échantillon.

V. Expression des résultats et analyses statistiques

Les résultats des dosages ELISA ont été exprimés en moyenne ± s.e.m (erreur standard à la moyenne). Ils ont été rapportés pour 100 mg de parenchyme ou 10^6 macrophages.
L'évaluation statistique des données a été conduite à l'aide du logiciel GraphPad Prism® en utilisant une analyse de la variance (ANOVA) paramétrique ou non paramétrique, adaptée ou non aux séries répétées, 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.

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-(ΔCt)), en facteur d'augmentation (2-Δ(ΔCt)) ou en facteur de diminution (-1/2-Δ(ΔCt)) ou ΔCt est la différence entre le Ct (Cycle threeshold) du gène cible et le Ct du gène de référence.

RESULTATS

Article n°1

L'obésité, facteur de mauvais pronostic au cours de l'épidémie de Grippe A (H1N1) 2009 : rôle des adipokines dans la modulation des défenses respiratoires

Obesity, poor prognostic factor in pandemic influenza A (H1N1) 2009: the role of adipokines in the modulation of respiratory defenses

Hélène SALVATOR[1,2,3], Philippe DEVILLIER[2], E. RIVAUD[1], E. CATHERINOT[1], Patrick HONDERLICK[4], Louis-jean COUDERC[1,2,3]

[1] Service de pneumologie, Hôpital Foch, Suresnes, France
[2] Laboratoire de pharmacologie et physiologie respiratoire, UPRES EA220, Suresnes, France
[3] Faculté de medecine, Université de Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines, France
[4] Service de microbiologie, Hôpital Foch, Suresnes, France

Rev Pneumol Clin. 2011 Sep;67(4):244-9. doi: 10.1016

Introduction à l'article n°1

En juin 2009, devant l'ampleur de l'épidémie liée au nouveau virus grippal H1N1, l'OMS qualifie la situation de pandémie. En France, la fin de l'épidémie est annoncée le 13 janvier 2010. Mais au cours de l'hiver 2009, la grippe aura été responsable, selon les données de l'institut de veille sanitaire (InVs), de 3.5 millions de consultations pour syndrome grippaux, 1334 hospitalisations pour cas graves et 312 décès. Le taux de complications sévères était finalement comparable aux épidémies de grippe saisonnières antérieures mais les catégories de personnes touchées ont été très différentes. Les personnes de plus de 50 ans, ayant déjà été en contact antérieurement avec un virus proche de la souche H1N1 2009, avaient conservé une certaine immunité et ont été relativement moins concernées par l'infection. L'épidémie de grippe s'est par contre répandue facilement parmi les jeunes, suscitant une vive émotion dans l'opinion publique et quelques polémiques sur les programmes de vaccinations recommandés.

Par ailleurs, deux catégories de patients étaient particulièrement représentées parmi les cas de grippe grave : les femmes enceintes les sujets obèses. En France, 5% des hospitalisations en réanimations et 1% des morts liées à la grippe H1N1 étaient des femmes enceintes, alors qu'elles ne représentaient que 1% de la population générale. En décembre 2009, l'InVs estimait que 6% des personnes décédées de la grippe étaient obèses. Cette sur-représentation des sujets obèses parmi les cas graves de grippe (hospitalisation en réanimation, décès) se retrouvait dans tous les pays touchés et était tout à fait inhabituelle par rapport aux épidémies antérieures.

Nous avons été, au sein du service de pneumologie de l'hôpital FOCH, confrontés directement à ces particularités épidémiologiques. Cela a initié nos réflexions sur le lien qui existe entre surpoids et immunité respiratoire et a été le point de départ des travaux scientifiques présentés dans cette thèse.

Dans cette revue, sont relevées les principales données épidémiologiques mondiales concernant les infections grippales sévères chez les sujets obèses. Le retentissement de l'obésité sur le fonctionnement du système respiratoire est discuté, tant sur les plans mécanique, qu'immunologique et thrombotique. Le rôle des adipokines comme potentiels agents immunorégulateurs au sein du système respiratoire est suggéré.

Pneumologie clinique
Le poumon et le cœur

N° et date de parution : 674 - 01/09/2011
Diffusion : 1500
Périodicité : Bimestriel
RevuedeP_674_70_311.pdf
Site Web : www.masson.fr
Page : 70
Taille : 100 %
2471 cm2
Press Index

CARTE BLANCHE À LA PNEUMOLOGIE DE L'HÔPITAL FOCH

L'obésité, facteur de mauvais pronostic au cours de l'épidémie de grippe A (H1N1) 2009 : rôle des adipokines dans la modulation des défenses respiratoires

Obesity, poor prognostic factor in pandemic influenza A (H1N1) 2009: The role of adipokines in the modulation of respiratory defenses

H. Salvator [a,b,*], P. Devillier [b,c], É. Rivaud [a], É. Catherinot [a], P. Honderlick [d], L.-J. Couderc [a,b,c]

[a] *Service de pneumologie, hôpital Foch, 40, rue Worth, 92150 Suresnes, France*
[b] *Laboratoire de pharmacologie et physiologie respiratoire, UPRES EA 220, 11, rue Guillaume-Lenoir, 92150 Suresnes, France*
[c] *Faculté de médecine Paris-Île-de-France-Ouest, université de Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines, 9, boulevard d'Alembert, 78280 Guyancourt, France*
[d] *Service de microbiologie, hôpital Foch, 40, rue Worth, 92150 Suresnes, France*

Disponible sur Internet le 5 août 2011

MOTS CLÉS
Obésité ;
Grippe A H1N1 ;
Leptine ;
Immunité ;
Thrombose

Résumé L'épidémie de grippe A H1N1 survenue au cours de l'année 2009 a présenté des caractéristiques épidémiologiques inattendues, notamment le nombre élevé de sujets obèses parmi les cas sévères de grippe. De façon générale, l'obésité semble associée à une fragilité vis-à-vis des infections respiratoires. Cette susceptibilité pourrait être la conséquence d'une conjonction de facteurs mécaniques et hormonaux générés par le surpoids. L'obésité entraîne des modifications de la mécanique ventilatoire et une augmentation de la charge métabolique à l'effort. Elle est associée à des modifications du système immunitaire. Les adipokines, cytokines produites par les adipocytes dont fait partie la leptine, jouent un rôle central en modulant l'activité de l'ensemble des cellules de l'immunité. Enfin l'obésité est associée à un risque accru de thrombose, ce qui grève le pronostic des infections. L'ensemble de ces éléments peut expliquer que l'obésité ait été un facteur de risque de cas graves de grippe.
© 2011 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

* Auteur correspondant.
Adresse e-mail : hsalvator@yahoo.fr (H. Salvator).

0761-8417/$ — see front matter © 2011 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.
doi:10.1016/j.pneumo.2011.01.001

Copyright (Revue de Pneumologie Clinique)
Reproduction interdite sans autorisation

Hopital Foch

Pneumologie clinique
Le poumon et le coeur

N° et date de parution : 674 - 01/09/2011
Diffusion : 1500
Périodicité : Bimestriel
RevuedeP_674_70_311.pdf
Site Web : www.masson.fr
Page : 71
Taille : 100 %
2471 cm2
Press index

KEYWORDS
Obesity;
Influenza A H1N1;
Leptin;
Immunity;
Thrombosis

Summary Pandemic influenza A (H1N1), which occurred during 2009, revealed some unexpected epidemiologic characteristics, notably the high number of obese subjects among the severe cases of influenza. Generally, obesity seems to be associated with a weakness when it comes to respiratory infections. This susceptibility may be the result of a concurrence of mechanical and hormonal factors due to the excess weight. Obesity leads to changes in the ventilatory mechanics and an increase in the metabolic load during exercise. It is associated with immune system changes. Adipokines, cytokines produced by adipocytes, including leptin, play a central role by modulating the activity of all the cells of the immune system. Finally, obesity is associated with an increased risk of thrombosis, which has an adverse effect on the prognosis of infections. All of these observations can explain that obesity has been a risk factor in serious cases of influenza.
© 2011 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Au cours de l'année 2009, un nouveau virus de la grippe A (H1N1) d'origine porcine, recombinaison de trois virus préexistants, a été à l'origine d'une pandémie. Avec quelques mois de recul, le bilan étant moins lourd que redouté, il est reproché l'attitude alarmiste des autorités de santé au cours de l'année précédente. Pourtant cette pandémie grippale a présenté des particularités cliniques et épidémiologiques qui n'étaient pas attendues. Par exemple, elle a touché majoritairement les sujets de moins de 60 ans, contrairement aux épidémies annuelles de grippe saisonnière, ce qui a initié une campagne de vaccination de l'ensemble de la population. L'autre particularité de cette infection grippale A H1N1/2009 a été la sur-représentativité des personnes obèses parmi les cas graves de grippe ayant nécessité des hospitalisations en soins intensifs et parmi les malades décédés. Au cours de cet article, nous détaillerons sur ces particularités épidémiologiques et nous proposerons des hypothèses physiopathologiques pour tenter de comprendre la fragilité respiratoire des sujets obèses.

Grippe A et obésité : données épidémiologiques

Aux États-Unis, entre avril 2009 et avril 2010, les *centers for disease control* (CDC) estiment à 61 millions le nombre de personnes ayant été infectées par le virus H1N1, dont 274 000 hospitalisées et 13 000 décédées. En France, le centre d'épidémiologie sur les causes médicales de décès, CépiDc, a dénombré 349 décès liés à la grippe H1N1 sur la période de juillet 2009 à février 2010. Le taux de létalité a été inférieur à 0,5 % et la variation de son estimation (entre 0,0004 et 1,47 %) reflète de grandes disparités internationales [1].

Les sujets jeunes de moins de 65 ans ont été les plus touchés, représentant 90 % des sujets infectés aux États-Unis. Ils ont représenté également la majorité des personnes hospitalisées, même si le taux de létalité est demeuré plus élevé chez les personnes âgées.

Parmi les populations ayant développé une grippe grave, ont été retrouvés les patients souffrant de pathologies chroniques (respiratoires, cardiovasculaires ou neurologiques) mais 25 à 50 % des sujets hospitalisés ne présentaient aucune comorbidité. Les autres groupes à risque ont été les femmes enceintes (10 % des hospitalisations et des décès) et les personnes obèses.

Dans la majorité des séries de malades atteints de la grippe A H1N1 2009, l'obésité apparaît comme un des facteurs de risque de complications (Tableaux 1—3) [2—12]. Au pic de l'épidémie, les obèses représentaient de 30 à 60 % des patients hospitalisés et plus de 50 % des décès. Ce point n'avait pas été observé au cours des épidémies grippales antérieures, tant celles de grippe saisonnière que des précédentes épidémies dues au virus H1N1 ou lors de la grippe aviaire.

Comment expliquer que parmi les cas graves, près de la moitié des patients soit obèse ? Que sait-on sur la susceptibilité aux infections respiratoires de ces patients et sur leur immunité pulmonaire ?

Une idée assez répandue est de considérer l'obésité comme un facteur en soi d'évolution défavorable en hospitalisation et plus particulièrement en soins intensifs, du fait notamment de leurs comorbidités importantes et des difficultés de prise en charge liées au surpoids. Pourtant les publications sur le sujet sont contradictoires et l'obésité n'est pas associée de façon significative à la mortalité chez les patients présentant un syndrome de détresse respiratoire aiguë [13,14]. L'explication est donc à chercher autre part.

L'obésité : une charge ventilatoire

La dyspnée est une plainte fréquente chez le sujet obèse, probablement multifactorielle mais il est certain que le surpoids est à l'origine de modifications de la mécanique ventilatoire.

L'obésité est responsable d'un syndrome ventilatoire restrictif : abaissement des volumes pulmonaires, notamment la capacité résiduelle fonctionnelle (CRF) et le volume de réserve expiratoire (VRE) [15—17] et la diminution de la compliance pulmonaire [18].

Il semble exister un lien entre obésité et pathologies respiratoires obstructives [19], lien surtout marqué chez la femme et pour des patients asthmatiques [20]. Les études montrent une limitation des débits expiratoires mais celle-ci disparaît ou reste minime lorsqu'ils sont rapportés aux volumes [16—22]. Toutefois, les résistances des voies

Copyright (Revue de Pneumologie Clinique)
Reproduction interdite sans autorisation

Hopital Foch

Pneumologie clinique
le poumon et le coeur

N° et date de parution : 674 - 01/09/2011
Diffusion : 1500
Périodicité : Bimestriel
RevuedeP_674_70_311.pdf
Site Web : www.masson.fr
Press index
Page : 72
Taille : 100 %
2471 cm2

Tableau 1 Caractéristiques des sujets infectés par la grippe A H1N1 hospitalisés.

	Cui et al. [2]	Jain et al. [3]	Louie et al. [4]	Satterwhite et al. [5]
Pays/ville	Shenyang, Chine	États-Unis	Californie	Atlanta
Période	novembre–décembre 2009	avril–juin 2009	avril–août 2009	août–octobre 2009
Nombre de patients hospitalisés	68	272	1088	109
< 18 ans	0	122 (44,8 %)	344 (32 %)	
18–65 ans	67 (99 %)	136 (50 %)	744 (68 %) > 18 ans	
> 65 ans	1 (1 %)	14 (5 %)		
Grossesse	0	18 (7 %)	97/1012 (10 %)	22 (20 %)
Au moins une comorbidité	23 (34 %)	198 (73 %)	741 (68 %)	101 (93 %)
Obésité	22 (32 %)	55/100 (55 %)	172/361 (48 %)	29/69 (42 %)
IMC > 30		29/100 (29 %)	89/361 (24,6 %)	
IMC > 40		26/100 (26 %)	67/361 (18,5 %)	
% obèses dans la population étudiée	7 %	30,6 %	30,6 %	30,6 %

IMC : indice de masse corporelle = taille (m^2)/poids (kg). Comorbidités : pathologies pulmonaires chroniques, cardiovasculaires, neurologiques, hépatiques, insuffisance rénale chronique, obésité et complications métaboliques.

Tableau 2 Caractéristiques des sujets infectés par la grippe A H1N1 hospitalisés en soins intensifs.

	Webb et al. [6]	Kumar et al. [7]	Rello et al. [8]	Dominguez-Cherit et al.[9]
Pays/ville	Australie et Nouvelle-Zélande	Canada	Espagne	Mexico
Période	juin–août 2009	avril–août 2009	juin–juillet 2009	mars–juin 2009
Nombre d'hospitalisations en soins intensifs	722	168	32	58
< 18 ans		50 (29,8 %)	0	2 (3,4 %)
18–65 ans	669 (92,7 %) < 65 ans	118 (70,2 %) > 18 ans	31 (96,9 %)	56 (96,6 %) >18 ans
> 65 ans			1 (3,1 %)	
Grossesse	66 (9,1 %)	13 (7,7 %)	2 (6,3 %)	0
Au moins une comorbidité	493 (68,3 %)	152 (90,4 %)	16 (50 %)	49 (84,5 %)
Obésité	172/601	56 (33,3 %)	10 (31,2 %)	21 (36,2 %)
IMC> 30	IMC > 35 (28,6 %)	28 (16,6 %)	6 (18,7 %)	13 (22,4 %)
IMC > 40		28 (16,6 %)	4 (12,5 %)	8 (14 %)
% obèses dans la population étudiée	20 %	14,9 %	13,1 %	24,2 %

IMC : indice de masse corporelle = taille (m^2)/poids (kg).

aériennes sont augmentées suggérant une atteinte inflammatoire et/ou un remodelage bronchique [17].

À l'effort, la VO_2 est augmentée ainsi que la VO_2 respiratoire (charge métabolique attribuée au travail respiratoire). Cela est illustré par des études peropératoires au cours desquelles la VO_2 basale élevée chute après passage en ventilation assistée [23].

Enfin, l'obésité s'accompagne de troubles du sommeil, principalement de syndrome d'apnée du sommeil. Près de 70 % des sujets présentant des syndromes d'apnée-hypopnée

Copyright (Revue de Pneumologie Clinique)
Reproduction interdite sans autorisation

Pneumologie clinique
Le poumon et le coeur

N° et date de parution : 674 - 01/09/2011
Diffusion : 1500
Périodicité : Bimestriel
RevuedeP_674_70_311.pdf
Site Web : www.masson.fr
Page : 73
Taille : 100 %
2471 cm2
Press index

Tableau 3 Caractéristiques des patients décédés infectés par le virus grippe A H1N1.

	Lee et al. [10]	Rosen et al. [11]	Fajardo-Dolci [12]
Pays/ville	New York	Houston, États-Unis	Mexico
Période	avril–juillet 2009	mars–avril 2009	avril–mai 2009
Nombre de patients décédés	47	8	100
< 18 ans	3 (6,5 %)	1 (12,5 %)	
18–65 ans	42 (90 %)	7 (87,5 %)	
> 65 ans	2 (3,5 %)	0	
Grossesse	2 (4,3 %)	0	
Au moins une comorbidité	37 (79 %)	3 (37,5 %)	50 % ?
Obésité	25 (58,1 %)	8 (100 %)	28/97 (29 %)
IMC > 30	10 (23,3 %)	2 (25 %)	
IMC > 40	15 (34,9 %)	6 (75 %)	
% obèses dans la population étudiée	22	30,6	24,2

IMC : indice de masse corporelle = taille (m^2)/poids (kg).

obstructives du sommeil sont obèses. Certaines séries rapportent que jusqu'à 50 % des sujets obèses présentent ce syndrome. L'autre entité observée est le syndrome obésité-hypoventilation, associant obésité et hypercapnie diurne, conjonction de plusieurs facteurs : contrainte mécanique du surpoids, altération de la commande ventilatoire centrale, et probable effet hormonal lié aux adipokines (cytokines produites par les cellules adipocytaires) [24].

L'obésité : facteurs immunomodulateurs

L'obésité semble être un facteur favorisant les infections respiratoires. Cela est surtout constaté lors des infections nosocomiales, avec dans des séries post-chirurgicales, des taux jusqu'à quatre fois plus importants chez les obèses [25]. Cette association est plus difficile à démontrer lors des infections communautaires. Baik et al. ont montré sur plus de 10 000 sujets que l'obésité et la prise de poids de plus de 20 kilos sur les vingt dernières années étaient directement liées au risque de pneumopathie aiguë communautaire chez les sujets féminins [26]. Existe-t-il une altération du système immunitaire chez ces sujets ?

Chez les sujets obèses, on a montré l'existence d'un état pro-inflammatoire avec une accumulation de macrophages dans le tissu adipeux et une élévation des taux sériques de protéines inflammatoires telle que la CRP [27,28]. Par ailleurs une lymphocytose est observée avec des lymphocytes B et T ayant une diminution de leur réponse proliférative aux mitogènes [29].

Un rôle central est joué par les adipokines, cytokines dont la sécrétion par les cellules adipocytaires est modulée principalement par les apports caloriques. Elles forment un groupe hétérogène parmi lesquelles on retrouve : la leptine, l'adiponectine, la visfatine, la resistine et l'omentine [30]. La leptine est la principale et la plus étudiée. Produite en excès par les adipocytes chez l'obèse, son action principale est de limiter la prise alimentaire en transmettant un signal de satiété au niveau de l'hypothalamus [31]. Chez le sujet obèse, il semble exister un état de « résistance relative » à la leptine, à l'instar de l'insulinorésistance dans le diabète de type 2. Mais la leptine possède de nombreux autres rôles. Elle stimule la prolifération et l'activation des monocytes circulants [32]. Les macrophages activés sont à l'origine de la production de cytokines pro-inflammatoires : IL6, IL1, TNFα [33]. Plusieurs travaux ont suggéré qu'elle pouvait également modifier le phénotype et le profil cytokinique de ces macrophages. En effet, il existe, sur le même modèle que les lymphocytes, au moins deux états de polarisation des macrophages, caractérisés selon leur production cytokinique : M1 et M2. Les macrophages M2 sont plutôt impliqués dans l'immunorégulation et le remodelage tissulaire [34,35]. L'obésité et la prise de poids sont associées à une modification de la répartition des populations de macrophages du tissu adipeux au profit d'un phénotype M1 plus inflammatoire [36,37]. Cela pourrait, au moins en partie, être lié à l'action de la leptine dont les taux sériques augmentent avec le poids.

La leptine régule également l'homéostasie thymique, active la prolifération et la stimulation lymphocytaire et semble favoriser la voie de différenciation lymphocytaire TH1 en augmentant la production d'IFNγ et de TNF [38,39].

L'adiponectine, autre adipokine, dont la production est diminuée chez l'obèse, a un rôle inverse et une action anti-inflammatoire. Elle inhibe la prolifération des lignées myélo-monocytaires, diminue l'action phagocytaire des macrophages, stimule la production de cytokines anti-inflammatoires comme IL-10 [40,41] et induit un switch phénotypique des macrophages de M1 vers M2 [42].

L'obésité module donc de façon majeure le système immunitaire, au moins en partie par le biais de l'action des adipokines, ce qui pourrait favoriser une susceptibilité accrue envers les infections. Plusieurs travaux illustrent cette relation entre surpoids et immunité dans des modèles animaux. Les souris obèses génétiquement modifiées *ob/ob* rendues déficientes en leptine, en présence d'un inoculum

Copyright (Revue de Pneumologie Clinique)
Reproduction interdite sans autorisation

Pneumologie clinique
Le poumon et le cœur

N° et date de parution : 674 - 01/09/2011
Diffusion : 1500
Périodicité : Bimestriel
RevuedeP_674_70_311.pdf
Site Web : www.masson.fr
Press index
Page : 74
Taille : 100 %
2471 cm2

bactérien, présentent une réduction de leur index phagocytaire, un défaut de la clairance bactérienne et une surmortalité [43–45]. Cette fragilité s'exprime aussi face aux infections virales. Expérimentalement, des souris rendues obèses par surnutrition, infectées par le virus de la grippe, présentent une surmortalité rapportée à un défaut de stimulation des cellules mononucléées et cellules NK et à une altération de leur fonction de présentation antigénique [46,47].

L'ensemble des mécanismes n'est pas encore clairement élucidé. Deux hypothèses peuvent être envisagées : la leptine, produite en excès, est-elle responsable d'un emballement du système immunitaire néfaste pour les tissus infectés ou, au contraire, l'état de résistance relative concerne-t-il également les cellules immunitaires qui de ce fait seraient moins efficaces ?

L'obésité : un état prothrombotique

Au cours de l'épidémie de grippe A (H1N1) un nombre important d'embolies pulmonaires ont compliqué l'évolution des patients obèses. L'obésité est connue comme un facteur de risque de thrombose, veineuse ou artérielle. Cela pourrait être expliqué à la fois par l'activation de la coagulation due à l'élévation des taux de facteur tissulaire et par la diminution de la fibrinolyse due à l'élévation des taux de PAI-1 (inhibiteur du plasminogène) [48,49]. Par ailleurs, la leptine favoriserait la thrombose artérielle en stimulant l'agrégation plaquettaire [50]. Cet état prothrombotique vient s'ajouter au dysfonctionnement endothélial propre au sepsis [51].

Conclusion

Les systèmes respiratoire et immunitaire sont influencés par l'obésité. Les adipokines, en modulant la réponse de l'hôte aux pathogènes, semblent jouer un rôle important sur le fonctionnement de l'ensemble des cellules de l'immunité ainsi que sur la régulation de l'hémostase. Cette relation entre masse adipeuse et réponse anti-infectieuse a été responsable de formes graves fréquentes de grippe H1N1 au cours de l'année 2009.

La pandémie de grippe A 2009 a été une source de remise en question de nos connaissances et pratiques médicales. Elle a souligné la complexité des pathologies du sujet obèse et la nécessité d'études fondamentales complémentaires afin d'en cerner les mécanismes. Elle suggère également une adaptation de notre politique de santé publique en individualisant les sujets obèses comme une nouvelle catégorie à risque à laquelle pourrait être proposée une campagne de vaccination ciblée.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

[1] Wilson N, Baker MG. The emerging influenza pandemic: estimating the case fatality ratio. EuroSurveill 2009, 14. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19573509.
[2] Cui W, Zhao H, Lu X, Wen Y, Zhou Y, Deng B, et al. Factors associated with death in hospitalized pneumonia patients with 2009 H1N1 influenza in Shenyang, China. BMC Infect Dis 2010;10:145.
[3] Jain S, Kamimoto L, Bramley AM, Schmitz AM, Benoit SR, Louie J, et al. Hospitalized patients with 2009 H1N1 influenza in the United States, April-June 2009. N Engl J Med 2009;361:1935–44.
[4] Louie JK, Acosta M, Winter K, Jean C, Gavali S, Schechter R, et al. Factors associated with death or hospitalization due to pandemic 2009 influenza A(H1N1) infection in California. JAMA 2009;302:1896–902.
[5] Satterwhite L, Mehta A, Martin GS. Novel findings from the second wave of adult pH1N1 in the United States. Crit Care Med 2010;38:2059–61.
[6] Webb SAR, Pettilä V, Seppelt I, Bellomo R, Bailey M, Cooper DJ, et al. Critical care services and 2009 H1N1 influenza in Australia and New Zealand. N Engl J Med 2009;361:1925–34.
[7] Kumar A, Zarychanski R, Pinto R, Cook DJ, Marshall J, Lacroix J, et al. Critically ill patients with 2009 influenza A(H1N1) infection in Canada. JAMA 2009;302:1872–9.
[8] Rello J, Rodríguez A, Ibañez P, Socias L, Cebrian J, Marques A, et al. Intensive care adult patients with severe respiratory failure caused by Influenza A (H1N1)v in Spain. Crit Care 2009;13:R148.
[9] Domínguez-Cherit G, Lapinsky SE, Macias AE, Pinto R, Espinosa-Perez L, de la Torre A, et al. Critically ill patients with 2009 influenza A(H1N1) in Mexico. JAMA 2009;302:1880–7.
[10] Lee EH, Wu C, Lee EU, Stoute A, Hanson H, Cook HA, et al. Fatalities associated with the 2009 H1N1 influenza A virus in New York city. Clin Infect Dis 2010;50:1498–504.
[11] Rosen DG, Lopez AE, Anzalone ML, Wolf DA, Derrick SM, Florez LF, et al. Postmortem findings in eight cases of influenza A/H1N1. Mod Pathol 2010;23:1449–57.
[12] Fajardo-Dolci G, Gutierrez-Vega R, Arboleya-Casanova H, Villalobos A, Wilson KS, García SG, et al. Clinical characteristics of fatalities due to influenza A (H1N1) virus in Mexico. Thorax 2010;65:505–9.
[13] Goulenok C, Monchi M, Chiche J, Mira J, Dhainaut J, Cariou A. Influence of overweight on ICU mortality: a prospective study. Chest 2004;125:1441–5.
[14] Akinnusi ME, Pineda LA, El Solh AA. Effect of obesity on intensive care morbidity and mortality: a meta-analysis. Crit Care Med 2008;36:151–8.
[15] Jones RL, Nzekwu MU. The effects of body mass index on lung volumes. Chest 2006;130:827–33.
[16] Salome CM, King GG, Berend N. Physiology of obesity and effects on lung function. J Appl Physiol 2010;108:206–11.
[17] Watson RA, Pride NB. Postural changes in lung volumes and respiratory resistance in subjects with obesity. J Appl Physiol 2005;98:512–7.
[18] Pelosi P, Croci M, Ravagnan I, Vicardi P, Gattinoni L. Total respiratory system, lung, and chest wall mechanics in sedated-paralyzed postoperative morbidly obese patients. Chest 1996;109:144–51.
[19] Guerra S, Sherrill DL, Bobadilla A, Martinez FD, Barbee RA. The relation of body mass index to asthma, chronic bronchitis, and emphysema. Chest 2002;122:1256–63.
[20] Beuther DA, Sutherland ER. Overweight, obesity, and incident asthma: a meta-analysis of prospective epidemiologic studies. Am J Respir Crit Care Med 2007;175:661–6.

Copyright (Revue de Pneumologie Clinique)
Reproduction interdite sans autorisation

Pneumologie clinique
le poumon et le coeur

N° et date de parution : 674 - 01/09/2011
Diffusion : 1500
Périodicité : Bimestriel
RevuedeP_674_70_311.pdf
Site Web : www.masson.fr
Press index
Page : 75
Taille : 100 %
2471 cm2

[21] Sin DD, Jones RL, Man SFP. Obesity is a risk factor for dyspnea but not for airflow obstruction. Arch Intern Med 2002;162:1477–81.
[22] Rubinstein I, Zamel N, DuBarry L, Hoffstein V. Airflow limitation in morbidly obese, nonsmoking men. Ann Intern Med 1990;112:828–32.
[23] Kress JP, Pohlman AS, Alverdy J, Hall JB. The impact of morbid obesity on oxygen cost of breathing (VO(2RESP)) at rest. Am J Respir Crit Care Med 1999;160:883–6.
[24] Campo A, Frühbeck G, Zulueta JJ, Iriarte J, Seijo LM, Alcaide AB, et al. Hyperleptinaemia, respiratory drive and hypercapnic response in obese patients. Eur Respir J 2007;30:223–31.
[25] Choban PS, Heckler R, Burge JC, Flancbaum L. Increased incidence of nosocomial infections in obese surgical patients. Am Surg 1995;61:1001–5.
[26] Baik I, Curhan GC, Rimm EB, Bendich A, Willett WC, Fawzi WW. A prospective study of age and lifestyle factors in relation to community-acquired pneumonia in US men and women. Arch Intern Med 2000;160:3082–8.
[27] Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. J Clin Invest 2003;112:1796–808.
[28] Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ, Coppack SW. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999;19:972–8.
[29] Nieman DC, Henson DA, Nehlsen-Cannarella SL, Ekkens M, Utter AC, Butterworth DE, et al. Influence of obesity on immune function. J Am Diet Assoc 1999;99:294–9.
[30] Clément K, Vignes S. Inflammation, adipokines and obesity. Rev Med Interne 2009;30:824–32.
[31] Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. Nature 1998;395:763–70.
[32] Santos-Alvarez J, Goberna R, Sánchez-Margalet V. Human leptin stimulates proliferation and activation of human circulating monocytes. Cell Immunol 1999;194:6–11.
[33] Loffreda S, Yang SQ, Lin HZ, Karp CL, Brengman ML, Wang DJ, et al. Leptin regulates proinflammatory immune responses. FASEB J 1998;12:57–65.
[34] Gordon S. Alternative activation of macrophages. Nat Rev Immunol 2003;3:23–35.
[35] Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. Immunity 2010;32:593–604.
[36] Aron-Wisnewsky J, Tordjman J, Poitou C, Darakhshan F, Hugol D, Basdevant A, et al. Human adipose tissue macrophages: m1 and m2 cell surface markers in subcutaneous and omental depots and after weight loss. J Clin Endocrinol Metab 2009;94:4619–23.
[37] Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. J Clin Invest 2007;117:175–84.
[38] Howard JK, Lord GM, Matarese G, Vendetti S, Ghatei MA, Ritter MA, et al. Leptin protects mice from starvation-induced lymphoid atrophy and increases thymic cellularity in *ob/ob* mice. J Clin Invest 1999;104:1051–9.
[39] Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, Lechler RI. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. Nature 1998;394:897–901.
[40] Yokota T, Oritani K, Takahashi I, Ishikawa J, Matsuyama A, Ouchi N, et al. Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. Blood 2000;96:1723–32.
[41] Wolf AM, Wolf D, Rumpold H, Enrich B, Tilg H. Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. Biochem Biophys Res Commun 2004;323:630–5.
[42] Ohashi K, Parker JL, Ouchi N, Higuchi A, Vita JA, Gokce N, et al. Adiponectin promotes macrophage polarization toward an anti-inflammatory phenotype. J Biol Chem 2010;285:6153–60.
[43] Hsu A, Aronoff DM, Phipps J, Goel D, Mancuso P. Leptin improves pulmonary bacterial clearance and survival in *ob/ob* mice during pneumococcal pneumonia. Clin Exp Immunol 2007;150:332–9.
[44] Mancuso P, Gottschalk A, Phare SM, Peters-Golden M, Lukacs NW, Huffnagle GB. Leptin-deficient mice exhibit impaired host defense in Gram-negative pneumonia. J Immunol 2002;168:4018–24.
[45] Wieland CW, Florquin S, Chan ED, Leemans JC, Weijer S, Verbon A, et al. Pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* infection in leptin-deficient *ob/ob* mice. Int Immunol 2005;17:1399–408.
[46] Smith AG, Sheridan PA, Harp JB, Beck MA. Diet-induced obese mice have increased mortality and altered immune responses when infected with influenza virus. J Nutr 2007;137:1236–43.
[47] Smith AG, Sheridan PA, Tseng RJ, Sheridan JF, Beck MA. Selective impairment in dendritic cell function and altered antigen-specific CD8+ T-cell responses in diet-induced obese mice infected with influenza virus. Immunology 2009;126:268–79.
[48] Samad F, Loskutoff DJ. Tissue distribution and regulation of plasminogen activator inhibitor-1 in obese mice. Mol Med 1996;2:568–82.
[49] Samad F, Pandey M, Loskutoff DJ. Tissue factor gene expression in the adipose tissues of obese mice. Proc Natl Acad Sci U S A 1998;95:7591–6.
[50] Konstantinides S, Schafer K, Loskutoff DJ. The prothrombotic effects of leptin possible implications for the risk of cardiovascular disease in obesity. Ann N Y Acad Sci 2001;947:134–41 [discussion 141-142].
[51] Singer G, Stokes KY, Terao S, Granger DN. Sepsis-induced intestinal microvascular and inflammatory responses in obese mice. Shock 2009;31:275–9.

Copyright (Revue de Pneumologie Clinique)
Reproduction interdite sans autorisation

Discussion de l'article n°1

Dans cette revue, nous avons relevé les résultats de larges études épidémiologiques qui pointent toutes, dans différents pays, l'association entre obésité et complications sévères après infection par le virus de la grippe A H1N1 pendant la pandémie 2009-2010. Ce risque d'infection sévère persiste après ajustement pour les principales comorbidités (diabète, pathologie cardiaque ou respiratoire chronique, immunodépression…) (425) (426). D'autres études et méta-analyses publiées ultérieurement ont confirmé cette association épidémiologique (427) (428). Cela est moins clair en ce qui concerne les autres épidémies grippales saisonnières ; certaines études n'ont pas retrouvé de lien statistique entre surpoids et sévérité de l'infection (429). Cependant, plusieurs facteurs sont à intégrer dans l'analyse statistique, notamment la rapidité de la mise sous traitement antiviral. Dans une large étude dans la ville de Detroit, USA, Segaloff et al. confirment, après ajustement pour le délai de mise sous traitement, que les sujets obèses sont à plus fort risque d'admission en réanimation et d'infections respiratoires basses après une grippe saisonnière (430).

Ces constatations, faites pour la première fois en 2009, ont initié un changement de pratique dans les interventions de prévention sanitaire. En effet, en France, depuis 2010, le Haut Conseil de la Santé Publique recommande la vaccination antigrippale saisonnière chez les femmes enceintes quel que soit le terme de la grossesse et chez les sujets obèses avec un IMC> 40. Cette recommandation continue de faire débat, notamment pour les sujets obèses (431). Ceux-ci semblent en effet présenter une réponse vaccinale nettement moins bonne. Neidich et al. ont montré dans une cohorte observationnelle de 1042 sujets entre 2013 et 2015 que les personnes obèses conservaient, malgré la vaccination, un risque deux fois plus important de développer la grippe qu'un sujet fin (432). Plusieurs études montrent que malgré l'obtention de titres d'anticorps neutralisants corrects, les individus obèses sont toujours plus à risque d'infection sévère (433) (434). L'obésité est associée à une altération de la réponse cellulaire B après vaccination et une augmentation de la production de marqueurs inflammatoires par les lymphocytes B ; des taux élevés de leptine pourraient être en partie responsable de cette dysfonction cellulaire B (435).

De nombreuses publications confirment que la leptine et l'adiponectine comme d'autres adipokines sont des éléments immunorégulateurs essentiels, qui font probablement le lien entre métabolisme énergétique et susceptibilité infectieuse (118) (436). Les cellules épithéliales et les macrophages pulmonaires sont les premières lignes de défense respiratoire et cibles clés des pathogènes, notamment viraux (437) (438). Les variations de concentrations

d’adipokines dans le système respiratoire au cours de l’obésité pourraient retentir sur le fonctionnement des cellules épithéliales et des macrophages pulmonaires et altérer leur réponse aux pathogènes viraux comme la grippe.

Article n°2

Adiponectin inhibits the production of TNF-α, IL-6 and chemokines in human lung macrophages

Adiponectin desactivates human lung macrophages

Hélène Salvator[1,2*], Stanislas Grassin Delyle[2,3], Emmanuel Naline[1,2], Marion Brollo[1], Charlotte Abrial[1], Tatiana Victoni[1], Louis-Jean Couderc[1,2], Philippe Devillier[1,2]

[1] Laboratory of Research in Respiratory Pharmacology–UPRES EA220, UFR Sciences de la Santé Simone Veil, University Paris-Saclay, Suresnes, France.

[2] Department of Respiratory Diseases, Foch Hospital, Suresnes, France.

[3] Mass Spectrometry Platform & INSERM UMR1173, UFR Sciences de la Santé Simone Veil, University Paris Saclay, Montigny-le-Bretonneux, France.

Article soumis à Thorax

Introduction à l'article n°2

La pandémie de grippe A H1N1 en 2009 a mis en exergue la susceptibilité infectieuse des sujets obèses. La fragilité respiratoire de ces sujets était décrite en ce qui concerne les pathologies respiratoires bronchiques (asthme, BPCO), les maladies du sommeil (SAHOS). Quelques études de cohorte avaient également pointé le risque d'infections respiratoires, notamment des pneumonies communautaires (54). Mais la pandémie grippale de 2009 a été un déclencheur dans la prise de conscience de la fragilité des sujets obèses vis-à-vis du risque infectieux respiratoire ; d'autres larges études ont confirmé par la suite cette observation (439) (440).

Comme évoqué dans l'article n°1, l'une des hypothèses pour expliquer l'immunodéficience respiratoire relative des sujets obèses, serait le rôle que jouent les adipokines sur les cellules immunitaires pulmonaires. Les principales adipokines (leptine, adiponectine, visfatine, chémérine, resistine) sont dosables dans les liquides biologiques issus du tractus respiratoire et sur des coupes histologiques pulmonaires humains (256) (237) (441) (442). Dans des modèles murins, elles semblent avoir un rôle dans le développement pulmonaire (443) (444). Les récepteurs de la leptine et adiponectine sont présents à la surface de diverses cellules immunitaires, notamment les monocytes-macrophages et ces adipokines peuvent en moduler le fonctionnement (118) (436).

Les macrophages sont une des premières lignes de défense du système respiratoire. Ils sont essentiels pour phagocyter les pathogènes et particules exogènes et leur état d'activation/polarisation détermine leur spectre de production de cytokines et l'orientation de l'immunité adaptative. Plusieurs publications ont montré l'effet de l'adiponectine sur l'activation des macrophages murins et macrophages dérivés de monocytes humains (407) (408) (409) (410) (411) (445). Si la majorité de ces études pointent un effet plutôt anti-inflammatoire de l'adiponectine, orientant les macrophages vers un état de polarisation M2, quelques études sont contradictoires (412) et aucune ne concerne des macrophages résidents pulmonaires humains.

Afin de se rapprocher au plus de la physiologie humaine, nous avons étudié l'effet de l'adiponectine sur des macrophages au sein du parenchyme pulmonaire humain. De plus, nous avons étudié l'expression des récepteurs de l'adiponectine et analysé sa présence dans les surnageants d'explants de parenchyme.

La production d'adiponectine par les explants de parenchyme a été corrélée à l'IMC des patients. L'effet de différentes formes d'adiponectine recombinante humaine sur les macrophages pulmonaires humains a été exploré, en étudiant la production de cytokines-chimiokines en situation basale et après stimulation M1 par du LPS et du Poly I:C ainsi qu'après stimulation M2 par de l'IL-4. Nous avons aussi étudié l'effet de l'adipoRon, peptide de synthèse agoniste des récepteurs de l'adiponectine.

Adiponectin inhibits the production of TNF-α, IL-6 and chemokines in human lung macrophages

A short title: Adiponectin desactivates human lung macrophages

Hélène Salvator[1,2*], Stanislas Grassin Delyle[2,3], Emmanuel Naline[1,2], Marion Brollo[1], Charlotte Abrial[1], Tatiana Victoni[1], Louis-Jean Couderc[1,2], Philippe Devillier[1,2]

[1] Laboratory of Research in Respiratory Pharmacology–UPRES EA220, UFR Sciences de la Santé Simone Veil, University Paris-Saclay, Suresnes, France.

[2] Department of Respiratory Diseases, Foch Hospital, Suresnes, France.

[3] Mass Spectrometry Platform & INSERM UMR1173, UFR Sciences de la Santé Simone Veil, University Paris Saclay, Montigny-le-Bretonneux, France.

***CORRESPONDING AUTHOR:**

Dr Hélène Salvator

Respiratory Pharmacology Research Laboratory - UPRES EA220

11 rue Guillaume Lenoir

F-92150 Suresnes, France

Telephone: +33-146-252-791

Fax: +33-140-999-657

E-mail: h.salvator@hopital-foch.com

Acknowledgments

The authors thank David Fraser D.Phil (Biotech Communication SARL. Ploudalmezeau, France) for medical writing support.

Funded by grant from Cardif Assistance. The funding source had no involvement in study design, data analysis nor report writing.

Conflict of Interest Statement: The authors declare having no competing interests

Authors contribution

Study conception: H.S., P.D., S.G.D, L.J.C

Experiments and data analysis: H.S., E.N., M.B., C.A., T.V., P.D.

Interpretation of experimental results: H.S, S.D.D., P.D.,

Drafting of the manuscript: H.S., P.D.

ABSTRACT

Introduction: Obesity is associated with an elevated risk of respiratory infections and asthma. The objectives of the present study were to investigate (i) the production of adiponectin by human lung explants, (ii) the expression of the adiponectin receptors AdipoR1 and AdipoR2 by human lung macrophages, and (iii) the impact of recombinant human adiponectin and a small-molecule adiponectin receptor agonist (AdipoRon) on lung macrophage activation.

Methods: Human lung parenchyma explants and lung macrophages were isolated from patients undergoing surgery for carcinoma. The macrophages were cultured with human recombinant adiponectin or AdipoRon and stimulated with LPS (10 $ng.mL^{-1}$), poly(I:C) (10$\mu g.ml^{-1}$) or IL-4 (10 $ng.mL^{-1}$) for 24 h. Cytokines or adiponectin, released by explants or lung macrophages, were measured using ELISAs, and mRNA levels of AdipoR1 and AdipoR2 were determined using real-time quantitative PCR.

Results: Adiponectin is released by lung explants and the amount of adiponectin was negatively correlated with the donor's BMI. AdipoR1 and AdipoR2 were both expressed in human lung macrophages. Adiponectin (3-30 $\mu g.ml^{-1}$) and AdipoRon (25-50 μM) markedly inhibited the LPS- and poly(I:C)-induced release of tumor necrosis factor-α, IL-6 and chemokines (CCL3, CCL4, CCL5, CXCL1, CXCL8, CXCL10) and the IL-4-induced release of chemokines (CCL13, CCL17, CCL22) in a concentration-dependent manner. Recombinant adiponectin produced in mammalian cells (lacking low molecular weight isoforms) had no effects on lung macrophages.

Discussion: The low-molecular-weight isoforms of adiponectin and AdipoRon have potent anti-inflammatory activity on human lung macrophages. Targeting adiponectin receptors may constitute a new means of controlling allergic and microbial inflammations in the airways.

KEYWORDS**: adiponectin, obesity, human lung macrophages, lung, cytokine.**

• **What is the key question ?** Obesity is associated with an elevated risk of respiratory infections and asthma but our understanding of the mechanisms that underlie this association are poorly understood.

• **What is the bottom line ?** We show for the first time that adiponectin is produced by human lung parenchyma at a level inversely correlated with the donor's body mass index and exerts anti-inflammatory activity on human primary lung macrophages.

• **Why read on ?** Targeting adiponectin receptors with inhaled small molecule agonists, such as AdipoRon, may constitute a new pharmacological means of controlling inflammation in the airways, especially in obese patient populations.

ABBREVIATIONS

LM: lung macrophage

MDM: monocyte-derived macrophage

APN: adiponectin

FEV1: forced expiratory volume in one second

FVC: forced vital capacity

BMI: body mass index

TLR: toll-like receptor

AdipoR: adiponectin receptor

1. Introduction

In a worldwide analysis in 2016, it was estimated that about 671 million adults and 124 million children over the age of four were obese, and that a further 1.3 billion adults and 213 million children over the age of four were overweight (1).

Overweight and obesity are associated with an increased risk of noncommunicable diseases such as diabetes mellitus and cardiovascular disease (2). Obesity also constitutes a risk factor for respiratory infections such as pneumonia or severe influenza (3, 4, 5, 6). Epidemiological studies have demonstrated that (i) asthma is more likely to occur in obese individuals, and (ii) obese people with asthma experience more severe symptoms, worse quality of life, and increased healthcare use (7).

Fat tissue acts as an endocrine organ by releasing various bioactive substances referred to collectively as adipokines (8-10). Adiponectin (APN, the most abundant adipokine) is mostly known to deactivate proinflammatory pathways (9, 11). In lean individuals, APN is present in the circulation at high concentrations (~μg/ml) in various oligomeric states. However, circulating levels of APN are lower in obese individuals, and this fall is thought to contribute to obesity-related inflammatory diseases (9, 12).

Macrophages have been recently suggested as a common culprit in obesity and asthma (8). A growing body of evidence suggests that APN modulates macrophage function. Stimulation of toll-like receptor 4 (TLR4) by LPS or TLR3 by poly(I:C) to mimic a bacterial or a viral infection respectively, leads to a classical macrophage activation state (M1) with the production of cytokines (such as tumor necrosis factor-α (TNF-α) and IL-6) and a particular subset of CC and CXC chemokines. The Th2 cytokines (IL-4, IL-13) generate an alternative macrophage activation state (M2) in which a different subset of chemokines is produced (13-15).

Adiponectin's effect on cytokine production by monocytes-macrophages has been examined in nonstimulated or LPS-stimulated preparations. In LPS and interferon-γ (M1)-activated murine bone-marrow-derived macrophages, APN exerted a proinflammatory effect by substantially elevating the expression of TNF-α, IL-6, and IL-12 levels (16). In human monocyte-derived macrophages (MDMs), the results of transcriptional profiling experiments indicated that APN promotes a pro-inflammatory phenotype which resembles M1 more than it does M2 (17). In contrast, experiments in porcine or human MDMs have shown that APN abrogates the LPS-stimulated expression or production of IL-6, TNF-α, CCL2 and CXCL10 (18, 19, 20, 21).

Mouse macrophages and human MDMs are both surrogate cell models that do not adequately recapitulate the biology of human primary LMs. At present, little is known about APN's actions on lung macrophages (LMs) (21, 22). The diametrically opposing effects of APN on different macrophage preparations prompted us to investigate (i) APN production by human lung explants, (ii) the expression of APN receptors on LMs, and (iii) the impact of APN and a recently discovered small-molecule APN receptor agonist (AdipoRon (23)) on the regulation of LM activation by LPS, poly(I:C) or IL-4.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Human recombinant APNs (expressed either in *Escherichia coli* (E.coli) or in human embryonic kidney (HEK) 293 cells) were purchased from Biovendor (Karasek, Czech Republic).

AdipoRon hydrochloride and human recombinant IL-4 (produced in *E.coli*) were acquired from R&D Systems (Lille, France) and solubilized respectively in DMSO and Roswell Park

Memorial Institute 1640 medium (RPMI). Antibiotics, DMSO, L-glutamine, trypan blue dye, heat-inactivated fetal calf serum and LPS (from *E. coli* serotype 0111:B4) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). High-molecular-weight poly(I:C) was obtained from InvivoGen (Toulouse, France). Bovine serum albumin and RPMI medium were from Eurobio Biotechnology (Les Ulis, France).

2.2. Preparations of human lung explants and macrophages.

Experiments on human tissue were approved by the regional investigational review board (*Comité de Protection des Personnes Île de France VIII*, Boulogne-Billancourt, France). Lung tissue samples were obtained from 43 patients (mean ± standard error of the mean (SEM) age: 63.5 ± 1.3 years; 27 males and 16 females; mean ± SEM FEV_1/FVC ratio: 0.72 ± 0.02) undergoing surgical resection for lung carcinoma and who had not received prior chemotherapy. The lung explants and LMs were isolated from macroscopically normal lung parenchyma obtained from sites distant from the tumor, dissected free of pleura, visible airways and blood vessels, and then finely chopped into 3-5 mm^3 fragments, as previously described (24, 25, 26).

After 2 h, 4 h and 24 h of incubation in RPMI at 37°C (in a 5% CO_2 humidified atmosphere), culture supernatants from the explants were collected and stored at -80°C for subsequent APN assays. Lung macrophages were isolated by adherence, as previously described (14). The adherent cells (198 ± 18 × 10^3 cells per well, for a 24-well plate) were >95% pure macrophages, as determined by May-Grünwald-Giemsa staining and CD68 immunocytochemistry. Cell viability exceeded 90%, as assessed by trypan blue dye exclusion. Culture plates with adherent macrophages were washed with warm medium. One

mL of fresh medium supplemented with 1% fetal calf serum was added per well, and culture plates were incubated overnight at 37°C in a 5% CO_2 humidified atmosphere.

2.3.Treatment of LMs and explants

On the day after isolation, macrophages or explants were washed twice, and 1 mL of RPMI was added per well. Classically activated macrophages were obtained by exposure for 24 h to LPS (10 $ng \cdot mL^{-1}$) or poly(I:C) (10 $\mu g \cdot mL^{-1}$), and alternatively activated macrophages were produced by exposure to IL-4 (10 $ng \cdot mL^{-1}$) (14; see Supplemental Data). The lung explants were exposed to the same stimuli as the macrophages. Recombinant APN (3-10-30 $\mu g.ml^{-1}$) or AdipoRon (5-10-25-50 µM) was added to the culture medium one hour before exposure to LPS, poly(I:C) or IL-4. The APN concentrations were originally chosen to reflect human plasma concentrations (3-30 $\mu g.ml^{-1}$) (12, 27, 28). In control experiments, the vehicle used for AdipoRon (0.1% DMSO) did not alter cytokine production. Following 24 h of incubation, supernatants were collected and stored at -80°C for subsequent analysis.

2.4. Cytokine and APN assays.

The supernatants' cytokine concentrations were measured with an ELISA (R&D Systems), according to the manufacturer's instructions. The limits of detection are indicated in the Supplementary Material. The supernatants were diluted with RPMI as appropriate, and the optical density was determined at 450 nm using a microplate reader (MRX II, Dynex Technologies, Saint-Cloud, France). Cytokine concentrations are expressed in $ng.10^{-6}$ LMs.

The APN levels were measured with an ELISA (R&D Systems; detection range: 62.5 – 4000 $pg.ml^{-1}$). Cytotoxicity was determined by measuring lactate dehydrogenase activity in LM supernatants (Cayman Chemical, MI, USA).

2. 5. Quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction

Lung macrophages were stimulated (or not) for 24 h with LPS, poly(I:C) or IL-4. The RNA was prepared as previously described (supplementary material). Specific TaqMan® arrays based on predesigned reagents (*AdipoR1*: Hs01114951_m1; *AdipoR2*: Hs00226105_m1, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) were used to analyze AdipoR1 and AdipoR2 transcripts. Reverse transcriptase-quantitative polymerase chain reaction was performed using Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher Scientific) with 20 ng of cDNA in a StepOnePlus thermocycler (Thermo Fisher Scientific). 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 coding for hypoxanthine phosphoribosyltransferase (*HPRT1*: Hs99999909_m1) was used for signal normalization.

2. 6. Statistical analysis.

Data are expressed as the mean ± SEM per 10^6 macrophages or per 100 mg lung explant obtained from *n* patients. The concentration-effect curves were analyzed using GraphPad Prism® software (version 5.01, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Intergroup comparisons of APN concentrations were performed with unpaired t-tests, and the relationship with BMI was estimated by calculating Spearman's correlation coefficient. The effects of various concentrations of APN and AdipoRon on cytokines levels released by LMs were compared using a repeated measures ANOVA, followed by Bonferroni's post-test or Friedman test, followed by Dunns post-test, as appropriate. The threshold for statistical significance was set to $p < 0.05$.

3. Results

3. 1 Production of APN by human lung explants

The mean ± SEM APN concentration in the supernatant above nonstimulated explants (n=30 patients) after 24 h was 185.0±127.3 $ng.mL^{-1}$ per 100 mg of tissue. After adjustment for the volumes of the culture medium (3 ml) and the explant (100 mg ≈ 0.1 mL), this corresponded to a concentration of APN about 6.1 $\mu g.g^{-1}$ of lung tissue (i.e. close to the blood concentration). Neither LPS, poly(I:C) nor IL-4 altered APN production.

Time-course measurements of the APN concentration in explant supernatants highlighted an increase over time, and suggested that APN was released by the tissue (Figure 1).

In contrast, APN was not detected in LM supernatants - suggesting that these macrophages were not involved in the release of APN by the explants. The APN concentrations were negatively correlated with the explant donor's BMI (Figure 1).

- **3. 2 Expression of APN receptors on human LMs**

- An RT-PCR analysis demonstrated that LMs expressed both AdipoR1 and AdipoR2 at the mRNA level. Unstimulated LMs expressed AdipoR1 more strongly than AdipoR2. The expression of both AdipoR1 and AdipoR2 transcripts was enhanced after exposure to LPS for 24 hours, whereas exposure to poly(I:C) only enhanced the expression of AdipoR2. In contrast, IL-4 did not alter the transcription of either APN receptor (Figure 2).

-

3. 3 Adiponectin and AdipoRon abrogate the LPS- and poly(I:C)-induced production of cytokines by LMs.

3.3.1 LPS- and poly(I:C)-induced cytokine production by LMs

Incubation with LPS or poly(I:C) during 24h was associated with markedly greater production of various M1 cytokines (Supplemental data, Table S1). Exposure to LPS was associated with greater production of IL-6, CXCL1, and CXCL8, whereas exposure to poly(I:C) was associated with greater production of CXCL10. Conversely, LPS and poly(I:C) did not alter (or only weakly altered) the production of the M2 chemokines CCL13, CCL17, and CCL22 (data not shown) (14).

3.3.2 APN abrogates the LPS- and poly(I:C)-induced production of cytokines by LMs

With nonstimulated LMs, APN from *E. coli* led to a weak, non-significant relative decrease in the production of cytokines. Adiponectin inhibited both LPS- and poly(I:C)-stimulated cytokine production in a concentration-dependent manner (Figure 3). At a concentration of 30 $\mu g.ml^{-1}$, APN inhibited cytokine production by more than 90%, except for TNF-α and CXCL8 (Figure 4). A submaximal concentration (10 $\mu g.ml^{-1}$) of APN had similar effects on the LPS- and poly(I:C)-induced production of cytokines, with the exception of CXCL8. Although APN (10 $\mu g.ml^{-1}$) markedly inhibited the LPS-induced CXCL8 production, it did not change the poly(I:C)-induced CXCL8 production. At the highest concentration (30 $\mu g.ml^{-1}$), the poly(I:C)-induced CXCL8 production was inhibited by APN.

Furthermore, APN (30 $\mu g.ml^{-1}$) was associated with a 70% relative reduction in the LPS-induced production of IL-10 (Supplementary Data).

3.3.3 Effects of various recombinant APNs on the LPS-induced production of cytokines by LMs

In addition to human recombinant APN produced in *E. coli*, we tested recombinant APN produced in HEK293 cells (Biovendor). The main difference between the two was the presence high-molecular-weight (HMW) isoforms (more than hexameric) in the HEK293

APN. The APN expressed in *E. coli* lacks the characteristic post-translational modifications of eukaryotic APN and particularly fails to form HMW multimers (29). When tested on nonstimulated and LPS-stimulated LMs, APN from HEK293 cells was devoid of effects on the production of TNF-α, CXCL8, CCL4, or IL-6 at concentrations up to 30 $\mu g.mL^{-1}$ (n=4).

A mutant APN (C39A: alanine substituted for cysteine at position 39) expressed in HEK293 cells (Biovendor) forms trimers but not hexamers or HMW isoforms [28]. At 30 $\mu g.mL^{-1}$, the mutant APN did not alter the production of cytokines by nonstimulated or LPS-stimulated LM (n=3). This latter result agrees with previous reports on human blood monocytes and U937 monocytic cells (30, 31).

We also compared the activity of several batches of APN produced in *E. coli* (Biovendor). One batch clearly differed in its low-molecular-weight (LMW) isoform content (Supplemental Data, figure S1) and was devoid of inhibitory activity on LPS-induced cytokine production. Only the batches containing the LMW isoforms (used in the present study) inhibited the LPS-induced production of cytokines. As a whole, these findings suggest that APN's anti-inflammatory activity can be ascribed to its LMW isoforms - probably the hexamers.

3.3.4 AdipoRon abrogates the LPS-induced production of cytokines by LMs

At a concentration of 50 µM, AdipoRon led to a weak, non-significant relative decrease in the basal production of cytokines by LMs (Supplemental Data). AdipoRon also inhibited LPS- and poly(I:C)-induced cytokine production in a concentration-dependent manner, although inhibition was significant only at the highest concentration (50 µM) (Figure 4). This concentration of AdipoRon is known to activate the APN receptors in myotubes to the same extent as APN does (23). As also observed with APN, AdipoRon was less effective in inhibiting poly(I:C)-induced CXCL8 production.

The inhibitory effects of AdipoRon (50 μM) did not differ significantly from those of APN (30 μg.mL^{-1}).

3.4. Adiponectin and AdipoRon abrogate the IL-4-induced release of cytokines by human LMs.

Incubation with IL-4 was associated with the elevated production of the M2-chemokines CCL13 (basal: 20±14 pg.mL^{-1}; +IL-4: 273±160 pg.mL^{-1}, a 66-fold increase), CCL17 (basal: 4.0±2.0 pg.mL^{-1}; +IL-4: 46±25 pg.mL^{-1}, a 13-fold increase) and CCL22 (basal: 1.6±0.5 ng.mL^{-1}; +IL-4: 4.4±1.6 ng.mL^{-1}, a 4-fold increase).

Both APN and AdipoRon inhibited IL-4-stimulated chemokine production in a concentration-dependent manner (Figure 5).

4. Discussion

The present study is the first to have demonstrated that (i) APN is produced by human lung explants and correlated with the donor's BMI, (ii) both AdipoR1 and AdipoR2 are expressed by human LMs, and (iii) both APN and the small-molecule agonist AdipoRon reduce the LPS-/poly(I:C)- and the IL-4-induced release of cytokines by LMs.

In patients with asthma, sputum levels of APN were found to be elevated after an allergen challenge (32). Adiponectin has been also detected in bronchial alveolar lavage (BAL) and bronchial washes after a segmental allergen challenge or in BAL from women with asthma or patients with COPD (33, 34, 35, 36). The APN concentrations in BAL samples were several magnitudes lower than those found in the serum, which probably reflects the dilution of lung fluids by the BAL process. However, APN was one of the most strongly expressed cytokines in BAL, as detected by a cytokine array or an ELISA (34, 36). It has been suggested that most of the adipokines in BAL or bronchial washing has diffused from the bloodstream, although other researchers have reported disparities between serum and BAL concentrations of APN

(33, 35). This disparity might be due to the active transport of circulating APN multimers (which might not pass freely through the pulmonary vasculature into the alveolar space) (37) or by local synthesis of APN (independently of the blood concentration). In the present study, we showed that APN is produced by human lung explants but not by latter's constituent LMs. In the lung, APN may be synthesized by the epithelial cells, as suggested by the high levels of APN expressed by the human lung A549 epithelial cell line (34) although the involvement of other cell types cannot be ruled out. Adiponectin is not the only adipokine synthetized by the lung, since leptin is reportedly synthetized by bronchial epithelial cells and alveolar type II pneumocytes (38, 39).

It is widely accepted that serum APN levels are positively associated with age and female gender, and negatively associated with BMI (12, 27, 28). However, BAL levels of APN were seen to be weakly and negatively associated with BMI in a small sample of patients with asthma and healthy controls (33). This weak association may reflect variations in the diluting effect of the BAL. In contrast, we also found a clear association between APN concentrations in the supernatants of explants and the donor's BMI – suggesting that lung APN production is related to BMI. After taking account of dilution in the culture medium, the estimated APN concentration in lung tissue is close to the range found in the blood (5-20 $\mu g.ml^{-1}$) and to the concentrations of recombinant APN found to inhibit cytokine production by LMs. Hence, physiological concentrations of APN may have an anti-inflammatory effect.

The expression of the APN receptors AdipoR1 and AdipoR2 has been previously reported on murine macrophage-like cells (RAW264) (40), human blood monocytes (16, 41), MDMs (17), and the THP-1 cell line (16). In the present study, we showed for the first time that human LMs express both APN receptors. Unstimulated LMs expressed AdipoR1 more strongly than AdipoR2 – as also reported in human monocytes (16, 41). The activation of mouse bone marrow or peritoneal macrophages by interferon-γ/LPS was associated with

downregulation of AdipoR1/R2 transcription (16); this contrasted with the upregulation observed in human LMs activated by LPS. Hence, APN receptor expression appears to be regulated differently in LPS-activated mouse macrophages vs. human LMs. Activation of murine macrophages by IL-4 or IL-10 was associated with (i) weak downregulation of or no change in AdipoR1 expression, and (ii) upregulation of or no change in AdipoR2 expression (16). In human LMs activated by IL-4, AdipoR1 mRNA levels did not vary and AdipoR2 mRNA levels rose.

Previous research has shown that incubation of nonstimulated primary human monocytes or MDMs with recombinant APN produced in mammalian cells is associated with elevated mRNA and/or protein levels of M1 and M2 cytokines such as TNF-α and IL-6, and the chemokines CCL2, -3, -4, and -5, and CCL23 (17, 42). The C-terminal globular fragment of APN has been shown to activate nuclear factor-κB and to increase the production of TNF-α, IL-6 and/or CXCL8 in the U937 monocytic cell line and THP-1 macrophages (43, 30). In sharp contrast, incubation of nonstimulated LMs with recombinant APN from *E. coli* (present study) did not increase the production of TNF-α, IL-6, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL8 or CCL22. Adiponectin's HMW isoforms have been shown to activate NF-κB signaling in THP-1 cells and human primary monocytes and thus induce the production of IL-6, CXCL-8 and CCL2 (30, 31, 44). The differences in composition (LMW vs. HMW isoforms) between recombinant APNs are unlikely to explain the different effects on nonstimulated monocytic cells and LMs, since APN produced in HEK293 cells (containing HMW isoforms) was not associated with the production of cytokines by LMs (the present study). Moreover, the synthetic APN receptor agonist AdipoRon did not induce the production of cytokines by nonstimulated LMs. Therefore, the absence of APN-associated pro-inflammatory effect on LMs is probably due to differences in the cell types rather than in the effects of LMW vs.

HMW isoforms. Indeed, monocytes and MDM are surrogate cell models that do not adequately recapitulate the biology of LM - as recently demonstrated in our laboratory (45).

We also showed for the first time that APN from E. coli exerts an anti-inflammatory effect on human LMs by decreasing the production of cytokines induced by LPS, poly(I:C) or IL-4. In previous research, eukaryotic recombinant APN was found to have an anti-inflammatory effect (i) in the human THP-1 monocytic cell line (by repressing several TNF-α-induced proinflammatory genes, including cytokines such as CXCL-8 (16)), (ii) in the U-937 monocytic cell line (by inhibiting LPS-induced NF-κB activity (30)), (iii) in human monocytes or MDMs (by either suppressing the expression or production of LPS-induced cytokines such as TNF-α, IL-6, CXCL9-11 (19, 44, 46)). Although APN expressed in HEK293 cells inhibited TNF-α and IL-6 production in MDMs (46), it is noteworthy that this type of eukaryotic recombinant APN did not suppress LPS-induced cytokine production in the present study. It is worth noting that HMW-APN did not suppress LPS-induced IL-6 secretion in human monocytes and THP-1 cells while LMW-APN reduced LPS-mediated IL-6 release (44). Furthermore, mouse recombinant APN produced in *E. coli* inhibited the LPS-mediated release of TNF-α by mouse alveolar macrophages (22). The results of our experiments on batches of APN from *E. coli* that differed with respect to the LMW isoform profile suggested that the latter parameter is involved in APN's anti-inflammatory effect in LMs. Furthermore, the observed inhibitory effect of AdipoRon on LPS-, poly(I:C) and IL-4- induced cytokine production confirmed that APN receptor activation has anti-inflammatory effects on LMs.

Adiponectin has been shown to stimulate IL-10 expression and production by human blood monocytes and MDMs (44, 46). However, antagonism of IL-10 did not abrogate APN's anti-inflammatory actions - indicating that the inhibition of cytokine production in response to various proinflammatory stimuli does not require IL-10 (46). In contrast to APN's stimulatory effect on MDMs, APN decreased the LPS-induced production of IL-10 by LMs in the present

study. The reasons for this discrepancy remain unclear, although the simplest explanation is that we used human LMs and the previous studies used human monocytes or MDMs (44, 46). Our present findings indicate that LMW APN may act to maintain LMs in a quiescent state and thus protect the lung from dysregulated macrophage activation (Figure 6). The results also suggest that the reduction in APN levels associated with an elevated BMI might be a risk factor for the development of inflammatory lung diseases. Asthma associated with obesity is a growing public health problem for which there are few effective treatments (47). The activation of APN receptors with inhaled small molecule agonists may constitute a new pharmacological means of controlling inflammation in the airways and managing chronic pulmonary diseases (such as asthma and COPD) more effectively particularly in obese patients and also in non-obese patients.

References

1. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128•9 million children, adolescents, and adults. Lancet 2017 16;390(10113):2627-2642.
2. GBD 2015 Obesity Collaborators, Afshin A, Forouzanfar MH, Reitsma MB, Sur P, Estep K, Lee A et al. Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. N Engl J Med 2017;377:13–27.
3. Baik I, Curhan GC, Rimm EB, Bendich A, Willett WC, Fawzi WW. A prospective study of age and lifestyle factors in relation to community-acquired pneumonia in US men and women. Arch Intern Med 2000;160:3082–3088.
4. Salvator H, Devillier P, Rivaud E, Catherinot E, Honderlick P, Couderc L-J. Obesity, poor prognostic factor in pandemic influenza A (H1N1) 2009: the role of adipokines in the modulation of respiratory defenses. Rev Pneumol Clin 2011;67:244–249.
5. Morgan OW, Bramley A, Fowlkes A, Freedman DS, Taylor TH, Gargiullo P et al. Morbid obesity as a risk factor for hospitalization and death due to 2009 pandemic influenza A(H1N1) disease. PLoS ONE 2010;5:e9694.
6. Van Kerkhove MD, Vandemaele KAH, Shinde V, Jaramillo-Gutierrez G, Koukounari A, Donnelly CA et al. Risk factors for severe outcomes following 2009 influenza A (H1N1) infection: a global pooled analysis. PLoS Med 2011;8:e1001053.
7. Sutherland ER. Linking obesity and asthma. Ann N Y Acad Sci 2014;1311:31–41.
8. Sharma N, Akkoyunlu M, Rabin RL. Macrophages-common culprit in obesity and asthma. Allergy. 2018;73:1196–1205.
9. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. Nat Rev Immunol 2011;11:85–97.
10. De Oliveira Leal V, Mafra D. Adipokines in obesity. Clinica Chimica Acta 2013 18;419:8794
11. Ohashi K, Shibata R, Murohara T, Ouchi N. Role of anti-inflammatory adipokines in obesity related diseases. Trends Endocrinol Metab 2014;25:348–355.
12. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J et al. Paradoxical decrease of an adipose specific protein, adiponectin, in obesity. 1999. Biochem Biophys Res Commun 2012;425:560-564.

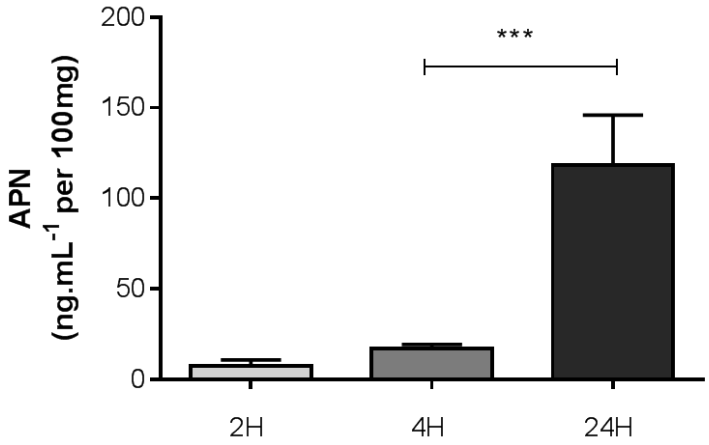
13. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdt S et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. Immunity 2014;41:1420.
14. Abrial C, Grassin-Delyle S, Salvator H, Brollo M, Naline E, Devillier P. 15 Lipoxygenases regulate the production of chemokines in human lung macrophages. Br J Pharmacol 2015;172:4319–4330.
15. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. J Cell Physiol. 2018;233:6425–6440
16. van Stijn CMW, Kim J, Lusis AJ, Barish GD, Tangirala RK. Macrophage polarization phenotype regulates adiponectin receptor expression and adiponectin anti-inflammatory response. FASEB J 2015;29:636–649.
17. Cheng X, Folco EJ, Shimizu K, Libby P. Adiponectin induces pro-inflammatory programs in human macrophages and CD4+ T cells. J Biol Chem 2012;287:36896–36904.
18. Yokota T, Oritani K, Takahashi I, Ishikawa J, Matsuyama A, Ouchi N et al. Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. Blood 2000;96:1723–1732.
19. Okamoto Y, Folco EJ, Minami M, Wara AK, Feinberg MW, Sukhova GK et al. Adiponectin inhibits the production of CXC receptor 3 chemokine ligands in macrophages and reduces T lymphocyte recruitment in atherogenesis. Circ Res 2008;102:218–225.
20. Wulster-Radcliffe MC, Ajuwon KM, Wang J, Christian JA, Spurlock ME. Adiponectin differentially regulates cytokines in porcine macrophages. Biochem Biophys Res Commun 2004;316:924–929.
21. Ohashi K, Parker JL, Ouchi N, Higuchi A, Vita JA, Gokce N et al. Adiponectin promotes macrophage polarization toward an anti-inflammatory phenotype. J Biol Chem 2010;285:6153–6160.
22. Summer R, Little FF, Ouchi N, Takemura Y, Aprahamian T, Dwyer D et al. Alveolar macrophage activation and an emphysema like phenotype in adiponectin-deficient mice. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2008;294:L1035-1042.
23. Okada-Iwabu M, Yamauchi T, Iwabu M, Honma T, Hamagami K, Matsuda K et al. A small molecule AdipoR agonist for type 2 diabetes and short life in obesity. Nature 2013;503:493 499.

24. Buenestado A, Grassin Delyle S, Arnould I, Besnard F, Naline E, Blouquit-Laye S et al. The role of adenosine receptors in regulating production of tumour necrosis factor-alpha and chemokines by human lung macrophages. Br J Pharmacol 2010;159:1304–1311.
25. Buenestado A, Grassin-Delyle S, Guitard F, Naline E, Faisy C, Israël-Biet D et al.Roflumilast inhibits the release of chemokines and TNF-α from human lung macrophages stimulated with lipopolysaccharide. Br J Pharmacol 2012;165:1877–1890.
26. Buenestado A, Chaumais M-C, Grassin-Delyle S, Risse P-A, Naline E, Longchampt E et al. Roflumilast inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-α and chemokine production by human lung parenchyma. PLoS ONE 2013;8:e74640.
27. Lindberg S, Mogelvang R, Pedersen SH, Bjerre M, Frystyk J, Flyvbjerg A et al. Relation of serum adiponectin levels to number of traditional atherosclerotic risk factors and all-cause mortality and major adverse cardiovascular events (from the Copenhagen City Heart Study). Am J Cardiol 2013;111:1139–1145.
28. Lindberg S, Jensen JS, Bjerre M, Frystyk J, Flyvbjerg A, Jeppesen J et al. Low adiponectin levels at baseline and decreasing adiponectin levels over 10 years of follow-up predict risk of the metabolic syndrome. Diabetes Metab 2017;43:134–139.
29. Tsao T-S, Murrey HE, Hug C, Lee DH, Lodish HF. Oligomerization state-dependent activation of NF-kappa B signaling pathway by adipocyte complement-related protein of 30 kDa (Acrp30). J Biol Chem 2002;277:29359–29362.
30. Haugen F, Drevon CA. Activation of nuclear factor-kappaB by high molecular weight and globular adiponectin. Endocrinology 2007;148:5478–5486.
31. Song H, Chan J, Rovin BH. Induction of chemokine expression by adiponectin in vitro is isoform dependent. Transl Res 2009;154:18–26.
32. Biagioni BJ, Pui MM, Fung E, Wong S, Hosseini A, Dybuncio A et al. Sputum adiponectin as a marker for western red cedar asthma. J Allergy Clin Immunol 2014;134:1446-1448.e5.
33. Holguin F, Rojas M, Brown LA, Fitzpatrick AM. Airway and plasma leptin and adiponectin in lean and obese asthmatics and controls. J Asthma 2011;48:217–223.
34. Miller M, Cho JY, Pham A, Ramsdell J, Broide DH. Adiponectin and functional adiponectin receptor 1 are expressed by airway epithelial cells in chronic obstructive pulmonary disease. J Immunol 2009;182:684–691.
35. Kramer MM, Hirota JA, Sood A, Teschke K, Carlsten C. Airway and serum adipokines after allergen and diesel exposure in a controlled human crossover study of atopic adults. Transl Res 2017;182:49–60.

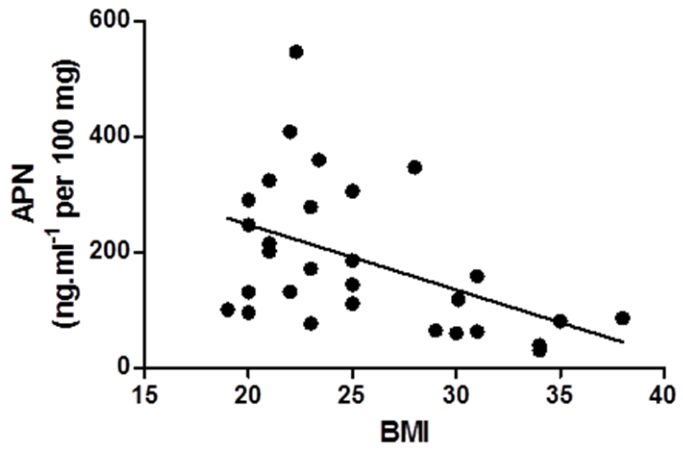
36. Sideleva O, Suratt BT, Black KE, Tharp WG, Pratley RE, Forgione P et al. Obesity and asthma: an inflammatory disease of adipose tissue not the airway. Am J Respir Crit Care Med 2012;186:598–605.
37. Sood A. Obesity, adipokines, and lung disease. J Appl Physiol 2010;108:744–753.
38. Vernooy JHJ, Drummen NEA, van Suylen RJ, Cloots RHE, Möller GM, Bracke KR et al. Enhanced pulmonary leptin expression in patients with severe COPD and asymptomatic smokers. Thorax 2009;64:26–32.
39. Bruno A, Pace E, Chanez P, Gras D, Vachier I, Chiappara G et al. Leptin and leptin receptor expression in asthma. J Allergy Clin Immunol 2009;124:230–237, 237.e1–4.
40. Yamaguchi N, Argueta JGM, Masuhiro Y, Kagishita M, Nonaka K, Saito T et al. Adiponectin inhibits Toll-like receptor family-induced signaling. FEBS Lett 2005;579:6821-6826.
41. Kollias A, Tsiotra PC, Ikonomidis I, Maratou E, Mitrou P, Kyriazi E et al. Adiponectin levels and expression of adiponectin receptors in isolated monocytes from overweight patients with coronary artery disease. Cardiovasc Diabetol 2011;10:14.
42. Neumeier M, Bauer S, Brühl H, Eisinger K, Kopp A, Abke S et al. Adiponectin stimulates release of CCL2, -3, -4 and -5 while the surface abundance of CCR2 and -5 is simultaneously reduced in primary human monocytes. Cytokine 2011;56:573–580.
43. Tsatsanis C, Zacharioudaki V, Androulidaki A, Dermitzaki E, Charalampopoulos I, Minas V et al. Adiponectin induces TNF-alpha and IL-6 in macrophages and promotes tolerance to itself and other pro-inflammatory stimuli. Biochem Biophys Res Commun 2005;335:1254 1263.
44. Neumeier M, Weigert J, Schäffler A, Wehrwein G, Müller-Ladner U, Schölmerich J et al. Different effects of adiponectin isoforms in human monocytic cells. J Leukoc Biol 2006;79:803–808.
45. Victoni T, Salvator H, Abrial C, Brollo M, Porto LCS, Lagente V et al. Human lung and monocyte-derived macrophages differ with regard to the effects of β2-adrenoceptor agonists on cytokine release. Respir Res 2017;18:126.
46. Folco EJ, Rocha VZ, López-Ilasaca M, Libby P. Adiponectin inhibits pro-inflammatory signaling in human macrophages independent of interleukin-10. J Biol Chem 2009;284:25569–25575.
47. Umetsu DT. Mechanisms by which obesity impacts upon asthma. Thorax 2017;72:174–177.

Leegends of figures

Figure 1: Production of APN by lung explants

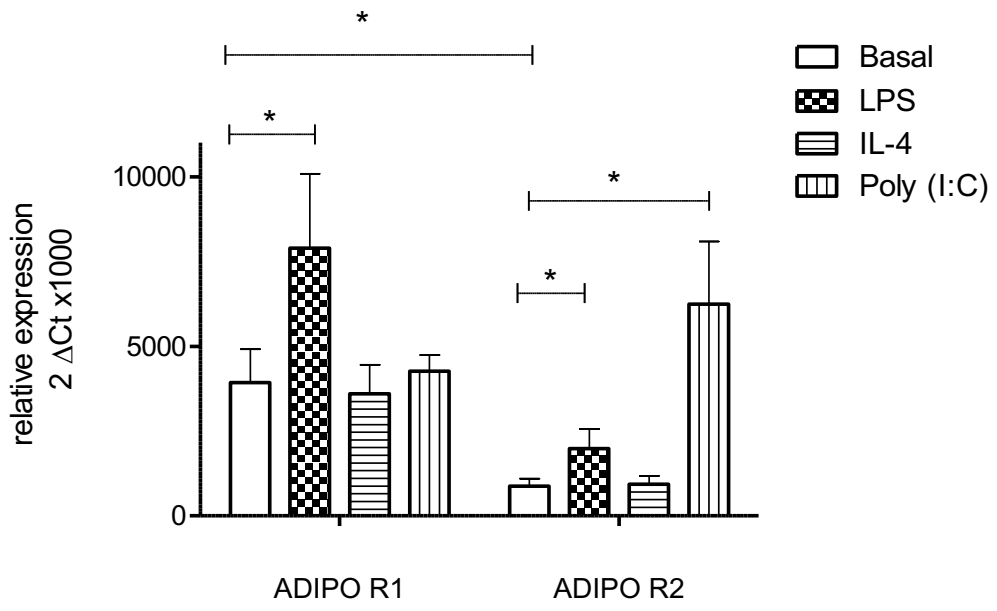


a) The time course of APN release from lung explant supernatants. Nonstimulated human lung explants were cultured for 2, 4 and 24 h, and the APN concentration in the supernatant was measured using an ELISA (expressed $ng.ml^{-1}$ per 100 mg of lung tissue). Data are reported as the mean ± SEM of 3 to 11 independent experiments. Inter-class comparisons were performed with a non-parametric paired t-test. ***; $p<0.001$.



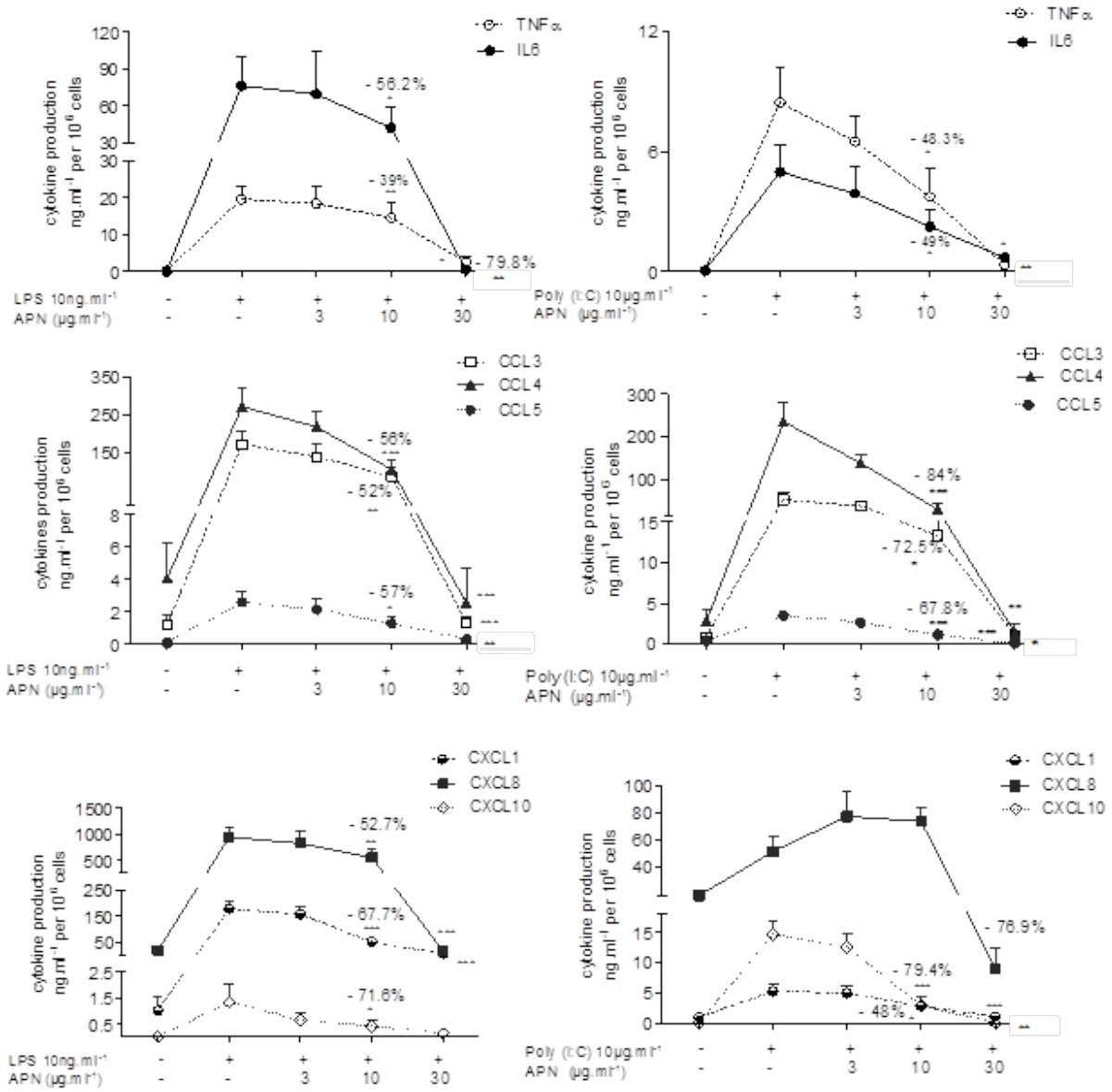
b) APN production in lung explant is reduced in patients with elevated BMI. Nonstimulated human lung explants from 30 patients were cultured for 24 h, and the APN concentration in the supernatant (expressed in $ng.ml^{-1}$ per 100 mg of lung tissue) was measured using an ELISA. The relationship between the APN concentration and the donor's BMI was assessed by calculating Spearman's correlation coefficient ($r = -0.48$; $p=0.008$).

Figure 2: **AdipoR1 and AdipoR2 are expressed by human LMs**



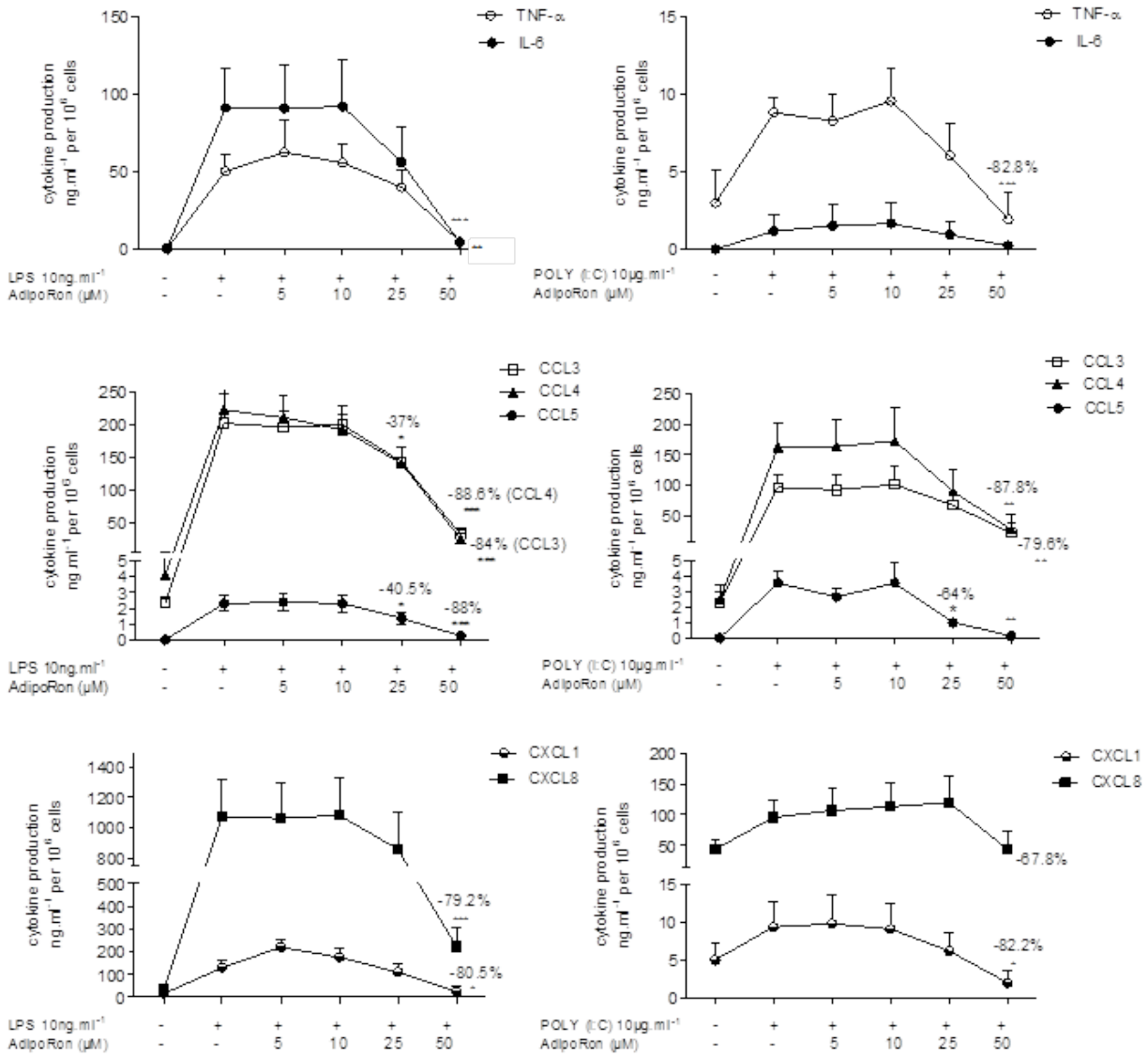
Human LMs were cultured for 24 h in absence or presence of LPS (10 ng.ml^{-1}), poly(I:C) (10 µg.ml^{-1}) or IL-4 (10 ng.ml^{-1}). AdipoR1 and AdipoR2 transcript levels were determined by RT-qPCR and normalized against those of a housekeeping gene (*HPRT1*). Data correspond to the mean ± SEM of six independent experiments. *: $p<0.05$.

Figure 3: Inhibition by APN of the LPS- or poly(I:C)-induced cytokine production by human LMs



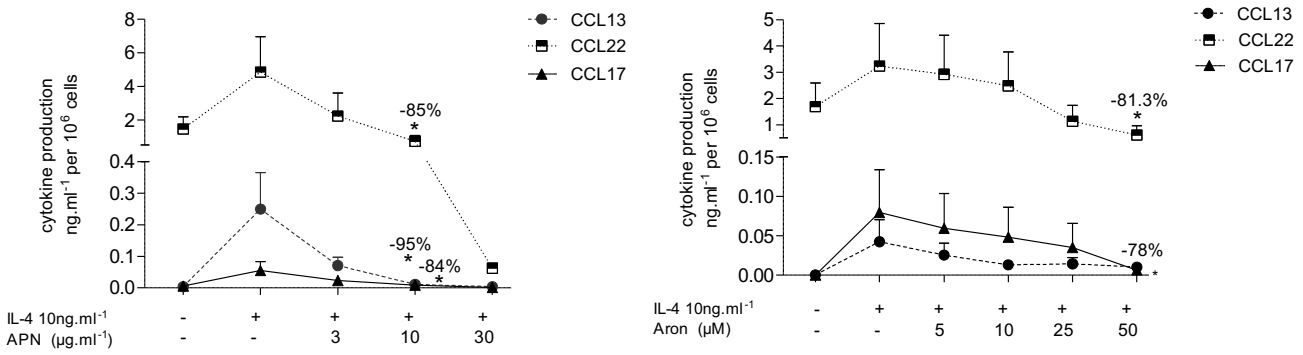
Macrophages were incubated with LPS (10 ng.ml^{-1}, left column) or poly(I:C) (10 µg.ml^{-1}, right column) in the absence or presence of APN (3, 10 or 30 µg.ml^{-1}) for 24 h. Data are expressed in ng.10^{6} cells and as a percentage reduction with respect to LPS or poly(I:C) alone. For greater clarity, the percentage reductions of more than 90% at 30 µg.ml^{-1} are not shown. Results are shown as the mean ± SEM of 4 to 15 different experiments. Asterisks indicate significant effects of APN with respect to LPS or poly(I:C) alone: *: $p<0.05$; **: $p<0.01$; ***: $p<0.001$.

Figure 4: Inhibition by AdipoRon of the LPS-/poly(I:C)-induced cytokine production by human LMs.



Macrophages were incubated with LPS (10 ng.mL^{-1}, left column) or poly(I:C) (10 µg.ml^{-1}, right column) in the absence or presence of AdipoRon (5, 10, 25, and 50 µM). Data are expressed in ng.10^6 cells and as a percentage reduction with respect to LPS or poly(I:C) alone. For greater clarity, the percentage reductions of more than 90% at 30 µg.ml^{-1} are not shown. Results are shown as the mean ± SEM of 4-8 different experiments. Asterisks indicate significant effects of AdipoRon with respect to LPS or poly(I:C) alone: *: $p<0.05$; **: $p<0.01$; ***: $p<0.001$.

Figure 5: Inhibition by APN and AdipoRon of the IL-4-induced chemokine production by human LMs.



Macrophages were incubated in the absence or presence of APN (3, 10 or 30 µg.ml^{-1}) or AdipoRon (5, 10, 25 or 50 µM) before being stimulated with IL-4 (10 ng.mL^{-1}) for 24 h. Cell culture supernatants were collected and analyzed using ELISAs. Data are expressed in ng.10^{6} cells and as a percentage reduction with respect to IL-4 stimulation alone. For greater clarity, the percentage reductions of more than 90% at 30 µg.ml^{-1} are not shown. Results are shown as the mean ± SEM of 4 or 5 different experiments. Asterisks indicate significant effects with respect to IL-4 alone: *: $p<0.05$.

Supplemental data

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site

Preparation of human lung explants

Human lung parenchyma was prepared after several washes of finely chopped parenchymal fragments in complete culture medium (RPMI 1640, supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 $\mu g.ml^{-1}$ streptomycin, and 100 $U.ml^{-1}$ penicillin), in order to prevent contamination by blood. The explants were maintained overnight at 4°C. The fragments (total weight ~50-100 mg each) were distributed into six-well plates (five fragments and 5 mL of complete medium per well).

Preparation of lung macrophages

Lung macrophages (LMs) were isolated by adherence, as previously described [1]. Briefly, the fluid collected from several washings of peripheral lung tissues was centrifuged (2000 rpm for 10 min). The cell pellet was resuspended in RPMI supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 2 mM L-glutamine and antibiotics. Resuspended viable cells (106 per mL) were then aliquoted into either a 12-well plate for transcriptional assays or a 24-well plate for cytokine assays. Following incubation for at least 1.5 hours at 37°C in a 5% CO2 humidified atmosphere, non-adherent cells were removed by gentle washing. The remaining cells were maintained at 37°C and 5% CO2 overnight. It has been shown that the adherence step does not significantly influence the overall transcriptional changes in alveolar macrophages, relative to flow-cytometry-based isolation [2].

Preparation of RNA

Total RNA was prepared using TRIzol® reagent (Life Technologies, Saint Aubin, France), according to the manufacturer's instructions. The RNA's intactness was determined by

running an aliquot of each sample on an ExperionTM automated electrophoresis station (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Next, 1 µg of total RNA was reverse-transcribed using SuperScript® III First-strand SuperMix kit (Life Technologies) prior to analysis with specific TaqMan® arrays.

Activation of human lung macrophages

Lung macrophages were activated by exposure to lipopolysaccharide (LPS), poly(I:C) or interleukin (IL)-4. The LPS concentration (10 $ng.mL^{-1}$) was selected as suboptimal on the basis of time-response and concentration-response curves from preliminary experiments [3]. The poly(I:C) concentration (10 $\mu g.mL^{-1}$) was chosen on the basis of preliminary experiments in which it elicited much the same level of cytokine production as LPS 10 $ng.mL^{-1}$. Activated macrophages were produced by exposure to a 10 $ng.mL^{-1}$ IL-4; this concentration was chosen on the basis of (i) literature data from human macrophage models [4, 5] and (ii) preliminary experiments in our laboratory [6].

Limits of detection for cytokine ELISAs

The limit of detection was 4 $pg.mL^{-1}$ for CCL3, 8 pg.ml-^{1} for CCL17, CCL13 and CCL22, 16 $pg.mL^{-1}$ for TNF-α, CCL2, CCL5 and CCL4, and 32 $pg.mL^{-1}$ for CXCL1, CXCL8 and CXCL10.

LPS- and poly(I:C)-induced cytokine production by LMs

Incubation with LPS or poly(I:C) during 24h was associated with markedly greater production of various M1 cytokines (Table S1)

Table S1. Effects of LPS and poly(I:C) on the production of M1 cytokines by human LMs.

Cytokines	*Baseline values ng/10^6 LMs*	*With LPS 10 ng/mL*	*With Poly(I:C) 10 µg/mL*	*Fold-change*		
				LPS	*Poly(I:C)*	*LPS vs. poly(I:C)*
CCL3	1.0 ± 0.5	191.3 ± 57.5*	71.9 ± 14.5*	125	77	ns
CCL4	4.1 ± 2.1	197.5 ± 0.4*	199.1 ± 30. 4*	97	98	ns
CCL5	0.07 ± 0.05	2.6 ± 0.8*	3.5 ± 0.3*	118	185	ns
TNF-α	0.13 ± 0.1	19.5 ± 3.9 ***	8.4 ± 1.8*	332	86	ns
IL-6	0.35 ± 0.18	81.3 ± 17.1***	3.5 ± 1.1*	2392	138	*
CXCL1	8.5 ± 4.0	155.6 ± 22.9***	7.09 ± 1.6*	184	7	**
CXCL8	23.0 ± 2.9	989.6 ± 152.8***	70.7 ± 15.5*	49	2.1	***

The data are reported as the mean ± SEM of 5 to 16 independent experiments. * indicates a significant difference relative to the baseline condition or a significant difference between LPS and poly(I:C) (*: $p<0.05$; **: $p<0.01$; ***: $p<0.001$).

Inhibitory effect of APN on LPS-induced production of IL-10

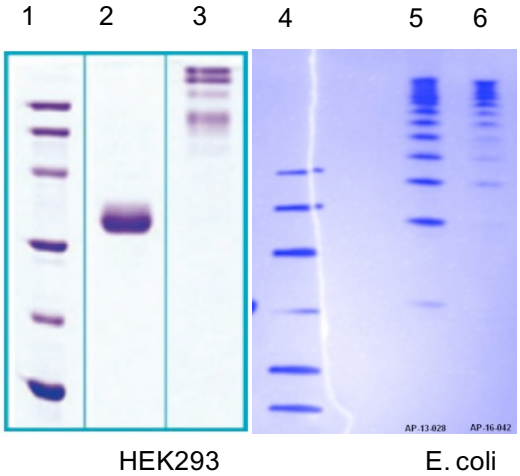
Lipopolysaccharide treatment was associated with elevated IL-10 production (mean ± SEM: 1245 ± 328 pg.ml^{-1}). The IL-10 production was reduced by APN at 10 µg.ml^{-1} (682 ± 320 pg.ml^{-1}, -52%; $p<0.05$) and 30 µg.ml^{-1} (502 ± 349 .ml^{-1}, -70%; $p< 0.01$).

Effect of AdipoRon on cytokine release by unstimulated lung macrophages

AdipoRon at 50 µM caused a non-significant inhibition (Friedman test followed by Dunns test) of the production of IL-6, CCL3, CXCL-1 and CXCL-8 by unstimulated LMs

(mean±SEM in the absence vs. presence of AdipoRon 50µM, and mean percentage reduction in 4 to 6 independent experiments): IL-6: 950±420 pg.ml^{-1} vs. 294±176 pg.ml^{-1}, -69%; CCL3: 2.29±0.22 ng.ml^{-1} vs 1.83±0.3 ng.ml^{-1}; -15.5%; CXCL1: 21.5±12.6 ng.ml^{-1} vs. 8.5±6.4 ng ml^{-1}, -61%; CXCL8: 39.3±7.8 ng.ml^{-1} vs. 30.1±6.4 ng.ml^{-1}, -25%.

Figure S1. Composition of batches of Adiponectin, considering their content in different isoforms



Under non reducing conditions, fractions with HMW, hexameric, and trimeric APN migrate in part as a dimer with an intense band at ~ 60 kDa, suggesting that the large isoforms of APN are unstable during SDS-PAGE [7, 8]

4-20% SDS-PAGE separation of human adiponectin provided by the producer (Biovendor):

Column 1 and 4: Molecular weight markers - 14, 21, 31, 45, 66, 97 kDa

Column 2: APN produced in HEK293, reduced and boiled sample, 2.5 µg/lane

Column 3: APN produced in HEK293, non-reduced and non-boiled sample, 2.5 µg/lane

Column 5: APN produced in *E. coli* batch AP-13-028, non-reduced and non-boiled sample, 2.5 µg/lane

Column 6: APN produced in *E. coli* batch AP-16-042, non-reduced and non-boiled sample, 2.5 µg/lane

The adiponectin produced in HEK293 was inactive or weakly active on LMs.

E. coli batch AP-13-028 was active on LM

E. coli batch AP-16-042 was inactive on LM

References of supplemental data

[1] Buenestado A, Grassin Delyle S, Arnould I, Besnard F, Naline E, Blouquit-Laye S et al. The role of adenosine receptors in regulating production of tumour necrosis factor-alpha and chemokines by human lung macrophages. Br J Pharmacol. 2010 Mar;159(6):1304-11

[2] Shaykhiev R, Krause A, Salit J, Strulovici-Barel Y, Harvey B-G, O'Connor TP et al. Smoking-dependent reprogramming of alveolar macrophage polarization: implication for pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. J Immunol Baltim Md 1950. 2009 Aug 15;183(4):2867-83

[3] Buenestado A, Chaumais M-C, Grassin-Delyle S, Risse P-A, Naline E, Longchampt E et al. Roflumilast inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-α and chemokine production by human lung parenchyma. PloS One. 2013 Sep 16;8(9):e74640

[4] Pechkovsky DV, Prasse A, Kollert F, Engel KMY, Dentler J, Luttmann W et al. Alternatively activated alveolar macrophages in pulmonary fibrosis-mediator production and intracellular signal transduction. Clin Immunol Orlando Fla. 2010 Oct;137(1):89-101

[5] Staples KJ, Hinks TSC, Ward JA, Gunn V, Smith C, Djukanović R. Phenotypic characterization of lung macrophages in asthmatic patients: overexpression of CCL17. J Allergy Clin Immunol. 2012 Dec;130(6):1404-12.e7.

[6] Abrial C, Grassin-Delyle S, Salvator H, Brollo M, Naline E, Devillier P. 15-Lipoxygenases regulate the production of chemokines in human lung macrophages. Br J Pharmacol. 2015 Sep;172(17):4319-30

[7] Pajvani UB, Du X, Combs TP, Berg AH, Rajala MW, Schulthess T et al. Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity. J Biol Chem 2003 Mar 14;278(11):90

[8] Haugen F, Drevon CA. Activation of nuclear factor-kappaB by high molecular weight and globular adiponectin. Endocrinology. 2007 Nov;148(11):5478-86

Résultats complémentaires de l'article n°2

1° Caractérisation de la forme d'adiponectine produite au niveau pulmonaire

L'adiponectine est produite sous différentes formes : forme globulaire, monomère de forme longue ou multimères de plus ou moins haut poids moléculaire. La conformation de la protéine dépend des modifications post transcriptionelles qui ont lieu dans le réticulum endoplasmique et qui déterminent sa structure tridimensionnelle ainsi que les interactions entre monomères. La forme de haut poids moléculaire (environ 200 kDa) semble prédominante dans la circulation car moins sensible aux enzymes protéolytiques (446) ; elle est également plus importante en proportion chez la femme que chez l'homme (447) (448). Waki et al. ont été capables de séparer en Western Blot (SDS-page et immunomarquage) les différentes isoformes présentes dans du sérum humain. Les résultats dépendent des conditions expérimentales puisque le chauffage et les réactifs utilisés pour la réduction modifient la structure tridimensionelle de l'adiponectine (Figure 23). En condition réductrice et chauffage, seule le monomère à 28-30 kDa apparaît. L'utilisation soit du chauffage seul soit des réducteurs seuls, sélectionne les formes dimères-trimères vers 60 kDa. Enfin, la condition non réductrice sans chauffage permet de faire apparaître les formes de plus haut poids moléculaire au-delà de 100k Da (448).

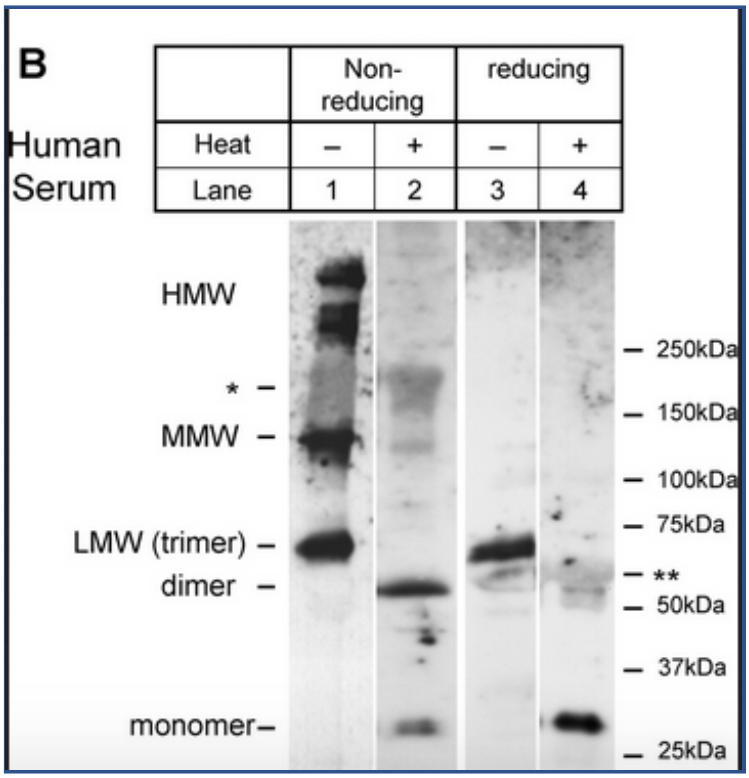


Figure 23. Isoformes d'adiponectine présente dans du sérum humain.

D'après Waki et al. J biol chem 2003 (448)

Séparation des isoformes par SDS-PAGE puis immunoempreinte.

Le tampon pour les conditions réductrices était constitué de 3% de SDS, 50 mm de Tris-HCl pH 6,8, de 5% de 2-mercaptoéthanol et de 10% de glycérol. Pour la réduction complète de l'échantillon de sérum, du dithiothréitol de 10 mm a également été ajouté au tampon. Pour les conditions non réductrices, le 2-mercaptoéthanol a été exclu du tampon d'échantillon décrit ci-dessus. L'échantillon a été mélangé avec un tampon d'échantillon 5 x et incubé pendant 1 heure à la température ambiante. Pour la dénaturation thermique, les échantillons ont été chauffés à 95 ° C pendant 10 min, sauf indication contraire.

Par contre, il y a très peu de données sur la proportion des isoformes d'adiponectine au sein des tissus, notamment pulmonaire. Chez la souris, la forme de haut poids moléculaire prédomine dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire (255). Chez l'homme, les concentrations d'adiponectine dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire ne sont pas corrélées à celles dans le sang (256). Il pourrait y avoir une disparité concernant la proportion des isoformes d'adiponectine entre la circulation sanguine et le poumon. Cela pourrait

s'expliquer par des propriétés de modifications post-transcriptionnelles spécifiques au poumon ou encore par un transport sélectif d'une isoforme en particulier de la circulation sanguine vers le poumon.

Dans nos expériences, nous avons mis en évidence une production locale d'adiponectine par le parenchyme pulmonaire humain. Nous avons tenté d'identifier les isoformes en présence.

Pour cela, nous avons recueilli des extraits protéiques issus de broyat de parenchyme pulmonaire séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS puis immunomarquage (voir matériel et méthodes). Deux gels de concentrations différentes d'acrylamide ont été utilisés (un gel de concentration de 5 à 12% et un gel de concentration 10%) pour permettre le dépôt de protéines de haut poids moléculaire. Plusieurs conditions ont été étudiées : dénaturation par du 2βmercapto-éthanol à 5% et / ou à 70°C pendant 10 minutes et sans dénaturation de la protéine (ni 2βmercapto-éthanol ni chauffage). Les résultats obtenus à partir de parenchyme pulmonaire ont été comparés à ceux issus de sérum de donneurs volontaires (Figure 24).

Que ce soit dans le sérum ou dans le poumon, en condition dénaturante, nous avons obtenu deux bandes bien différenciées à 18 et 30 kDa, ce qui correspondrait à la forme globulaire et au monomère d'adiponectine, respectivement. Une bande moins nette semble apparaître aux alentours de 60 kDa, qui correspondrait au trimère d'APN.

Par contre, nous avons échoué à mettre en évidence, dans le sérum et dans le poumon, des formes de plus haut poids moléculaires en utilisant des conditions non dénaturantes. Ceci est en contradiction avec les publications précédentes dans le sérum humain.

La sensibilité de notre technique est à remettre en cause, la qualité du gel ne permettant peut-être pas de faire migrer des protéines de haut poids moléculaire, même si nous avons utilisé deux gels de mailles différentes. Ces expériences seront à compléter en séparant les constituants protéiques par une étape préalable de chromatographie d'élution.

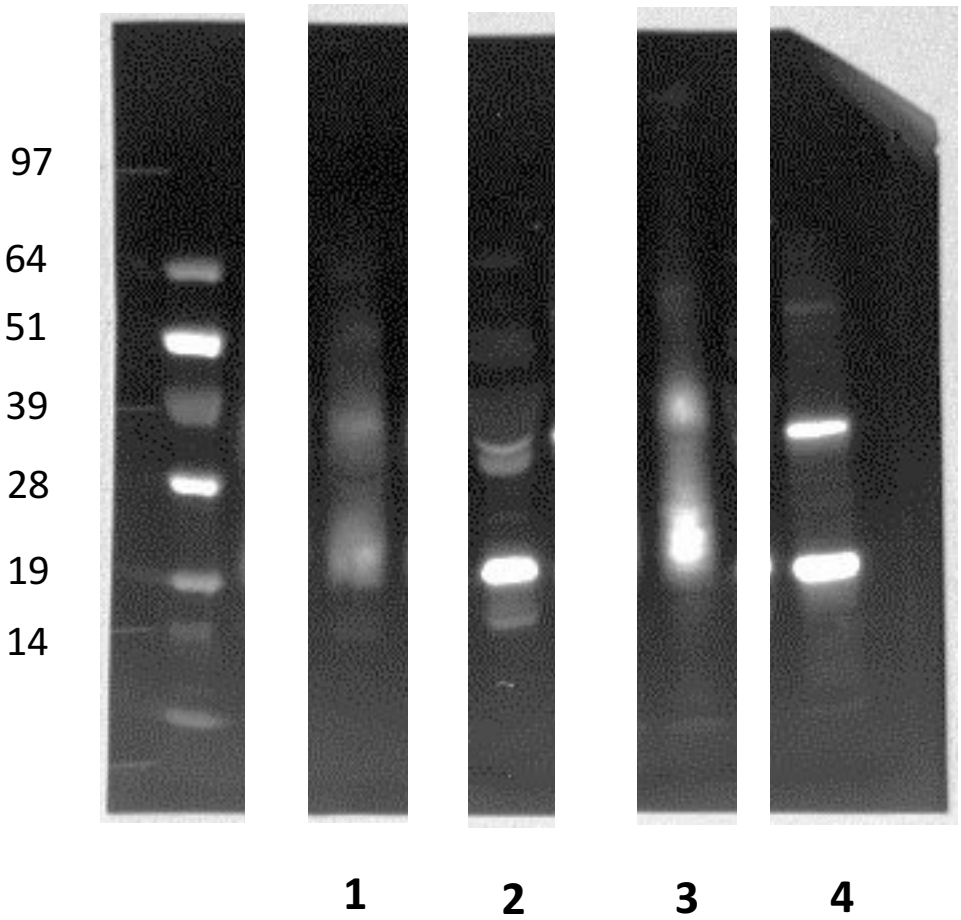


Figure 24. Isoformes d'adiponectine dans du sérum (colonnes 1 et 2) et dans du parenchyme pulmonaire humain (colonnes 3 et 4), séparées par électrophorèse SDS-page + immunomarquage en conditions dénaturantes (colonnes 2 et 4) et non dénaturantes (colonnes 1 et 3).

Colonnes 1 : Western Blot (WB) à partir de broyat de parenchyme pulmonaire en condition non dénaturante (sans chauffage ni traitement par 2βmercapto-éthanol)

Colonne 2 : WB à partir de parenchyme pulmonaire en condition dénaturante (chauffage + 2βmercapto-éthanol)

Colonne 3 : WB à partir de sérum humain en condition non dénaturante (sans chauffage ni traitement par 2βmercapto-éthanol)

Colonne 4 : Colonne 2 : WB à partir de sérum humain en condition dénaturante (chauffage + 2βmercapto-éthanol)

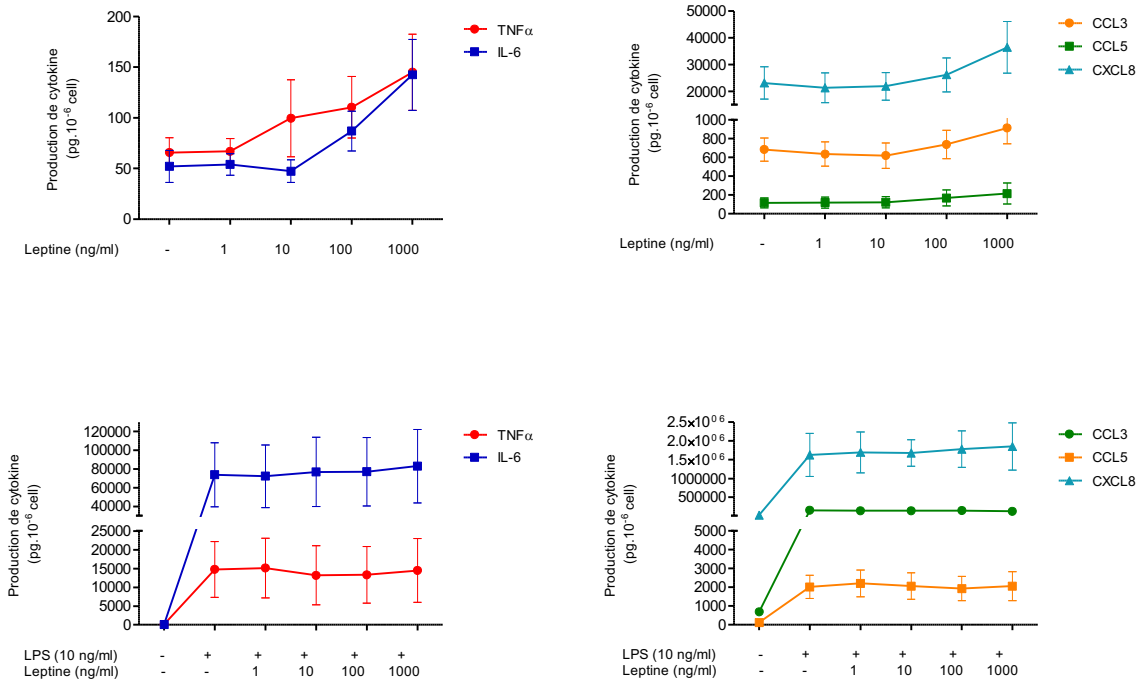
2° Effet des autres adipokines sur la polarisation des macrophages pulmonaires humains

Nous avons cherché à évaluer les effets d'autres adipokines sur la production de cytokines par des macrophages pulmonaires. Nous nous sommes intéressés aux adipokines qui semblent impliquées dans les phénomènes inflammatoires respiratoires : leptine, visfatine, chémérine.
Comme décrit dans l'introduction générale, les effets de ces adipokines sur les monocytes-macrophages sont discordants et varient selon la préparation cellulaire étudiée.
Dans un premier temps, nous avons mesuré la concentration de ces trois adipokines dans les surnageants de parenchyme pulmonaire (n=10). Les concentrations étaient mesurées à

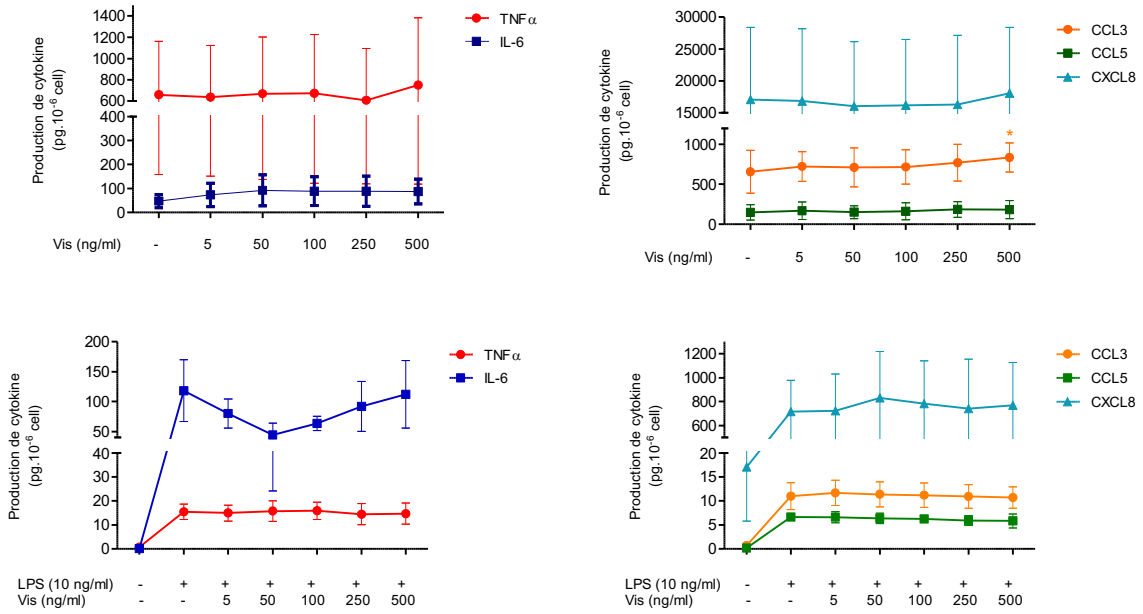
- leptine : 0,31±0.05 ng/ml pour 100 mg parenchyme, soit une concentration estimée à 9,3 ng/g tissu interstitiel (après ajustement au volume de culture (3ml) et de l'explant (100mg=0,1ml)).
- chémérine : 17,2±1,6 ng/ml pour 100 mg parenchyme soit 516 ng/g tissu interstitiel.
- visfatine : 5,4±0,4 ng/ml pour 100 mg parenchyme soit 162 ng/g tissu interstitiel.

Ces concentrations étaient bien moins importantes que celle de l'adiponectine (6,1 µg/ml). De toutes les adipokines étudiées, seule la visfatine était dosable dans les surnageant de macrophages pulmonaires humains.
La leptine a montré un effet stimulant sur la production de TNF-α, IL-6, CCL3, CCL5, CXCL8 à l'état basal mais seulement pour la plus forte concentration utilisée (1000 ng/ml) (Figure 25). Au vue des concentrations sériques connues de leptine et celle mesurée dans les parenchymes pulmonaires humains, cette concentration de 1000 ng/ml ne parait pas correspondre à une situation physiologique. Par ailleurs la leptine n'avait aucun effet sur la production induite par le LPS de ces mêmes cytokines.
De même, nous n'avons retrouvé aucun effet de la visfatine ni de la chémérine sur la production des cytokines par les macrophages pulmonaires humains non stimulés ou stimulés par du LPS (Figure 25).

A


Production de cytokine (pg.10-6 cell)
TNFα
IL-6
Leptine (ng/ml) - 1 10 100 1000
CCL3
CCL5
CXCL8
LPS (10 ng/ml) - + + + + +
Leptine (ng/ml) - - 1 10 100 1000

B


Production de cytokine (pg.10-6 cell)
TNFα
IL-6
Vis (ng/ml) - 5 50 100 250 500
CCL3
CCL5
CXCL8
LPS (10 ng/ml) - + + + + + +
Vis (ng/ml) - - 5 50 100 250 500

C

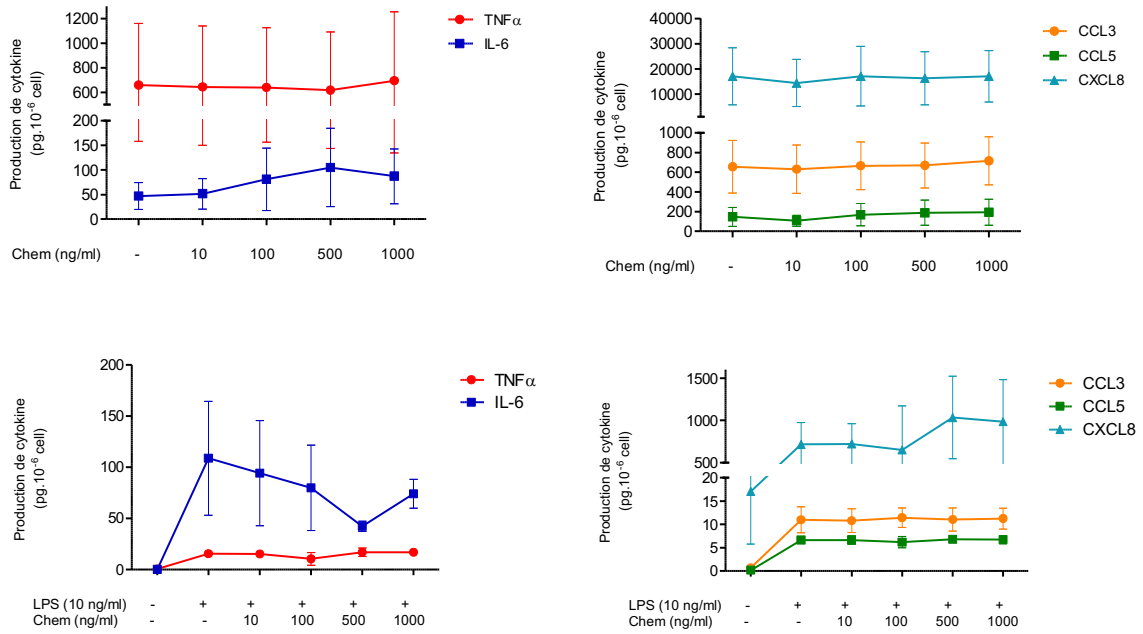


Figure 25. Production de TNF-α, IL-6, CCL3, CCL5, CXCL8 par des macrophages pulmonaires humains en présence de leptine (A), visfatine (B) et chémérine (C) +- LPS

Après 24h de culture, les macrophages pulmonaires (n=3-6) étaient traités par de la leptine (1-1000 ng/ml), de la chémérine (10-1000 ng/ml) ou de la visfatine (5-500 ng/ml). Une heure après était ajouté le LPS à la concentration de 10 ng/ml. Les surnageants étaient récupérés après 24h de culture en présence de ces traitements et les concentrations de cytokines-chimiokines étaient mesurées par dosage ELISA.

* p< 0,05 ** p<0,01 ***p< 0,001

3° Rôle respectif des récepteurs de l'adiponectine

Les deux principaux récepteurs à l'adiponectine sont AdipoR1 et AdipoR2, auxquels se rajoute la T-cadhérine qui peut fixer l'APN à la surface de certaines cellules (157) (158).

Même s'ils ont une expression ubiquitaire, AdipoR1 et R2 présentent quelques spécificités d'expression et d'affinité, en fonction du type de tissu étudié. AdipoR1 est par exemple plus exprimé dans le muscle squelettique et AdipoR2 majoritaire dans le foie. AdipoR1 présente

une affinité forte pour la forme globulaire d'adiponectine alors que AdipoR2 lie indifféremment forme globulaire et forme longue.

L'expression et le rôle relatif des récepteurs d'APN dans le tissu pulmonaire humain sont très peu connus. Dans notre modèle, nous avons montré que les deux récepteurs étaient exprimés par des macrophages pulmonaires humains, AdipoR1 étant le plus abondant des deux. L'expression d'AdipoR1 comme celle d'AdipoR2 étaient stimulées par le LPS (voir résultats article n°2 Figure 2).

En complément, nous avons étudié leur rôle respectif dans l'effet inhibiteur de l'APN sur la production LPS-induite de cytokines par les macrophages pulmonaires. Pour cela, nous avons inactivé successivement ou de façon concomitante chacun des deux récepteurs par des siRNA spécifiques (voir matériel et méthodes). Pour chaque expérience comprenant un siRNA, la réduction d'expression du récepteur considéré a été vérifiée par RT-qPCR.

L'APN à 10 µg/ml a un effet inhibiteur sur la production LPS-induite de TNF-α, CCL2, CCL3, CXCL1 et CXCL8. Lorsque l'on inactive AdipoR1, l'effet inhibiteur d'APN persiste sur la sécrétion LPS-induite de TNF-α et CCL2 ; par contre il disparait lorsque l'on inactive AdipoR2 ou AdipoR1+R2 (Figure 26). Ceci suggérerait que l'effet inhibiteur d'APN passe par AdipoR2. Cependant les résultats ne sont pas les mêmes en ce qui concerne la production de CCL3, CXCL1 et CXCL8, qui reste inhibée quel que soit le type de récepteur inactivé. Par ailleurs, la production de ces cytokines reste inhibée même en cas d'inactivation concomitante d'AdipoR1+R2, ce qui suggère probablement que les siRNA ne permettent de réduire suffisamment le nombre des récepteurs pré-exprimés à la membrane dans les délais expérimentaux ou peut-être l'implication d'un autre type de récepteur (T-cadhérine ?) (Figure 26).

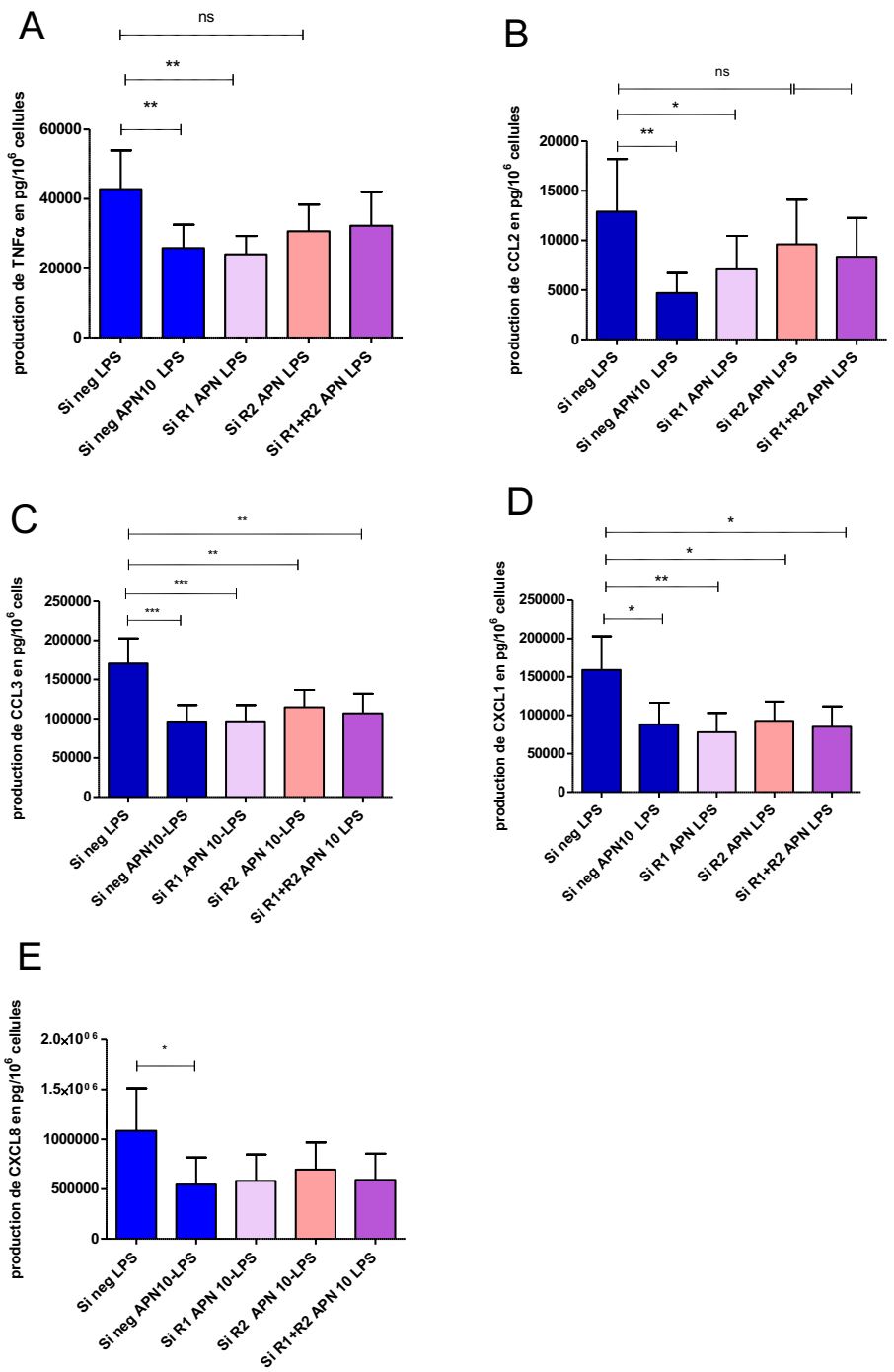


Figure 26. Dosage des cytokines-chimiokines TNF-α (A), CCL2 (B), CCL3 (C), CXCL1 (D), CXCL8 (E) dans les surnageants de macrophages transfectés par des siRNA AdipoR1 et AdipoR2

Une solution contenant un minimum de 5.10^6 macrophages a été reprise dans 100 µL de la solution Nucleofector® II supplémentée de 300 nM de siRNA spécifique du gène cible (Si RNA AdipoR1, Si RNA AdipoR2) ou d'un contrôle négatif appelé « Si neg ». Le programme de transfection appliqué aux macrophages est défini par l'Amaxa® Human Macrophage

Nucleofector® Kit. Une fois la transfection réalisée, les macrophages sont repris et cultivés dans du RPMI complet à 10% de SVF). Le lendemain, ont été ajoutés de l'adiponectine à 10 µg/ml puis du LPS (10 ng/ml) 1 heure après. Les surnageants et cellules ont été récupérés pour dosages ELISA des cytokines-chimiokines après 24h de culture.
Résultats exprimés en pg/10^6 macrophages, moyenne +- sem de 4 à 7 expériences indépendantes.
* $p< 0,05$ ** $p<0,01$ ***$p< 0,001$

Discussion de l'article n°2

Dans cette étude, nous avons exploré le rôle des adipokines (adiponectine, leptine, visfatine et chémérine) dans la régulation de l'activité des macrophages pulmonaires.
L'originalité principale de ce travail est d'utiliser un modèle humain de macrophages différenciés dans un environnement tissulaire pulmonaire. Ceci permet de se rapprocher au plus près de la physiologie humaine, car il existe des différences importantes inter espèces et entre différents sous-types de macrophages (macrophages résidents *versus* MDM).
Nous avons montré que ces quatre adipokines étaient présentes au sein du parenchyme pulmonaire humain, l'adiponectine étant de loin la plus abondante. La concentration d'APN était inversement corrélée à l'IMC du patient, en cohérence avec ce qui est observé pour les concentrations sériques d'APN. Parmi les formes d'APN présentes, nous avons réussi identifier la forme globulaire, le monomère et le trimère d'APN (18, 30, 60 kDa respectivement). L'absence de formes de plus haut poids moléculaire pourrait être dû à un défaut de sensibilité de la technique utilisée (WB). Néanmoins, dans nos expériences *in vitro*, nous avons montré que les seuls lots d'APN efficaces sur les macrophages pulmonaires étaient ceux produits par *E. Coli* comprenant la forme trimèrique (voir supplemental data article n°2). L'APN produite par le parenchyme pulmonaire humain, qui comprend également une forme trimèrique, serait donc bien susceptible d'exercer son action de facon paracrine sur les macrophages pulmonaires, ces derniers ne produisant pas d'APN.

Parmi les quatre adipokines d'intérêt, l'APN est celle qui exerce l'effet le plus significatif sur les macrophages pulmonaires humains. En effet la leptine induit la sécrétion de TNF-α, IL-6, CCL3, CCL5, CXCL8 par des macrophages non stimulés mais seulement à sa plus forte concentration de 1000 ng/ml, ce qui est bien au-delà des taux physiologiques connus. La visfatine et la chémérine n'ont aucun effet sur la production de cytokines-chimiokines par les macrophages pulmonaires. A l'inverse, nous avons montré que l'APN exercait un effet anti-inflammatoire puissant en réduisant, de façon concentration-dépendante, la production induite par du LPS et du Poly (I:C) de TNF-α, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL1, CXCL8, CXCL10 ainsi que la production induite par l'IL-4 de CCL13, CCL17 et CCL22.
Des résultats préliminaires suggéreraient que l'AdipoR2 serait le récepteur préférentiellement impliqué dans l'effet inhibiteur d'APN sur la production de cytokines par les macrophages pulmonaires, du moins pour certaines cytokines (TNF-α, CCL2 par exemple). D'autres

travaux sont nécessaires pour explorer les voies de transduction induites par APN dans les macrophages pulmonaires humains.

Globalement, ces travaux montrent que l'APN agit au sein du parenchyme pulmonaire humain en maintenant les macrophages dans un état quiescent et en prévenant une réaction inflammatoire dysproportionnée. Un agoniste synthétique des AdipoR, l'AdipoRon, a montré des effets similaires à ceux de l'APN recombinante. Ceci ouvre la voie au développement de molécules pharmacologiques ciblant les récepteurs à l'APN pour le contrôle des maladies bronchiques chroniques inflammatoires.

Article n°3

Dual effect of Adiponectin on human lung bronchial epithelial cells

Hélène Salvator[1,2*], Stanislas Grassin Delyle[2,3], Emmanuel Naline[1,2], Marion Brollo[1], Caroline Fournier[1], Louis-Jean Couderc[1,2], Philippe Devillier[1,2]

[1] Laboratory of Research in Respiratory Pharmacology–UPRES EA220, UFR Sciences de la Santé Simone Veil, University Paris-Saclay, Suresnes, France.

[2] Department of Airway Diseases, Hôpital Foch, Suresnes, France.

[3] Mass Spectrometry Platform & INSERM UMR1173, UFR Sciences de la Santé Simone Veil, Université Versailles Saint Quentin en Yvelines, Université Paris Saclay, Montigny-le-Bretonneux, France

Article en cours de soumission

Introduction de l'article n°3

Les cellules épithéliales bronchiques sont les premières cibles des particules inhalées exogènes : virus, bactéries, allergènes, particules fines…

Elles jouent un rôle essentiel en tant première ligne de défense du système respiratoire, par leurs propriétés physiques de barrière à la pénétration des agents inhalés, de clairance muco-ciliaire et par la production de peptides antimicrobiens (défensines, lactoferrine, lyzozyme…) (449) (450). Elles orchestrent également la réponse immunitaire en recrutant des cellules phagocytaires et lymphocytes par la production d'un panel de cytokines-chimiokines (CXCL8, IL-6, TNF-α, CXCL1…) et de médiateurs lipidiques (15-HETE, PGE_2).

Les pathologies bronchiques chroniques telles que l'asthme s'accompagnent d'une inflammation chronique des voies aériennes dont l'origine provient en partie d'une augmentation de production par les cellules épithéliales de cytokines ou médiateurs pro-inflammatoires, tels que IL-6, TSLP, IL-33. Celles-ci sont importantes pour le recrutement et l'orientation de cellules immunitaires de type Th2.

L'obésité est associée à une prévalence accrue de maladies respiratoires bronchiques, une augmentation du risque infectieux respiratoire et une dérégulation dans la production d'adipokines et médiateurs inflammatoires.

Après avoir exploré le lien entre adipokines et macrophages pulmonaires, nous nous sommes intéressés à l'effet de celles-ci sur les cellules épithéliales bronchiques puisque ce type cellulaire apparait aussi important dans l'orientation de la réponse immunitaire innée pulmonaire et la régulation de l'inflammation bronchique.

Pour cela, nous avons isolé les cellules épithéliales bronchiques à partir des explants bronchiques obtenus des pièces opératoires pulmonaires. Nous avons cultivé ces cellules immergées en phase liquide puis les avons traitées par des adipokines (adiponectine, leptine, chémérine, visfatine) à concentration variable, avec ou sans stimulation par du TNF-✔. Nous avons mesuré, dans les surnageants de culture, les concentrations de cytokines et chimiokines (TNF-α, IL6, CCL2, CCL5, CCL20, CXCL8) en réponse à ces différents stimuli. Nous avons également mesuré la production d'adiponectine par des explants de bronches en culture et vérifié l'expression des récepteurs AdipoR1 et R2 sur les cellules épithéliales bronchiques humaines.

Dual effect of adiponectin on human bronchial epithelial cells

Hélène Salvator[1,2*], Stanislas Grassin Delyle[2,3], Emmanuel Naline[1,2], Marion Brollo[1], Caroline Fournier[1], Louis-Jean Couderc[1,2], Philippe Devillier[1,2]

[1] Laboratory of Research in Respiratory Pharmacology–UPRES EA220, UFR Sciences de la Santé Simone Veil, University Paris-Saclay, Suresnes, France.

[2] Department of Airway Diseases, Hôpital Foch, Suresnes, France.

[3] Mass Spectrometry Platform & INSERM UMR1173, UFR Sciences de la Santé Simone Veil, Université Versailles Saint Quentin en Yvelines, Université Paris Saclay, Montigny-le-Bretonneux, France

Disclosure of potential conflicts of interest: none

*Corresponding author:

Dr Hélène Salvator

Respiratory Pharmacology Research Laboratory - UPRES EA220

11 rue Guillaume Lenoir

F-92150 Suresnes, France

Telephone: +33-146-252-791

Fax: +33-140-999-657

E-mail: h.salvator@hopital-foch.com

ABSTRACT

BACKGROUND: Obesity is associated with an elevated risk of respiratory infections and inflammatory lung diseases.

OBJECTIVE: To investigate (i) the effects of adipokines (adiponectin (APN), leptin, chemerin, and visfatin) on the production of inflammatory cytokines by unstimulated and TNF-α activated human primary bronchial epithelial cells (hBEC), (ii) the expression of the APN receptors AdipoR1 and AdipoR2, and (iii) the production of adiponectin by hBEC.

METHODS: Human bronchial epithelial cells were isolated from patients undergoing surgery for carcinoma. The hBEC were cultured with human recombinant adipokines, in absence or presence of TNF-α for 24 h. Cytokines (IL-6, CCL2, CCL5, CCL20, CXCL1, CXCL8) or APN released by hBEC were measured using ELISAs, and mRNA levels of AdipoR1 and AdipoR2 in hBEC were determined using real-time quantitative PCR.

RESULTS: Among the four adipokines, only APN significantly alters the basal production or the TNF-α-induced production of cytokines by hBECs. APN (3-30 $\mu g.mL^{-1}$) caused a decrease in the basal and TNF-α-induced production of CCL2 and CXCL1, but an increase in the basal production of IL-6, CCL20 and CXCL8, with no alteration of the CCL5 production. AdipoR1 and AdipoR2 were both expressed in hBEC. In contrast with bronchial explants, isolated hBECs did not produced APN.

CONCLUSIONS: Among four classical adipokines, only APN modulates the production of inflammatory cytokines by hBECs.

KEYWORDS: adiponectin, obesity, human bronchial epithelial cell, receptors, cytokine.

ABBREVIATIONS

APN: adiponectin

BMI: body mass index

IL: interleukin

LPS: lipopolysaccharide

TLR: toll-like receptor

AdipoR: adiponectin receptor

Introduction

About 800 millions individuals are obese and more than 1.5 billions are overweight globally. A high bodymass index (BMI) is a risk factor for an expanding set of chronic diseases (1) (2) (3). In addition, many obese patients suffer from respiratory symptoms. Particularly, obesity is a contributing factor to a high respiratory tract infection burden (4) (5); it was identified as a risk factor for severe influenza during the H1N1 influenza pandemic (6) (7) (8). Furthermore, epidemiological studies have demonstrated that (i) asthma is more likely to occur in obese individuals, and (ii) obese people with asthma experience more severe symptoms, worse quality of life, and increased healthcare use (9). A causal association is suggested by the fact that obesity usually precedes asthma and that bariatric surgery for morbid obesity decreases the severity and extent of asthma symptoms (10) (11).

The overall impact of obesity on lung function appears multifactorial, related to mechanical and inflammatory aspects of obesity (9)(4). Obese individuals exhibit an increase in circulating inflammatory mediators. These mediators originate in adipocytes and activated macrophages in adipose tissue, in direct proportion to tissue mass and are collectively known as adipokines. These adipokines could alter lung function in a variety of ways, including through activation of vascular endothelial cells, airway fibroblasts, airway smooth muscle cells or airway epithelial cells (12) (13). Most of the adipokines such as tumor necrosis factor TNF-α, interleukin IL-6, IL-1β, leptin and resistin are pro-inflammatory, and a small number of adipokines, including adiponectin (APN), are decreased by obesity and generally exhibit anti-inflammatory properties and protective functions against obesity-related diseases. Collectively, the imbalance in the production of pro- and anti-inflammatory adipokines in the obese conditions results in multiple complications including asthma (14) (15).

The airway epithelium acts as a frontline defense against foreign agents, such as allergens, viruses, or pollutants, not only as a physical barrier and through the mucociliary apparatus but also through its immunological functions. The ability of the bronchial epithelium to control the balance of inhibitory and activating signals is essential for orchestrating appropriate inflammatory and immune responses and control the resolution of inflammation during tissue repair (16). Influenza viruses infect the airway epithelium and trigger both innate and adaptive immune responses that are crucial for efficient antiviral responses. The interaction between respiratory viruses and airway epithelial cells results in production of antiviral substances, cytokines and chemokines, which recruit inflammatory cells and influence adaptive immunity (17) (18) (19).With respect to asthma, the evidence for epithelial dysregulation is compelling

and the consensus between each asthma endotype is that the initiating trigger occurs at the bronchial epithelia (19) (16).

Considering the important role of the epithelium both in respiratory tract viral infections and asthma and the compounding factor of obesity in these diseases, the aim of the present study was to investigate (i) the effects of adipokines (adiponectin (APN), leptin, chemerin, and visfatin) on the production of cytokines by unstimulated and TNF-α activated human primary bronchial epithelial cells (hBEC), (ii) then to study the expression of the adipokine's receptors involved, and (iii) finally to assess the production of the relevant adipokines by hBEC.

Methods

Materials

The antibiotics (penicillin-streptomycin-gentamycin-vancomycine-amphotericin-ceftazidim), DMSO, L-glutamine, heat-inactivated foetal calf serum (FCS), protease (bovine pancreas), HEPES and LPS (from *Escherichia coli* serotype 0111:B4, batch 029K4022) were purchased from Sigma (St.Louis, MO, USA). Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium, Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) High Glucose medium and bovine serum albumin were from Eurobio Biotechnology (Les Ulis, France). Bronchial Epithelial cell Growth Medium BEGM (with growth factors and antibiotics) and Mycozap were purchased was from Lonza (Walkers Ville, MD USA). Trypsin 0.25% EDTA was from Gibco®. Culture flasks for epithelial cell culture were from TPP® and pre-coated culture flask were from Corning®. All the other cell culture plastics were from CML (Nemours, France).

Human recombinant Tumor Necrosis Factor (TNF) was from R&D systems®. Full-length human recombinant adiponectin, produced by E Coli, was purchased from Biovendor© and was solubilized in RPMI. Human recombinant leptin, visfatin and chemerin were also all E coli-derived. Leptin and chemerin were purchased from R&D systems®, visfatin from PeproTech®.

Tissue preparation

The use of resected lung tissue for in vitro experiments was approved by the local institutional review board (Comité de Protection des Personnes Ile de France VIII, Boulogne-Billancourt, France). Lung tissue samples were obtained from 15 patients (9 males and 6 females; smoker/ex-smoker/non smoker: 7/5/2; mean ± standard error (SD) age: 62.3 ± 9.7 years;

FEV1 = 89.5 ± 31 %; pack-years: 36.5 ± 19; FEV1/FVC ratio: 0.76 ± 0.16) undergoing surgical resection for lung carcinoma and who had not received prior chemotherapy. Tissue dissection was performed to obtain bronchial rings, by starting at the main bronchus to the 4th or 5th level of bronchial division. Bronchial segments were excised after removal of adhering lung parenchyma and connective tissue and either immediately crushed for ARN extraction or cultured during 24h in culture plate with RPMI supplemented with L-glutamine, 10% FCS and antibiotics before supernatants were recovered for adiponectin measurement.

Isolation and culture of human bronchial epithelial cells

The proximal segmental bronchi were placed in DMEM High Glucose supplemented with L-glutamine, 10% FCS, Hepes, antibiotics and antifungal drugs (penicillin, streptomycin, gentamycin, vancomycin, amphotericin, ceftazidim and mycozap) and were stored at +4°C during at least three days. Bronchial mucus was removed and the bronchus was cut lengthwise before protease was added (10 mg/ml) during one night at +4°C. The day after, the inside of the bronchus was gently scratched in order to detach cells in the culture medium which was then centrifuged. The cell pellet was resuspended in 30 ml of DMEM High glucose supplemented and placed in a culture flask during 2 hours at 37°C-5% CO_2. Only the supernatant was recovered and replaced in a pre-coated culture flask. The day after and every two days, the culture medium was changed with 15 ml DMEM High Glucose without antibiotics and 15 ml BEGM. When the cells were confluent (after ~7 days of culture), they were detached with trypsin, centrifuged and resuspended with BEGM-DMEM medium in a 24-well plate (1 ml per well).

Treatment of bronchial epithelial cells

When the cells were confluents, the 24-well plates were washed and 1 mL of fresh medium was added per well (RPMI supplemented with glutamine, antibiotics and 1% FCS for macrophages or BEGM-DMEM for epithelial cells). Full-length recombinant adiponectin from E. Coli (3-10-30 µg/ml), leptin (1-1000 ng/ml), visfatin (5-500 ng /ml) or chemerin (10-1000 ng/ml) were then added in culture medium. The human bronchial epithelial cells (hBECs) were treated with TNF-α at the concentration of 50 ng/ml one hour after exposure to adipokines. Following a 24 h incubation period, cell culture supernatants were collected and stored at -80°C for later analyses.

Chemokine and Cytokine Assays.

The production of selected chemokines and cytokines was assessed by measuring their concentrations in the hBECs supernatants with ELISA (Duoset Development System), according to the manufacturer's instructions (R&D Systems Europe, Lille, France). The detection limits of these assays were 4 $pg.mL^{-1}$ for CCL3, 8 $pg.mL^{-1}$ for CCL2, 9 $pg.ml^{-1}$ for IL-6 and 16 $pg.mL^{-1}$ for CCL20, CXCL1, CCL5 and CXCL8.
The dosages of APN in the supernatants of bronchial segments and hBECS were performed with a Human total Adiponectin Immunoassay Quantikine from R&D Systems (detection limit was 0.246 ng/ml).

Reverse Transcriptase – Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) Analysis.

The RT-qPCR studies were conducted either on hBECs or on bronchial segments crushed and homogenized in TRIzol® reagent immediately after dissection, using a ball mill TissueLyser LT (Qiagen Courtaboeuf, France). Total RNAs were extracted from homogenates of human bronchi by a method derived from that of Chomczynski and Sacchi (20). The amount of RNA extracted from hBECs or bronchi was estimated by spectrophotometry at 260 nm (Spectrophotometer Biowave DNA; Biochrom, Cambridge, England), and its quality assessed by a microfluidic electrophoresis system (RNA Standard Sensitivity kits for Experion®, BioRad, Marnes-la-Coquette, France). After a DNase step (DNase I, Life Technologies), 1 µg of total RNA was subjected to reverse transcription (SuperScript® III First-Strand SuperMix kit, Life Technologies). The resulting cDNA was then used for quantitative real-time PCR experiments with TaqMan® chemistry (Life Technologies). The amplification was carried out using 20 ng cDNA (Gene Expression Master Mix, Life Technologies) in a StepOnePlus thermocycler (Life Technologies). The conditions were as follows: initial denaturation at 95°C for 10 min followed by 40 cycles of annealing / extension (95°C for 15 s, then 60°C for 1 min). Fluorescence was measured at each cycle and the threshold cycle (Ct) of the real-time PCR was defined as the point at which a fluorescence signal corresponding to the amplification of a PCR product was detectable. The reaction volume was set at 10 µL. Specific TaqMan® arrays based on predesigned reagents (*AdipoR1*: Hs01114951_m1; *AdipoR2*: Hs00226105_m1, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) were used to analyze AdipoR1 and AdipoR2 transcripts. The housekeeping gene coding for hypoxanthine phosphoribosyltransferase (*HPRT1*: Hs99999909_m1) was used for signal normalization.

Statistical Analysis.

Data are expressed as means ± S.E.M per 10^6 epithelial cells, means ± S.E.M per 100 mg lung tissue or means ± S.E.M per mL, as appropriate. The relative expression of mRNAs was calculated according to the $2^{(-\Delta Ct)}$ method (21).

Statistical analyses used one-way repeated measures ANOVA followed by Bonferroni's posttests or t-test for mRNA expression. These analyses were performed using GraphPad Prism® Version 5.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Significance was defined as $p < 0.05$.

Results

Effects of adipokines on cytokine production by human bronchial epithelial cells

Adiponectin (3-10-30 µg/ml) exerted a dual effect on the production of cytokine by hBECs reducing the production of CXCL1 and CCL2 in a concentration-dependent manner while weakly inducing the production of CXCL8 and IL-6 at the highest concentration. Adiponectin did not alter the very weak basal production of CCL5. At the highest concentration of APN (30 µg/ml), the production of CXCL1 and CCL2 was reduced by -50 ± 27 % and -66 ± 32% respectively; and the production of CCL20, CXCL8 and IL-6 was increased by +385 ± 217%, +61 ± 43% and +165 ± 131 %, respectively (Table 1, Figure 1).

The exposure of hBECs to TNF-α increased the production of CXCL1 by 1.3 fold over the basal production, and by 5.9-fold for CCL2, 1.5-fold for CXCL8, 3.9-fold for IL-6, 3,6-fold for CCL20 and 5,1-fold for CCL5. Adiponectin inhibited the TNF-α-induced production of CXCL1 and CCL2 whereas it had no significant effect on the TNF-α-induced production of IL-6, CXCL8, CCL5 and CCL20 (Table 1, Figure 1).

The hBECs were also treated with a range of concentrations of leptin, visfatin and chemerin. These three adipokines had no significant effect on the production of IL-6, CCL2, CCL5, CCL20, CXCL1, and CXCL8 by unstimulated or TNF-α stimulated hBECs (Table 2, Figure 2).

Expression of AdipoR1 and AdipoR2 by human bronchial epithelial cells and bronchial explants

The transcripts of the two subtypes of AdipoRs were detectable in hBECs as well as in the ARN extracted from the human bronchial segments (Figure 3). The expression of AdipoR1 was about 4-fold and 10-fold higher than AdipoR2 in hBECS and bronchial explants, respectively.

Production of APN by human primary bronchial epithelial cells and bronchial explants

In the supernatants of human bronchial explants, APN was measured at a concentration (mean ± SEM) of 28.8 ± 3 $ng.ml^{-1}$ per 100mg (n=12) but was undetectable in the supernatants of hBECs (n= 7). This concentration, adjusted to volume of the culture medium (2,5ml) and the bronchial explants volume (100 mg ≈ 0.1 mL) would correspond to an estimated concentration of 0.72 µg/g of bronchial tissue.

Discussion

In this study, we have investigated the effect of adipokines on hBECs, highlighting the expression of the AdipoRs and a dual effect of APN on the cytokine production. The APN stimulated the production of IL-6, CCL20 and CXCL-8 but decreased the production of CXCL1 and CCL2, with no alteration of the production of CCL5. In addition, we have found that APN was produced by bronchial explants but not by isolated hBECs. Production of APn by bronchial explants was 10 fold less important than that from pulmonary parenchyma explants reported in previous work from our laboratory (6.1 $\mu g.g^{-1}$ of lung tissue) [Salvator et al. in press].

There are few reports on the effect of adipokines on cytokine release from lung epithelial cells and these reports have brought variable results. Nigro et al. showed that a full-length APN (5 and 50 µg/ml during 14 hours) did not influence the mRNA expression of CXCL-8, CCL-2 and IL-6 but enhanced the IL-10 mRNA expression in the A549 human alveolar basal epithelial cell line (22). However, Miller et al. demonstrated in the same cell line that the C-terminal globular fragment of APN (1 µg/ml during 24 hours) significantly induced CXCL-8 release (23). Likewise, Chen et al. reported that a full-length APN upregulated cytosolic phospholipase A2 and cyclooxygenase-2 in the A549 cell line (24). The A549 cell line is a hypotriploid human cell line initiated through explant culture of lung carcinomatous tissue and used as a type II pulmonary epithelial cell model.

In contrast with these results in the A549 cell line, Cheng et al. (25) showed that both the full-length and globular forms of APN (5-20 µg/ml) concentration-dependently inhibited the expression of TNF-α and CXCL-8 induced by cigarette smoke extract in human bronchial epithelial cells (16HBECs). In the present study with primary hBECs, a treatment with APN differently regulated the production of cytokines. APN upregulated the basal production of CCL20, CXCL8 and IL-6 (without enhancing their production in TNF-α stimulated cells) but down-regulated the basal and the TNF-α-induced production of CXCL1 and CCL2. APN did not alter the very weak basal and TNF-α-induced production of CCL5. In addition to its regulatory effects on the production of cytokines, APN could have a protective role for alveolar epithelial cells (A549 cells) by counteracting the cytotoxic effects induced by TNF-α and IL-1β and regulating the viability of the cells (22), and also for bronchial epithelial cells by regulating proliferation, wound repair and apoptosis (28).

TNF-α was chosen to stimulate the hBECs because it was previously reported to increase the production of cytokine on this cell type (IL-1β, TNF-α, IL-6, CXCL-8, and TSLP) and was

known to promote epithelial barrier dysfunction (26). In contrast, LPS (a TLR4 agonist) did not cause an increase in the cytokine production by hBECs ((27) and data not shown from our lab). An alternative to the use of TNF-α would have been the TLR3 agonist, Poly(I:C) (27) but we did not find differences between these two stimuli on hBECs for the cytokines measured in the present study (data not shown).

In studies with A549 epithelial cells, AdipoR1 (but not AdipoR2) was strongly expressed by the cells stimulated with TNF-α as assessed by RT-PCR, immunohistochemistry, and Western blot while unstimulated A549 cells did not express AdipoR1 (10). In two different studies, the two subtypes of AdipoRs were demonstrated at mRNA and protein level in A549 cells and in two other human lung cell lines, SW-1573 and Calu-3 (22) (24). However, immunohistochemistry studies of lung sections from patients with COPD demonstrated that airway epithelial cells expressed significant levels of AdipoR1 but not AdipoR2 (10). The immortalized human bronchial epithelial cell line (16HBE14o) expresses both AdipoRs but the expression of AdipoR1 was greater than AdipoR2 (28). Similarly, in the present study, we demonstrated that the expression of AdipoR1 was greater than AdipoR2 in hBECs.

We also showed that APN was produced by human bronchial explants but not by latter's constituent hBECs. In contrast, immunohistochemistry studies of lung sections from patients with COPD (but not in non-COPD control subjects) suggested that distal airway epithelial cells expressed significant levels of APN as opposed to alveolar cells (10). The apparent discrepancy between our results on isolated hBECs and the results of this immunohistology study (10) is likely explained by differences in the population of patients studied, non-COPD patients (present study) versus COPD (10), and may be also partly explained by differences in the methods - dosage by ELISA on hBECS isolated from proximal bronchi and cultured for ten days *versus* immunostaining of the epithelium of distal airways (10). The APN produced by bronchial explants (present study) may not therefore originate from the bronchial epithelial cells. In a previous study from our laboratory (Salvator et al. in press), we showed that APN was also produced by human lung parenchyma explants but not by the lung macrophages. In this latter study, after taking account of dilution in the culture medium, the estimated APN concentration in lung tissue was close to the range found in the blood (5-20 $\mu g.ml^{-1}$) and to the concentrations of recombinant APN found to modulate cytokine production by hBECs (present study). The identification of the cell types involved in the production of APN in lung tissue was beyond the scope of the present study. However, our results demonstrate that the APN locally produced by lung parenchyma and bronchus may result in paracrine effects on epithelial cells or macrophages. Indeed, we have previously shown that APN acts as an anti-

inflammatory agent reducing the production TNF-α, IL-6 and chemokines by human lung macrophages after a stimulation by LPS, Poly I:C or IL-4 (Salvator H. et al., in press).

Adiponectin is not the only adipokine synthetized by the lung. Leptin is reportedly synthetized by bronchial epithelial cells and alveolar type II pneumocytes (29) (30) and chemerin is expressed (transcript and protein) by the epithelium of the bronchioles in mice (31). In the present study, leptin, visfatin and chemerin did not modulate the production of cytokines by hBECs. Similarly, no effects of leptin were detected on proliferation, wound repair and apoptosis of HBECs (28). Visfatin, also called nicotinamide phosphoribosyltransferase or pre-B cell colony-enhancing factor is reported as pro-inflammatory on monocytes and macrophages (32). In A549 cells, visfatin stimulated expression of CXCL8 and IL-16 via its non-enzymatic activity (33). The transfection of A549 and human alveolar epithelial cells with visfatin was also associated with an enhancement of CXCL8 and TNF-α expression and production (34) (35) and the inhibition of visfatin's enzyme activity reduced the production of CXCL8 caused by hypoxia-reoxygenation of A549 cells (36). However, in contrast with these latter results on the A549 epithelial alveolar cell line, we are unable to detect a modulatory effect of visfatin on the cytokine production by hBECS. In addition, it has been suggested that chemerin could have a role in regulating lung inflammation as mice knock downed for the chemerin receptor (ChemR23) produced less inflammatory cytokines (INF, CCL2, CXCL-1, CCL20) after a respiratory challenge with cigarette smoke or virus (37) (38). Again, we did not detect a modulatory role of chemerin on hBECs.

Taken as a whole, the present study suggests that among the four adipokines tested, only APN modulates the production of inflammatory cytokines by hBECs. APN increased the production of CXCL8, a key factor of the immune response after epithelial damage and a potent chemoattractant for neutrophils, of CCL20 which attract lymphocytes and dendritic cells in tissues, and of IL-6, an essential cytokine of acute inflammatory phase. APN also decreased the production of CXCL-1 and CCL2 are also two potent chemoattractors for neutrophils and monocytes. The decrease in CCL2 production may also be beneficial in airway infection by the respiratory syncytial virus (RSV) since CCL2 expression markedly contributes to RSV replication (39).

In conclusion, we evidenced AdipoR1 and AdipoR2 transcript expression in hBECs and the production of APN by bronchial explants, suggesting that APN can act in a paracrine way on bronchial epithelial cells to modulate cytokines production. Furthermore, the potential value of AdipoRs as drug targets for the treatment of chronic obstructive lung diseases is enhanced

by the ability of APN and AdipoR agonists to inhibit cytokine production by human lung macrophages [Salvator et al. in press].

ILLUSTRATIONS

A.

Cytokine concentration ng.10^{-6} cells	*BASAL*	*APN 3*	*APN 10*	*APN 30*
CXCL1	68,86 ± 16,0	52,81 ± 12,74	44,30 ± 10,50**	34,39 ± 7,11***
CCL2	0,15 ± 0,06	0,09 ± 0,04	0,06 ± 0,02	0,04 ± 0,01*
IL6	0,60 ± 0,24	0,54 ± 0,23	0,76 ± 0,36	1,25 ± 0,49**
CXCL8	13,51 ± 3,87	14,02 ± 4,19	14,91 ± 4,36	21,86 ± 3,78***
CCL20	1,02 ± 0,2	1,35 ± 0,4	3,15 ± 1,5	4,00 ± 1,3 **
CCL5	4,4. 10^{-3} ± 1,8.10^{-3}	5,3 10^{-3} ±2,6.10^{-3}	12,4 10^{-3} ±4,4.10^{-3}	11,1 10^{-3} ± 3,1.10^{-3}

B.

Cytokine concentration ng.10^{-6} cells	*TNF alone*	*APN3 + TNF*	*APN 10 + TNF*	*APN30 + TNF*
CXCL1	92,93 ± 20,28	85,59 ± 14,91	72,03 ± 13,40**	43,47 ± 13,96***
CCL2	0,76 ± 0,12	0,79 ± 0,17	0,30 ± 0,13**	0,05 ± 0,02***
IL6	1,85 ± 0,89	2,41 ± 1,62	1,76 ± 1,04	3,47 ± 2,67
CXCL8	19,93 ± 2,72	20,96 ± 2,76	20,26 ± 2,80	20,77 ± 2,89
CCL20	3,34 ± 1.0	3,50 ± 1,0	5,25 ± 1,4	3,94 ± 1,0
CCL5	18,8.10^{-3} ± 0,9.10^{-3}	46,6 10^{-3} ± 5,1.10^{-3}	51,6 10^{-3} ±8,3.10^{-3}	50,9 10^{-3} ± 22,3.10^{-3}

Table 1. Concentrations of cytokines in the supernatants of human bronchial epithelial cells treated with adiponectin in absence or presence of TNFα

Bronchial epithelial cells were incubated with adiponectin (APN) (3-10-30 µg/ml) in the absence of TNFα (A) or in presence of TNFα (50 ng.mL-1, added one hour after APN) (B). Cell culture supernatants were collected after 24h incubation and analyzed by ELISA. Results are shown as the means ± SEM of 3-6 independent experiments. Statistical analysis were realized between the treatment condition and "Basal" or "TNF alone" conditions. * $p<0.05$; ** $p< 0.01$; *** $p<0.001$

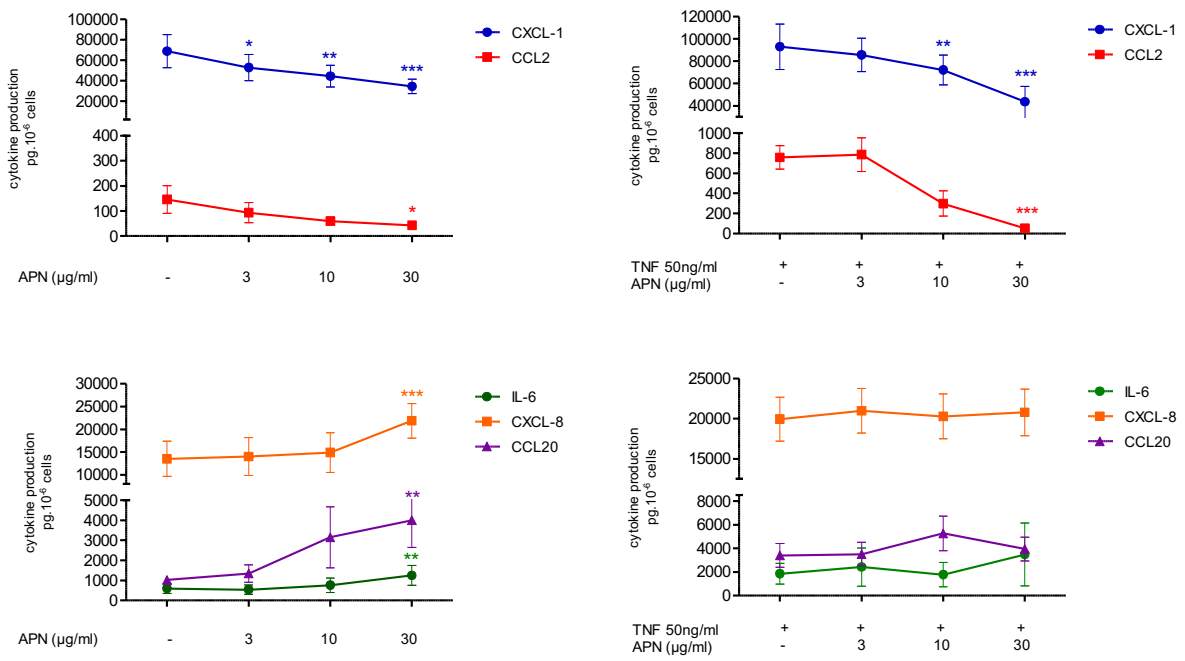


Figure 1. Concentration-curves of cytokines in the supernatants of human bronchial epithelial cells treated with adiponectin in absence or presence of TNFα

Bronchial epithelial cells were incubated with adiponectin (APN) (3-10-30 µg/ml) in the absence of TNFα or in presence of TNFα (50 ng.mL-1, added one hour after APN) (B). Cell culture supernatants were collected after 24h incubation and analyzed by ELISA. Results, expressed in pg.10^{-6}cells) are shown as the means ± SEM of 3-6 independent experiments. * $p<0.05$; ** $p< 0.01$; *** $p<0.001$

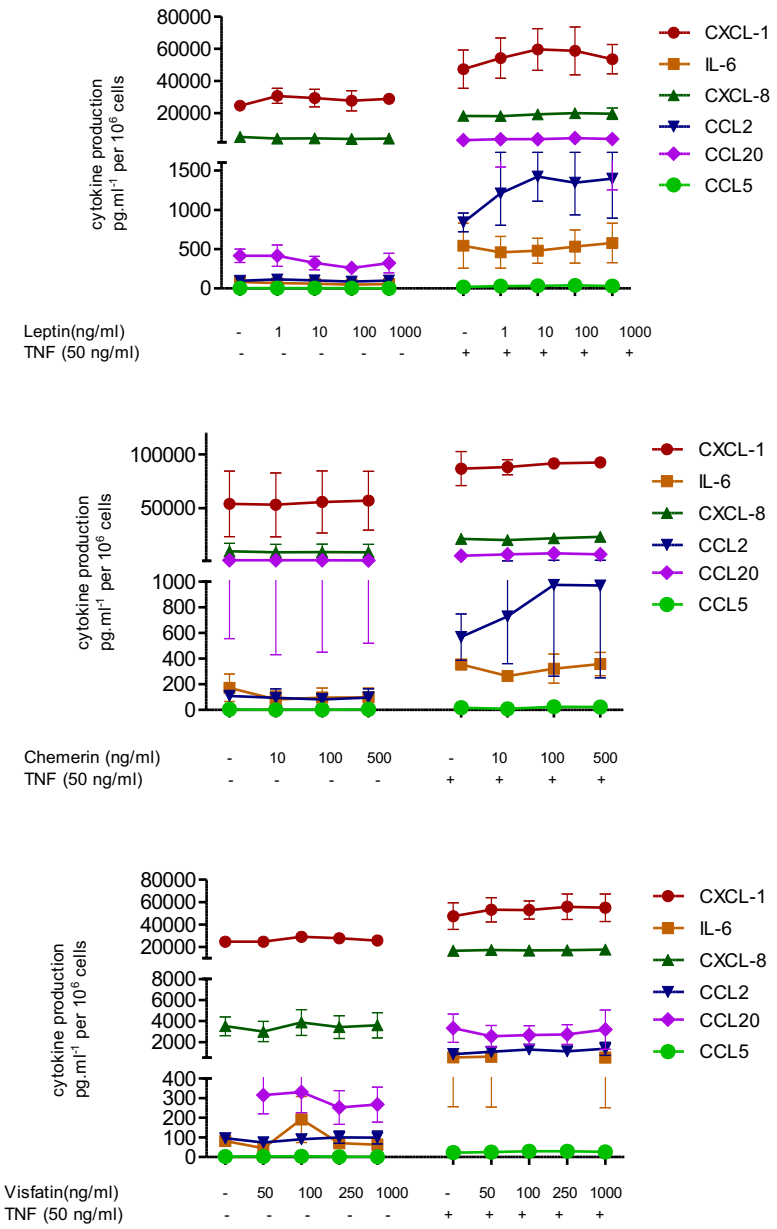


Figure 2: Concentrations of cytokines in the supernatants of human bronchial epithelial cells treated with leptin, visfatin and chemerin in absence or presence of TNFα

Bronchial epithelial cells were incubated with leptin (1-10-100-1000 ng/ml), chemerine (10-100-500 ng/ml) and visfatin (50-100-250-1000 ng/ml) in the absence of TNFα (A) or in presence of TNFα (50 ng.mL-1, added one hour after APN). Cell culture supernatants were collected after 24h incubation and analyzed by ELISA. Results are shown as the means ± SEM of 3-6 independant experiments. Statistical analysis were realized between the treatment condition and "Basal" or "TNF alone" conditions. * $p<0.05$; ** $p< 0.01$; *** $p<0.001$

	Control						TNF-α (50ng.mL^{-1})					
Adipokines	IL-6	CXCL-8	CCL-2	CXCL-1	CCL20	CCL5	IL-6	CXCL-8	CCL-2	CXCL-1	CCL20	CCL5
Leptin (ng.mL^{-1})	n=3	n=4	n=3	n=3	n=3	n=3	n=3	n=4	n=3	n=3	n=3	n=3
0	82 ± 27	5260 ± 1864	96 ± 5	24719 ± 540	416 ± 85	3,7 ± 2	543 ± 286	18357 ± 2875	840 ± 117	47382 ± 11824	3306 ± 1349	18,8 ± 0,9
1	67 ± 25	4354 ± 793	115± 24	30810 ± 4712	417 ± 136	3,8 ± 0,9	460 ± 202	18228 ± 2804	1208 ± 405	54235 ± 12507	3937 ± 2395	31,7 ± 13,5
10	62 ± 23	4469 ± 1107	102 ± 34	29465 ± 5405	323 ± 85	3,1 ± 2,1	479 ± 159	19424 ± 2706	1422 ± 313	59530 ± 12887	3876 ± 1900	34,4 ± 7,1
100	48 ± 15	4081 ± 1270	89 ± 22	27769 ± 6236	260 ± 55	3,8 ± 0,9	532 ± 212	20111 ± 2820	1345 ± 408	58644 ± 14794	4576 ± 2607	37,6 ± 9,8
1000	57 ± 22	4249 ± 1041	98 ± 21	28937 ± 1622	322 ± 124	2,4 ± 2,4	577 ± 250	19733 ± 3592	1398 ± 502	53530 ± 9078	4088 ± 2833	29,0 ± 7,7
Chemerin (ng.mL^{-1})	n=2	n=2	n=2	n=2	n=2	n=1	n=2	n=2	n=2	n=2	n=2	n=1
0	172 ± 107	9834 ± 7675	109 ± 18	54112 ± 30432	1704 ± 1147	3,9 ± 0	354 ± 12	21499 ± 1572	568 ± 181	86746 ± 15722	5886 ± 115	17,3 ± 0
10	81 ± 65	8991 ± 7396	95 ± 70	53122 ± 29658	1759 ± 1328	0 ± 0	264 ± 15	20434 ± 385	728 ± 366	88119 ± 6962	7185 ± 1175	7,7 ± 0
100	96± 74	9330 ± 7138	82 ± 46	55885 ± 28849	1678 ± 1229	0 ± 0	321 ± 113	22021 ± 992	975 ± 713	91529 ± 4362	8127 ± 1163	24,8 ± 0
1000	97 ± 73	9100 ± 7262	97 ± 68	56990 ± 27364	1623 ± 1102	3,9 ± 0	357 ± 90	23355 ± 394	971 ± 721	92414 ± 3829	7121 ± 1177	23 ± 0
Visfatin (ng.mL-1)	n=3	n=3	n=3	n=3	n=3	n=4	n=3	n=3	n=3	n=3	n=3	n=4
0	82 ± 27	3506 ± 892	96 ± 5	24719 ± 540	416 ± 85	3,2 ± 1,6	543 ± 286	16663 ± 3284	840 ± 117	47382 ± 11824	3306 ± 1349	22,8 ± 4,0
50	45 ± 8	2992 ± 995	74 ± 19	24732 ± 2025	316 ± 95	2,9 ± 1,7	589 ± 335	17314 ± 2506	1072 ± 413	53109 ± 10647	2550 ± 1032	25,5 ± 7,0
100	76 ± 23	3859 ± 1226	91 ± 11	29092 ± 2762	331 ± 104	3,8 ± 1,5	483 ± 221	16797 ± 2335	1276 ± 505	52910 ± 8101	2649 ± 906	29,7 ± 9,2
250	72 ± 24	3412 ± 1094	101 ± 31	27805 ± 1703	253 ± 86	1,4 ± 1,3	462 ± 198	17176 ± 2314	1103 ± 511	55773 ± 11373	2710 ± 939	30,3 ± 7,3
500	62 ± 28	3589 ± 1210	100 ± 32	25685 ± 3193	267 ± 89	1,8 ± 1,0	516 ± 265	17762 ± 3139	1343 ± 627	54892 ± 12275	3181 ± 1882	26,9 ± 8,1

Table 2. Concentrations of cytokines (pg.10^{-6}cells) in the supernatants of human bronchial epithelial cells treated with leptin, chemerin or visfatin in absence or presence of TNFα

Bronchial epithelial cells were incubated with the adipokines in absence or presence of TNFα (50 ng.mL-1, added one hour after the adipokines) Cell culture supernatants were collected after 24h incubation and analyzed by ELISA. Results are expressed in pg.10^{-6}cells and are shown as the means ± SEM of 3-4 independent experiments.

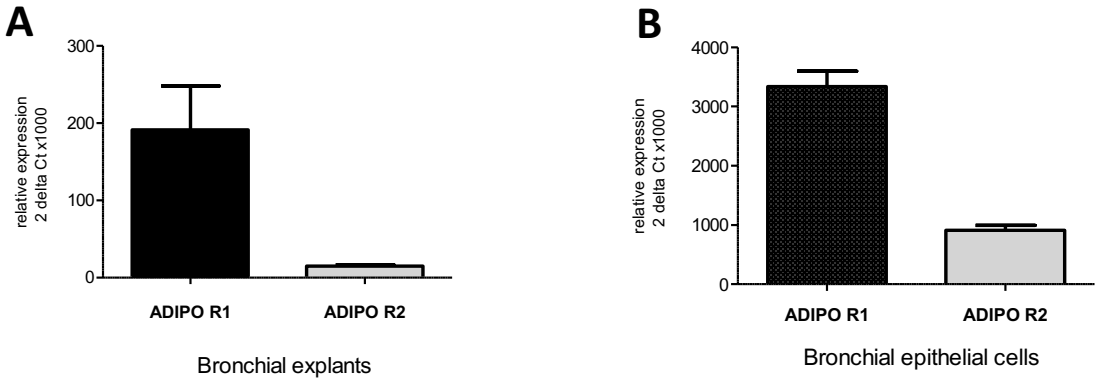


Figure 3: Expression of the adiponectin R1 and R2 receptors in human bronchi (A) and human bronchial epithelial cells (B).

Fine bronchial rings were obtained after human lung tissue dissection. The total RNA was isolated with TRIzol after bronchial segments were crushed (A). Bronchial epithelial cells were adherent to culture plate and RNA was obtained after TRIzol treatment (B).

Expression of adiporeceptors was assessed by qRT-PCR. Results for a mean of 4 to 6 distincts experiences.

BIBLIOGRAPHY

1. WHO | 10 facts on obesity [Internet]. WHO. [cité 15 oct 2018]. Disponible sur: http://www.who.int/features/factfiles/obesity/en/

2. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128·9 million children, adolescents, and adults. Lancet Lond Engl. 16 déc 2017;390(10113):2627‑42.

3. GBD 2015 Obesity Collaborators, Afshin A, Forouzanfar MH, Reitsma MB, Sur P, Estep K, et al. Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. N Engl J Med. 06 2017;377(1):13‑27.

4. Dixon AE, Peters U. The effect of obesity on lung function. Expert Rev Respir Med. sept 2018;12(9):755‑67.

5. Maccioni L, Weber S, Elgizouli M, Stoehlker A-S, Geist I, Peter H-H, et al. Obesity and risk of respiratory tract infections: results of an infection-diary based cohort study. BMC Public Health. 20 2018;18(1):271.

6. Salvator H, Devillier P, Rivaud E, Catherinot E, Honderlick P, Couderc L-J. [Obesity, poor prognostic factor in pandemic influenza A (H1N1) 2009: the role of adipokines in the modulation of respiratory defenses]. Rev Pneumol Clin. sept 2011;67(4):244‑9.

7. Morgan OW, Bramley A, Fowlkes A, Freedman DS, Taylor TH, Gargiullo P, et al. Morbid obesity as a risk factor for hospitalization and death due to 2009 pandemic influenza A(H1N1) disease. PloS One. 15 mars 2010;5(3):e9694.

8. Van Kerkhove MD, Vandemaele KAH, Shinde V, Jaramillo-Gutierrez G, Koukounari A, Donnelly CA, et al. Risk factors for severe outcomes following 2009 influenza A (H1N1) infection: a global pooled analysis. PLoS Med. juill 2011;8(7):e1001053.

9. Sutherland ER. Linking obesity and asthma. Ann N Y Acad Sci. avr 2014;1311:31‑41.

10. Boulet L-P, Turcotte H, Martin J, Poirier P. Effect of bariatric surgery on airway response and lung function in obese subjects with asthma. Respir Med. mai 2012;106(5):651‑60.

11. Dixon AE, Pratley RE, Forgione PM, Kaminsky DA, Whittaker-Leclair LA, Griffes LA, et al. Effects of obesity and bariatric surgery on airway hyperresponsiveness, asthma control, and inflammation. J Allergy Clin Immunol. sept 2011;128(3):508-515.e1-2.

12. Peters MC, Fahy JV. Metabolic consequences of obesity as an « outside in » mechanism of disease severity in asthma. Eur Respir J. 2016;48(2):291‑3.

13. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. Nat Rev Immunol. févr 2011;11(2):85‑97.

14. Lau WB, Ohashi K, Wang Y, Ogawa H, Murohara T, Ma X-L, et al. Role of Adipokines in Cardiovascular Disease. Circ J Off J Jpn Circ Soc. 23 juin 2017;81(7):920‑8.

15. Zheng H, Zhang X, Castillo EF, Luo Y, Liu M, Yang XO. Leptin Enhances TH2 and ILC2 Responses in Allergic Airway Disease. J Biol Chem. 14 oct 2016;291(42):22043‑52.

16. Loxham M, Davies DE. Phenotypic and genetic aspects of epithelial barrier function in asthmatic patients. J Allergy Clin Immunol. juin 2017;139(6):1736‑51.

17. Vareille M, Kieninger E, Edwards MR, Regamey N. The airway epithelium: soldier in the fight against respiratory viruses. Clin Microbiol Rev. janv 2011;24(1):210‑29.

18. Herold S, Becker C, Ridge KM, Budinger GRS. Influenza virus-induced lung injury: pathogenesis and implications for treatment. Eur Respir J. mai 2015;45(5):1463‑78.

19. Veerapandian R, Snyder JD, Samarasinghe AE. Influenza in Asthmatics: For Better or for Worse? Front Immunol. 2018;9:1843.

20. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem. avr 1987;162(1):156‑9.

21. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods San Diego Calif. déc 2001;25(4):402‑8.

22. Nigro E, Scudiero O, Sarnataro D, Mazzarella G, Sofia M, Bianco A, et al. Adiponectin affects lung epithelial A549 cell viability counteracting TNFα and IL-1ß toxicity through AdipoR1. Int J Biochem Cell Biol. juin 2013;45(6):1145‑53.

23. Miller M, Cho JY, Pham A, Ramsdell J, Broide DH. Adiponectin and functional adiponectin receptor 1 are expressed by airway epithelial cells in chronic obstructive pulmonary disease. J Immunol Baltim Md 1950. 1 janv 2009;182(1):684‑91.

24. Chen H-M, Yang C-M, Chang J-F, Wu C-S, Sia K-C, Lin W-N. AdipoR-increased intracellular ROS promotes cPLA2 and COX-2 expressions via activation of PKC and p300 in adiponectin-stimulated human alveolar type II cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 01 2016;311(2):L255-269.

25. Cheng M-Y, Liu H, Zhang T-M, Xu J-Y. Different forms of adiponectin reduce the apoptotic and damaging effect of cigarette smoke extract on human bronchial epithelial cells. Exp Ther Med. déc 2016;12(6):4168‑74.

26. Hardyman MA, Wilkinson E, Martin E, Jayasekera NP, Blume C, Swindle EJ, et al. TNF-α-mediated bronchial barrier disruption and regulation by src-family kinase activation. J Allergy Clin Immunol. sept 2013;132(3):665-675.e8.

27. Royer P-J, Henrio K, Pain M, Loy J, Roux A, Tissot A, et al. TLR3 promotes MMP-9 production in primary human airway epithelial cells through Wnt/β-catenin signaling. Respir Res. 13 2017;18(1):208.

28. Zhu XL, Qin XQ, Xiang Y, Tan YR, Qu XP, Liu HJ. Adipokine adiponectin is a potential protector to human bronchial epithelial cell for regulating proliferation, wound repair and apoptosis: comparison with leptin and resistin. Peptides. févr 2013;40:34‑41.

29. Vernooy JHJ, Drummen NEA, van Suylen RJ, Cloots RHE, Möller GM, Bracke KR, et al. Enhanced pulmonary leptin expression in patients with severe COPD and asymptomatic

smokers. Thorax. janv 2009;64(1):26‑32.

30. Bruno A, Pace E, Chanez P, Gras D, Vachier I, Chiappara G, et al. Leptin and leptin receptor expression in asthma. J Allergy Clin Immunol. août 2009;124(2):230‑7, 237.e1-4.

31. Luangsay S, Wittamer V, Bondue B, De Henau O, Rouger L, Brait M, et al. Mouse ChemR23 is expressed in dendritic cell subsets and macrophages, and mediates an anti-inflammatory activity of chemerin in a lung disease model. J Immunol Baltim Md 1950. 15 nov 2009;183(10):6489‑99.

32. Travelli C, Colombo G, Mola S, Genazzani AA, Porta C. NAMPT: A pleiotropic modulator of monocytes and macrophages. Pharmacol Res. 18 juill 2018;135:25‑36.

33. Liu P, Li H, Cepeda J, Xia Y, Kempf JA, Ye H, et al. Regulation of inflammatory cytokine expression in pulmonary epithelial cells by pre-B-cell colony-enhancing factor via a nonenzymatic and AP-1-dependent mechanism. J Biol Chem. 2 oct 2009;284(40):27344‑51.

34. Liu P, Li H, Cepeda J, Zhang LQ, Cui X, Garcia JGN, et al. Critical role of PBEF expression in pulmonary cell inflammation and permeability. Cell Biol Int. janv 2009;33(1):19‑30.

35. Li H, Liu P, Cepeda J, Fang D, Easley RB, Simon BA, et al. Augmentation of Pulmonary Epithelial Cell IL-8 Expression and Permeability by Pre-B-cell Colony Enhancing Factor. J Inflamm Lond Engl. 22 sept 2008;5:15.

36. Wu G-C, Liao W-I, Wu S-Y, Pao H-P, Tang S-E, Li M-H, et al. Targeting of nicotinamide phosphoribosyltransferase enzymatic activity ameliorates lung damage induced by ischemia/reperfusion in rats. Respir Res. 24 2017;18(1):71.

37. Demoor T, Bracke KR, Dupont LL, Plantinga M, Bondue B, Roy M-O, et al. The role of ChemR23 in the induction and resolution of cigarette smoke-induced inflammation. J Immunol Baltim Md 1950. 1 mai 2011;186(9):5457‑67.

38. Bondue B, Vosters O, de Nadai P, Glineur S, De Henau O, Luangsay S, et al. ChemR23 dampens lung inflammation and enhances anti-viral immunity in a mouse model of acute viral pneumonia. PLoS Pathog. nov 2011;7(11):e1002358.

39. Shirato K, Ujike M, Kawase M, Matsuyama S. Identification of CCL2, RARRES2 and EFNB2 as host cell factors that influence the multistep replication of respiratory syncytial virus. Virus Res. 2 déc 2015;210:213‑26.

Discussion de l'article n°3

Dans ce travail, nous avons exploré le lien entre quatre adipokines (leptine, adiponectine, visfatine, chémérine) et les cellules épithéliales bronchiques humaines.

Nous avons montré que seule l'adiponectine exercait un effet significatif sur la production de cytokines-chimiokines. L'APN est produite par des explants de bronches, qui comprennent de l'épithélium bronchique mais également du cartilage, des cellules musculaires lisse bronchiques, du tissu conjonctif et pulmonaire adjacent, des cellules immunitaires résidentes. Les cellules épithéliales bronchiques ne semblent pas produire d'APN mais ces cellules expriment AdipoR1 et AdipoR2, suggérant une action d'APN par voie paracrine.

L'effet d'APN était variable selon la cytokine considérée: elle réduisait la production de CXCL1 et CCL2 basale et induite par le TNF-α alors qu'elle augmentait la production basale de CXCL8, CCL20 et IL-6 et ne modifiait pas celle de CCL5.

Cet effet différentiel pourrait s'expliquer par le type de récepteur impliqué. Précédemment, nous avons montré dans notre modèle de macrophages pulmonaires, en inactivant successivement l'un des deux récepteurs à l'APN, que la sécrétion des cytokines étaient modulée différemment selon le récepteur considéré (voir article n°2, résultats complémentaires, figure 26). Dans les cellules épithéliales bronchiques, AdipoR1 était exprimé à un niveau bien plus élevé que AdipoR2 par les cellules épithéliales. Des études complémentaires sont nécessaires pour explorer le rôle respectif des récepteurs de l'APN dans la production de cytokines par les cellules épithéliales bronchiques.

Au total, l'adiponectine est une adipokine capable de modifer le fonctionnement de cellules épithéliales bronchiques humaines. La diminution de la concentration d'APN que l'on observe au cours de l'obésité pourrait perturber les phénomènes d'immunorégulation bronhique en réponse à une infection respiratoire ou dans un contexte de pathologie bronchique chronique.

Il sera intéressant de compléter ce travail par des expériences en présence d'une stimulation par du Poly(I:C). Celui-ci mime l'agression virale dont les cellules épithéliales bronchiques sont la cible préférentielle. Cependant, le profil et le niveau de production des cytokines en réponse au TNF-α ne semblent pas différents de ceux observés avec le Poly(I:C) (données laboratoire UPRES EA220). L'étude de l'effet de l'APN dans ce contexte apporterait à la compréhension de la susceptibilités des sujets obèses aux maladies virales respiratoires et aux maladies bronchiques chroniques (451) (452).

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Au cours de ces travaux, nous avons exploré le lien entre adipokines et immunité innée pulmonaire.

Dans un modèle de tissu pulmonaire humain, nous avons montré que :

- L'adiponectine est produite par le parenchyme pulmonaire et que sa concentration dans le poumon évolue de la même façon que dans le sang : concentration élevée, inversement corrélée à l'IMC.
- La production d'adiponectine par les explants de parenchyme et de bronches n'est le fait ni des macrophages, ni des cellules épithéliales bronchiques.
- Les deux types de récepteur AdipoR1 et AdipoR2 sont exprimés par les macrophages pulmonaires et les cellules épithéliales bronchiques humaines.
- L'adiponectine module de façon significative la polarisation des macrophages pulmonaires : elle n'a pas d'effet sur les macrophages non stimulés mais inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires induite par le LPS et le Poly (I :C) ou l'IL-4.
- L'adipoRon, agoniste synthétique des récepteurs à l'adiponectine, présente le même effet que l'adiponectine recombinante sur les macrophages pulmonaires.
- En comparaison, les autres adipokines ont un impact moins important puisque la leptine augmente la production de TNF-α, IL-6, CCL3, CCL5, CXCL8 par des macrophages pulmonaires non stimulés seulement à la plus forte concentration (qui sort des rangs physiologiques) et que la visfatine et la chémérine n'ont pas d'effet sur la production de cytokines.

Par ailleurs, nous avons également étudié l'effet de ces adipokines sur des cellules épithéliales bronchiques humaines. Nous avons montré que l'APN réduit la production basale et stimulée par le TNF-α de CXCL1 et CCL2 alors qu'elle augmente la production basale de CXCL8, CCL20 et IL-6 et ne modifie pas celle de CCL5. Les autres adipokines, leptine, visfatine, chémérine ne modulent pas la production de cytokines par les cellules épithéliales bronchiques.

Au total l'adiponectine ressort comme la principale adipokine d'intérêt au sein du système respiratoire humain. Elle exerce un effet anti-inflammatoire sur les macrophages pulmonaires et module le fonctionnement des cellules épithéliales bronchiques.

L'originalité de nos travaux tient à la nature de notre modèle d'étude, mis au point à partir de tissu humain. Il s'agit des premiers travaux caractérisant l'effet des adipokines sur des macrophages pulmonaires humains. Le choix du modèle est essentiel car il existe des différences phénotypiques importantes inter-espèces (macrophages murins vs humains) et

entre des monocytes, macrophages dérivés de monocytes et macrophages tissulaires. Nous avons voulu, par la mise au point de ces cultures primaires d'explants de parenchyme, de bronches et de macrophages pulmonaires, nous rapprocher au plus près de la physiologie pulmonaire humaine. Les explants ont été obtenus à partir de pièces de lobectomie de patients opérés pour cancer ; ce contexte pathologique pourrait influencer l'état d'activation des macrophages mais nous avons pris soin de prélever le parenchyme en zone saine, à distance de la tumeur et il n'existe aucun élément formel dans la littérature qui permette de différencier la réponse de macrophages isolés de patients témoins non fumeurs, fumeurs ou souffrant de BPCO. Par ailleurs, en choisissant de mettre les macrophages en situation polarisante M1 (traitement par LPS, Poly (I :C)) ou M2 (traitement par IL-4), nous nous affranchissons en partie de l'effet que pourrait avoir la pathologie tumorale sur leur état d'activation.

Certains de nos résultats recoupent les observations faites dans d'autres modèles mais apportent des précisions quant au fonctionnement des macrophages tissulaires pulmonaires humains en présence d'adipokines. Nous avons vérifié la présence d'adipokines dans le tissu pulmonaire humain, tout comme d'autres auteurs avaient montré qu'elles étaient dosables dans diverses préparations issues du système respiratoire : lavage broncho-alvéolaire (231) (245) (246) (210), crachats induits (231), immunohistochimie sur coupe histologiques de poumons (244). L'adiponectine exerce un effet clairement anti-inflammatoire sur les macrophages pulmonaires. De même, nous avons trouvé un effet stimulant de la leptine sur la production de cytokines pro-inflammatoires par des macrophages pulmonaires mais seulement à une forte concentration, alors que d'autres auteurs décrivaient cet effet à partir de concentrations beaucoup plus faibles dans des macrophages murins ou des MDM (402) (403) (406). Enfin, alors que certains auteurs suggéraient un effet stimulant de la visfatine sur la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par des monocytes (414) et un effet inhibiteur de la chémérine sur des macrophages murins (417), ces deux adipokines n'ont dévoilé aucun effet dans notre modèle de macrophages pulmonaires humains.

Nos résultats démontrent que les macrophages pulmonaires humains se comportent différemment de macrophages différenciés en culture à partir de monocytes circulants lorsqu'ils sont mis en présence d'adipokines. D'autres travaux de notre équipe avaient précédemment pointé une différence entre ces types cellulaires sanguins pour ce qui concerne l'effet des agonistes β2-adrénergiques et l'expression de leurs récepteurs (324). Ceci s'explique par le fait qu'au moins une partie de ces macrophages résidents ne dérivent pas de progéniteurs hématopoiétiques et souligne l'importance du microenvironnement dans la détermination du phénotype cellulaire.

L'obésité est un état pathologique associé à un stress biologique et une inflammation chronique, qui engendrent de nombreuses co-morbidités, notamment respiratoires. Au cours de la prise de poids, il se produit des modifications importantes du tissu adipeux, sur le plan morphologique et hormonal. Les variations de production d'adipokines par les adipocytes sont considérées comme l'un des principaux facteurs à l'origine de la dérégulation du métabolisme énergétique, de l'inflammation vasculaire et de certaines dysfonctions d'organe. La concentration d'adiponectine diminue dans le sang et le poumon au cours de l'obésité. Nous avons souligné le rôle essentiel que joue cette adipokine au sein du système respiratoire humain, en maintenant les macrophages pulmonaires dans un état d'activation quiescent et en modulant le fonctionnement des cellules épithéliales bronchiques. En cas d'obésité, la diminution des taux d'APN pourrait alors s'accompagner d'une levée de ce frein et expliquer une réponse inflammatoire exagérée aux agents exogènes inhalés.

Ainsi, la variation du taux d'adiponectine est probablement l'une des clés pour comprendre certaines manifestations respiratoires associées à l'obésité : susceptibilité infectieuse, inflammation bronchique et développement de maladies bronchiques chroniques. Ces constatations sont d'autant plus importantes que l'on pourrait imaginer y pallier par un apport d'APN exogène ou l'utilisation d'agonistes de synthèse des récepteurs de l'adiponectine. Ceci souligne l'intérêt de cibler les récepteurs de l'APN pour le développement de nouvelles thérapeutiques, par voie générale ou inhalée, dans la prise en charge des maladies bronchiques associées à l'obésité.

Dans une dernière partie, nous avons poursuivi nos travaux par l'étude de l'effet des adipokines sur la réactivité bronchique. Nous avons mené des expériences fonctionnelles sur le tonus bronchique en utilisant un modèle d'anneaux bronchiques en cuve à organe isolé. Les résultats de ces travaux ont donné lieu au dépôt d'un brevet européen, exposé en annexe n°1.

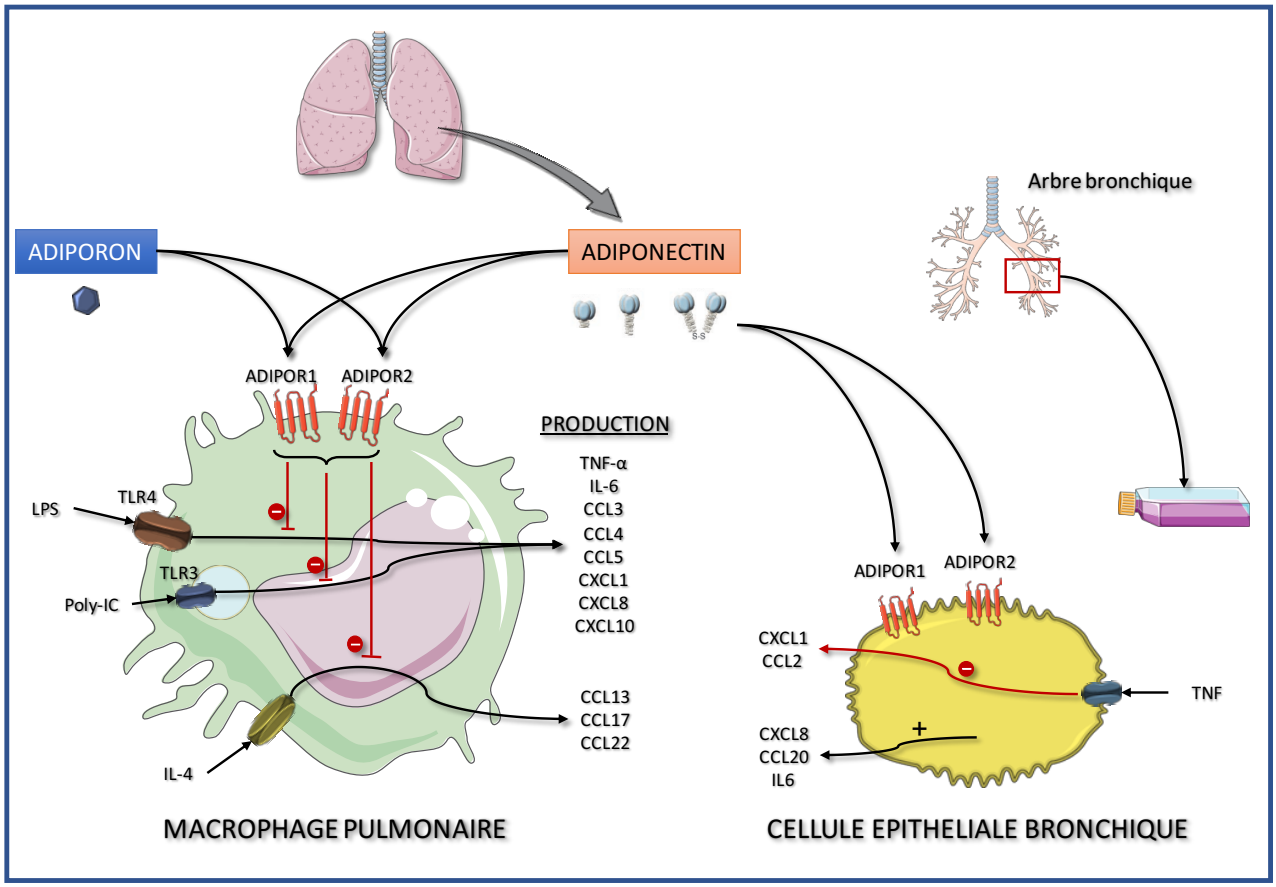


Figure 27. Schéma récapitulatif de l'action de l'adiponcetine et AdipoRon sur la production de cytokines et chimiokines par des macrophages pulmonaires humains et des cellules épithéliales bronchiques humaines.

ANNEXES

- **Annexe 1 = Brevet européen N° 17306792.7 déposé en Décembre 2017**

- **Annexe 2 = article n°4**

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

C Abrial[1,2], S Grassin-Delyle[1,2], **H Salvator[1,2]**, M Brollo[1], E Naline[1,2] and P Devillier[1,2]

Br J Pharmacol. 2015 Sep;172(17):4319-30. doi: 10.1111/bph.13210

Résumé:

L'activité de la 15-lipoxygénase (15-LOX) est associée à l'inflammation et à la régulation immunitaire. Les objectifs de l'étude étaient d'examiner l'expression de 15-LOX-1 et de 15-LOX-2 et d'évaluer le rôle de ces enzymes dans la polarisation des macrophages pulmonaires (LM) humains de type M1 (LPS) et M2 (IL-4/IL-13).

Des LM ont été cultivés en présence d'un inhibiteur de 15-LOX (PD146176 ou ML351), un inhibiteur de COX (indométacine), un inhibiteur de 5-LOX (MK886) ou le solvant, puis stimulées avec du LPS (10 $ng.mL^{-1}$), IL-4. (10 $ng.ml^{-1}$) ou IL-13 (50 $ng.ml^{-1}$) pendant 24 h. Les niveaux de transcription de ALOX15 (15-LOX-1) et ALOX15B (15-LOX-2) ont été déterminés par RT-qPCR. Des dosages ELISA ont été utilisés pour mesurer les niveaux de cytokines induites par le LPS (TNF-α, CCL2, CCL3, CCL4, CXCL1, CXCL8 et CXCL10) et induites par IL-4/IL-13 (CCL13, CCL13).

La stimulation des LM par le LPS était associée à une expression accrue d'ALOX15B, alors qu'une stimulation par IL-4 / IL-13 induisait l'expression d'ALOX15. PD146176 et ML351 (10 μM) réduisaient la libération des chimiokines induite le LPS et les cytokines Th2. Les effets de ces inhibiteurs de 15-LOX ont été maintenus en présence d'indométacine et de MK886. En outre, l'indométacine a révélé l'effet inhibiteur de PD146176 sur la libération de TNF-α.

L'inhibition des voies 15-LOX est impliquée dans la régulation de la production *in vitro* de chimiokines par les LM. Nos résultats suggèrent que les voies du 15-LOX jouent un rôle dans la pathogenèse des affections inflammatoires du poumon et pourraient donc constituer une cible thérapeutique potentielle.

BJP British Journal of Pharmacology

DOI:10.1111/bph.13210
www.brjpharmacol.org

RESEARCH PAPER

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

Correspondence
P. Devillier, Laboratoire de Pharmacologie UPRES EA220, Hôpital Foch, 11 rue Guillaume Lenoir, F-92150 Suresnes, France. E-mail: p.devillier@hopital-foch.org

Received
30 July 2014
Revised
1 April 2015
Accepted
27 May 2015

C Abrial[1,2], S Grassin-Delyle[1,2], H Salvator[1,2], M Brollo[1], E Naline[1,2] and P Devillier[1,2]

[1]*Laboratoire de Pharmacologie UPRES EA220, Hôpital Foch, Suresnes, France, and* [2]*UFR Sciences de la santé, Université Versailles Saint Quentin, Saint Quentin en Yvelines, France*

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 the enzymes' roles in the polarization of human lung macrophages (LMs) in response to LPS and Th2 cytokines (IL-4/-13).

EXPERIMENTAL APPROACH
LMs were isolated from patients undergoing surgery for carcinoma. The cells were cultured with a 15-LOX inhibitor (PD146176 or ML351), a COX inhibitor (indomethacin), a 5-LOX inhibitor (MK886) or vehicle and then stimulated with LPS (10 ng·mL^{-1}), IL-4 (10 ng·mL^{-1}) or IL-13 (50 ng·mL^{-1}) for 24 h. Levels of *ALOX15* (15-LOX-1) and *ALOX15B* (15-LOX-2) transcripts were determined by real-time quantitative PCR. Immunoassays were used to measure levels of LPS-induced cytokines (TNF-α, CCL2, CCL3, CCL4, CXCL1, CXCL8 and CXCL10) and Th2 cytokine-induced chemokines (CCL13, CCL18 and CCL22) in the culture supernatant.

KEY RESULTS
Stimulation of LMs with LPS was associated with increased expression of *ALOX15B*, whereas stimulation with IL-4/IL-13 induced the expression of *ALOX15*. PD146176 and ML351 (10 μM) reduced the release of the chemokines induced by LPS and Th2 cytokines. The effects of these 15-LOX inhibitors were maintained in the presence of indomethacin and MK886. Furthermore, indomethacin revealed the inhibitory effect of PD146176 on TNF-α release.

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

Abbreviations
FCS, fetal calf serum; 15-HETE, 15-hydroxyeicosatetraenoic acid; 13-HODE, 13-hydroxy octadecadienoic acid; HPRT, hypoxanthine phosphoribosyltransferase; LM, lung macrophage; LOX, lipoxygenase; MDM, monocyte-derived macrophage

© 2015 The British Pharmacological Society

Tables of Links

TARGETS	
Catalytic receptors[a]	**Enzymes**[b]
IL-4 receptor	COX-1
	COX-2
	5-LOX
	12-LOX
	15-LOX-1
	15-LOX-2

LIGANDS		
13-HODE	CCL13	IL-4
15-HETE	CCL18	IL-13
Arachidonic acid	CCL22	Indomethacin
CCL2	CXCL1	LPS
CCL3	CXCL8	MK886
CCL4	CXCL10	TNF-α

These Tables list key protein targets and ligands in this article which are hyperlinked to corresponding entries in http://www.guidetopharmacology.org, the common portal for data from the IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY (Pawson *et al.*, 2014) and are permanently archived in the Concise Guide to PHARMACOLOGY 2013/14 ([a,b]Alexander *et al.*, 2013a,b).

Introduction

Human lipoxygenases (LOXs) catalyse the stereoselective dioxygenation of 1,4-cis, cis-pentadiene-containing polyunsaturated fatty acids (such as arachidonic acid) to form hydroperoxyfatty 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 *ALOX15* and *ALOX15B* genes) (Dobrian *et al.*, 2011). In the lung, the different products resulting from the enzymatic activity of 15-LOXs can stimulate inflammation and mucus secretion (as is the case for 15-HETE and 13-HODE) or resolve inflammation and stimulate tissue repair (as is the case for lipoxin, resolvins and protectins) (Back *et al.*, 2014; Levy and Serhan, 2014).

Increased 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 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 epithelial cells, the Th2 cytokines IL-4 and IL-13 are potent inducers of 15-LOX expression (Jayawickreme *et al.*, 1999; Profita *et al.*, 1999; Brown *et al.*, 2001; Chaitidis *et al.*, 2005; Kuhn and O'Donnell, 2006; Jakiela *et al.*, 2013). In the human alveolar epithelial cell line A549, the overexpression of 15-LOX-1 is associated with enhanced 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. Upon exposure to microbial products such as bacterial LPS, macrophages undergo M1 polarization (the classical activation state, associated with microbicidal and tumouricidal activities) (Mantovani *et al.*, 2004; Benoit *et al.*, 2008). In contrast, Th2 cytokines induce polarization towards a different activation status (referred to as M2a polarization), which is associated with immunoregulation, the dampening of inflammation and the promotion of tissue remodelling (Benoit *et al.*, 2008; Van Dyken and Locksley, 2013). In line with recent guidelines on macrophage activation and polarization (Murray *et al.*, 2014), we shall henceforth use the terms 'LPS-induced polarization' and 'IL-4/IL-13 (Th2)-induced polarization' (rather than the M1-M2 terminology). These two activation states involve the production of different sets of cytokines and (especially) chemokines (Martinez *et al.*, 2006; Sica and Mantovani, 2012).

In vitro, *ALOX15B* expression increases as monocytes differentiate into macrophages. In monocyte-derived macrophages (MDMs), *ALOX15* expression increases in response to Th2 cytokines and *ALOX15B* expression increases in response to Th2 cytokines and LPS (Wuest *et al.*, 2012). In human MDMs, the overexpression of 15-LOX-2 results in the enhanced secretion of two chemokines (CCL2 and CXCL10) (Danielsson *et al.*, 2008). However, the expression levels and functions of 15-LOXs 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 chemokines induced by LPS- and Th2 cytokines.

Methods

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 39 patients [mean ± SEM age: 65 ± 2 years; gender (M : F): 29:10; mean ± SEM FEV_1/FVC ratio: 0.82 ± 0.04; non-smokers: 7; smokers and ex-smokers: 12 and 20; pack years: 46 ± 4] undergoing surgical resection for lung carcinoma and who had not received chemotherapy or radiotherapy. The patients had not received any specific

medications other than the anaesthetics required for the surgery and (in just four patients) the antibiotics cefazoline or cefamandole. The LMs were isolated from macroscopically normal lung parenchyma obtained from sites far from the tumour, as previously described (Buenestado *et al.*, 2010; 2012) (see Supporting Information). In culture, the mean ± SEM number of adherent macrophages was 194 ± 13 × 10^3 cells per well for 24-well plates and 482 ± 35 × 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. On 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.

Classically activated (M1-like) macrophages were obtained by exposure to LPS. Alternatively activated (M2a-like) macrophages were produced by exposing them to the canonical Th2 cytokines IL-4 and IL-13 *in vitro*. The LPS concentration (10 ng·mL^{-1}) was selected as being suboptimal on the basis of previous data from time-response and concentration-response curves (Buenestado *et al.*, 2012). The IL-4 concentration (10 ng·mL^{-1}) was chosen on the basis of previous findings from human macrophage models (Joshi *et al.*, 2010; Pechkovsky *et al.*, 2010; Staples *et al.*, 2012). The IL-13 concentration (50 ng·mL^{-1}) was chosen on the basis of previous experiments in our laboratory (data not shown).

RT-qPCR

Lung macrophages were stimulated for 24 h with LPS, IL-4 or IL-13. Total RNA was prepared using TRIzol® reagent (Life Technologies, Saint Aubin, France), according to the manufacturer's instructions. The RNAs' intactness was determined by running an aliquot of each sample on an Experion™ automated electrophoresis station (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Next, 1 µg of total RNA was reverse-transcribed using SuperScript® III First-strand SuperMix kit (Life Technologies).

Specific TaqMan® arrays based on predesigned reagents (Life Technologies) were used for the analysis of LOX and COX transcripts: *ALOX5* (5-LOX), *ALOX5AP* (5-LOX activating protein), *ALOX12* (12-LOX), *ALOX15* (15-LOX-1), *ALOX15B* (15-LOX-2), *PTGS1* (COX-1) and *PTGS2* (COX-2). 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 s and 60°C for 1 min. The housekeeping gene coding for hypoxanthine phosphoribosyltransferase (*HPRT1*) was used for signal normalization.

Assay of 15-LOX activity

15-HETE concentrations in the culture supernatant were measured using a commercially available enzyme immunoassay kit (Cayman Chemical Europe, Tallinn, Estonia), according to the manufacturer's instructions. No arachidonic acid was added to the preparation. The limit of detection was 170 pg·mL^{-1}. 15-HETE concentrations were expressed in pg per 10^6 LMs.

Effect of the inhibition of 15-LOX, 5-LOX and COX on the LPS- and IL-4/13-induced production of cytokines

Lung macrophages were treated with specific 15-LOX inhibitors [such as PD146176 (1–10 µM; Gregus *et al.*, 2013)] and ML351 (1–10 µM; Rai *et al.*, 2010) or DMSO vehicle for 1 h before stimulation with LPS, IL-4 or IL-13 for 24 h.

In order to investigate the involvement of 15-LOXs in cytokine release, a non-selective COX inhibitor (indomethacin, 1 µM; Buenestado *et al.*, 2012), a 5-LOX-activating protein inhibitor (MK886, 1 µM) or the corresponding vehicles were added to the culture 30 min before addition of the 15-LOX inhibitors (or vehicle) and exposure of the macrophages to LPS, IL-4 or IL-13 for 24 h. The concentrations of PD146176, ML351 and MK886 used were those reported in the literature as selectively inhibiting the target enzymes (Gillard *et al.*, 1989; Menard *et al.*, 1990; Sendobry *et al.*, 1997; Rai *et al.*, 2010).

Stock solutions (10 mM) of PD146176, ML351, MK886 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. The cytotoxicity of PD146176, indomethacin and MK886 was determined by measuring LDH activity in LM supernatants (LDH assay; Cayman Chemical Europe). Neither the vehicles nor the compounds used in this study altered the viability of LMs (Supporting Information Table S1). All wells were run in duplicate. After 24 h of incubation, LM supernatants were collected, stored at −20°C and subsequently assayed for cytokines.

Cytokine measurements

Levels of cytokine in the culture supernatant were measured with specific ELISAS (the Duoset Development System from R&D Systems), according to the manufacturer's instructions. The supernatant was 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 ng per 10^6 LMs. The assays' limits of detection were 4 pg·mL^{-1} for CCL3, CCL13, CCL18, CCL22, 8 pg·mL^{-1} for TNF-α, CCL2, CCL4, and 32 pg·mL^{-1} for CXCL1, CXCL8 and CXCL10.

Data analysis and statistical procedures

Data are expressed as the mean ± SEM from experiments performed with LMs obtained from *n* patients. The concentration–effect curves were analysed using GraphPad Prism® software (version 5.01; GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). The relative expression of mRNAs was calculated according to the $2^{(-\Delta Ct)}$ method (Livak and Schmittgen, 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 ANOVA, followed by Bonferroni's post-test. The threshold for statistical significance was set to $P < 0.05$.

Materials

PD146176 (6,11-dihydrol[1]benzothiopyrano[4,3-b]indole) and MK886 were obtained from Tocris Biosciences (Bristol,

UK). ML351 was obtained from Merck Chemicals (Nottingham, UK). RPMI 1640 medium and BSA were acquired from Eurobio Biotechnology (Les Ulis, France). Indomethacin, penicillin-streptomycin, DMSO, L-glutamine, trypan blue dye, fetal calf serum (FCS) and LPS (from *Escherichia coli* serotype 0111:B4) were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Human recombinant IL-13 and IL-4 were obtained from R&D Systems (Lille, France).

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 1A).

Quantitative analysis revealed that IL-4 and IL-13 increase the expression of *ALOX15* transcripts but not *ALOX15B* transcripts. Conversely, incubation with LPS was associated with greater expression of *ALOX15B* transcripts but not *ALOX15* transcripts (Figure 1A). A time-course experiment also showed an increase in *ALOX15* expression 12 h after exposure to the Th2 cytokines (Supporting Information Fig. S1). Furthermore, the results of Western blotting experiments showed that 15-LOX-1 and 15-LOX-2 are expressed in unstimulated macrophages: marked inductions of 15-LOX-2 by LPS and of 15-LOX-1 were seen after 48 h (but not after just 24 h) of stimulation by IL-4 (Supporting Information Fig. S2).

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

In order to assess the effects of LPS and IL-4 on the activity of the 15-LOXs, we measured the supernatant concentration of the arachidonic acid metabolite 15-HETE (produced by both 15-LOX-1 and 15-LOX-2). Exposure to LPS was associated with increased 15-HETE production by LMs. This relative increase was abolished in the presence of PD146176. Incubation with IL-4 was not associated with an increase in the production of 15-HETE (Table 1).

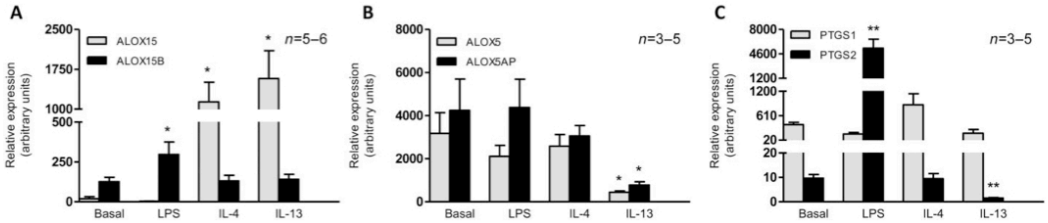


Figure 1

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

Table 1

15-LOX activity in polarized human LMs

	Baseline	PD 10 μM	LPS only	LPS + PD 10 μM	IL-4 only	IL-4 + PD 10 μM
15-HETE (pg per 10^6 LMs)	176 ± 47	167 ± 38	420 ± 95##	191 ± 15**	183 ± 34	222 ± 39

Lung macrophages were incubated for 1 h in the presence or absence of PD146176 before the addition of LPS (10 ng·mL^{-1}) or IL-4 (10 ng·mL^{-1}). 15-HETE levels were determined in the LM culture supernatant collected after 24 h of incubation. The data are reported as the mean ± 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 chemokines

Cytokine (ng per 10^6 LMs)	Baseline	LPS only	PD 1 μM + LPS	PD 10 μM + LPS
CCL2	1.50 ± 0.58	17.57 ± 3.49##	21.05 ± 4.50	9.13 ± 3.66*
	n = 8	*n* = 8	*n* = 8	*n* = 8
CCL3	0.95 ± 0.40	233.38 ± 24.88###	230.71 ± 27.45	164.45 ± 14.96*
	n = 6	*n* = 6	*n* = 6	*n* = 6
CCL4	1.67 ± 0.17	353.26 ± 42.85##	319.16 ± 38.10	236.25 ± 48.50***
	n = 10	*n* = 10	*n* = 10	*n* = 10
CXCL1	0.19 ± 0.06	208.17 ± 28.68###	190.02 ± 21.01	95.20 ± 26.88**
	n = 7	*n* = 7	*n* = 7	*n* = 7
CXCL8	12.24 ± 2.77	920.67 ± 182.02##	949.28 ± 162.56	491.97 ± 138.92**
	n = 6	*n* = 6	*n* = 6	*n* = 6
CXCL10	0 (LD)	8.12 ± 2.61#	2.55 ± 0.66[5]	3.10 ± 1.36*
	n = 10	*n* = 10	*n* = 5	*n* = 10

Human lung macrophages were incubated for 1 h in the presence of PD146176 (1–10 μM) or vehicle (the baseline condition) before being stimulated with LPS (10 ng·mL^{-1}) for 24 h. The concentrations of the chemokines in the culture supernatant were measured using ELISAs. The data are reported as the mean ± SEM of 5–10 independent experiments.

#Indicates a significant difference relative to the baseline condition (#$P < 0.05$; ##$P < 0.01$; ###$P < 0.001$).

Indicates a significant difference relative to LPS alone ($P < 0.05$; **$P < 0.01$; ***$P < 0.001$). Data for the vehicle are not shown because 0.1% DMSO had no effect on cytokine production.

[5]Not significant versus the five paired preparations of macrophages exposed to LPS (LPS: 4.34 ± 1.44 ng per 10^6 cells).

Table 3

Inhibitory effect of PD146176 on the IL-4- and IL-13-induced release of chemokines

Cytokine (ng per 10^6 LMs)	Baseline	IL-4 only	PD 1 μM + IL-4	PD 10 μM + IL-4
CCL13	0.038 ± 0.011	0.23 ± 0.06#	0.25 ± 0.08	0.09 ± 0.04**
CCL18	96.02 ± 22.41	101.70 ± 16.75	99.69 ± 22.78	59.32 ± 20.17*
CCL22	1.12 ± 0.30	4.73 ± 0.10##	5.93 ± 1.22	2.27 ± 0.63*
	Baseline	**IL-13 only**	**PD 1 μM + IL-13**	**PD 10 μM + IL-13**
CCL13	0.04 ± 0.01	0.56 ± 0.14#	0.40 ± 0.17	0.18 ± 0.11**
CCL18	91.67 ± 23.00	112.97 ± 19.05	118.31 ± 22.02	78.96 ± 22.83
CCL22	1.12 ± 0.30	4.75 ± 1.18##	5.42 ± 1.10	3.37 ± 0.88*

Lung macrophages were incubated for 1 h in the presence or absence (the baseline condition) of PD146176 (1–10 μM) or vehicle before being stimulated with (IL-4 10 ng·mL^{-1}) or IL-13 (50 ng·mL^{-1}) for 24 h. The concentrations of chemokines in the culture supernatant were measured using ELISAs. The data are reported as the mean ± SEM of five to eight independent experiments.

#Indicates a significant difference relative to the baseline condition (#$P < 0.05$; ##$P < 0.01$).

Indicates a significant difference relative to IL-4 or IL-13 ($P < 0.05$; **$P < 0.01$).

Inhibition of 15-LOX activity reduces the LPS- and IL-4/13-induced release of chemokines by human LMs

Effects of LPS, IL-4 and IL-13 on cytokine production by LMs. Incubation with LPS was associated with a marked increase in the production of CCL2, CCL3, CCL4, CXCL1, CXCL8 and CXCL10 (Table 2) but did not alter (or only weakly altered) the production of CCL13, CCL18 and CCL22 (Supporting Information Table S2).

Conversely, incubation with IL-4 or IL-13 was associated with a significant increase in the production of CCL13 and CCL22, whereas the production of CCL18 remained unchanged (Table 3).

Furthermore, the production of LPS-inducible chemokines was only weakly altered or not altered by Th2 cytokines (Supporting Information Table S3). These different effects of LPS and Th2 cytokines were also observed for mRNA expression of the cytokines (Supporting Information

Table 4

The inhibitory effect of PD146176, indomethacin and MK886 on the LPS-induced release of TNF-α in human LMs

Cytokine (ng per 10^6 LMs)	LPS	LPS + PD 10 μM	+ Indomethacin 1 μM		+ MK 886 1 μM		+ Indomethacin 1 μM + MK 886 1 μM	
			LPS	LPS + PD 10 μM	LPS	LPS + PD 10 μM	LPS	LPS + PD 10 μM
TNF-α	19.7 ± 6.2##	18.2 ± 5.5	31.1 ± 9.0++	18 ± 5.5**	17.3 ± 5.6	20.1 ± 6.5	31.5 ± 9.3++	19.2 ± 4.5**

Lung macrophages were exposed to medium alone (the baseline condition) or medium supplemented with indomethacin or MK886 or vehicles for 30 min before being pre-incubated for 1 h with PD146176 or vehicle before stimulation with LPS (10 ng·mL^{-1}). Levels of TNF-α in the culture supernatant were determined after 24 h of incubation. Data are reported as the mean ± SEM of four independent experiments.
#Indicates a significant difference relative to the baseline condition (0.2 ± 0.05 ng per 10^6 cells ##$P < 0.01$).
+Indicates a significant difference relative to LPS alone (++$P < 0.01$).
*Indicates a significant difference relative to the corresponding controls (**$P < 0.01$).

Table S4). The relative effects of LPS and IL-4/IL-13 on the production of TNF-α and the panels of chemokines indicate that (i) TNF-α, CCL2, CCL3, CCL4, CXCL1 and CXCL10 constitute an LPS-induced signature; and (ii) CCL13 and CCL22 constitute a Th2 signature.

Effect of inhibiting 15-LOX on the production of cytokines by LMs. As *ALOX15* and *ALOX15B* were expressed in human LMs, we next assessed the effect of a 15-LOX inhibitor (PD146176, which inhibits both 15-LOX-1 and 15-LOX-2) on the production of the cytokines induced by LPS and IL-4/IL-13. At a concentration of 10 μM, PD146176 reduced the respective LPS- and IL-4/IL-13-induced increases in *ALOX15* and *ALOX15B* gene expression but did not alter (or only weakly altered) the transcript expression of other genes involved in the eicosanoid pathways (Supporting Information Figs S3 and S4). Inhibition of 15-LOX isoenzymes by PD146176 was associated with a lower production of CCL2, CCL3, CCL4, CXCL1, CXCL8 and CXCL10 induced by LPS, with relative reductions of 48, 29, 33, 54, 46 and 56% respectively (Table 2). Similarly, the production of the chemokines CCL13, CCL22 and CCL18, induced by IL-4- and IL-13, was significantly lower in the presence of PD146176, with relative reductions of 58, 37 and 52% for IL-4 induction and 67, 28 and 29% for IL-13 induction respectively (Table 3). Lastly, the production of TNF-α was not significantly reduced (relative reduction: 6%) after incubation with PD146176 (Table 4).

Inhibition of 15-LOX-1 by ML351 (10 μM) was associated with significant inhibition of the LPS-induced production of CCL2 and CCL3 (relative reductions: 47 and 37% respectively) and the IL-4-induced production of CCL13 and CCL22 (relative reductions: 55 and 57% respectively) (Table 5).

Confirmation of the specific involvement of the 15-LOX pathway in the LPS- and IL-4/IL-13-induced production of cytokines by LMs

The *ALOX5*, *ALOX5AP*, *PTGS1* and *PTGS2* genes are expressed and modulated by LPS and Th2 cytokines in human LMs. The corresponding enzymes share a substrate (arachidonic acid) with the 15-LOXs. We hypothesized that inhibition of 15-LOXs might deviate the arachidonic acid towards other eicosanoid pathways that might be involved in the effect of 15-LOX inhibitors on cytokine production. To ascertain the role of the 15-LOX pathways, LMs were pretreated with an inhibitor of 5-LOX-activating protein (MK886) and a non-selective COX inhibitor (indomethacin) before the addition of PD146176 or ML351. Neither indomethacin nor MK886 (whether present alone or together) was associated with differences in the production of cytokines (other than CXCL8) and TNF-α (Figure 2). The production of CXCL8 was found to be lower after incubation with indomethacin alone and with indomethacin + MK886 (Figure 2E). However, TNF-α production was higher with indomethacin alone and with indomethacin + MK886 (Table 4). Inhibition of the production of both the LPS- and the IL-4/IL-13-induced chemokines by PD146176 was maintained in the presence of indomethacin and MK886 (whether present alone or together) (Figure 2A–F and Figure 3A–F).

PD146176 still inhibited CXCL8 production when the LMs were pretreated with indomethacin (Figure 2E) or MK886 alone. However, the inhibitory effect of PD146176 on CXCL8 production was not observed when LMs were incubated with indomethacin and MK886 together (Figure 2E). Inhibition of COXs by indomethacin revealed the inhibitory effect of PD146176 on LPS-induced TNF-α production (Table 4).

Similar results were obtained with ML351. Inhibition of the production of chemokines induced by LPS and IL-4 by ML351 was maintained in the presence of indomethacin and MK886: the relative reductions in the LPS-induced production of CCL2 and CCL3 were respectively 47 and 37% ($P < 0.05$ for both), and the relative reductions of the IL-4-induced production of CCL13 and CCL22 were respectively 55 and 57% ($P < 0.05$ for both).

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-LOXs by PD146176 and ML351 was associated with reductions in

Table 5

Inhibitory effect of ML351 on the LPS- and IL-4-induced release of chemokines in human LMs

Cytokine (ng per 10^6 LMs)	With LPS		
	Baseline	ML351 1 μM	ML351 10 μM
CCL2	48.27 ± 3.97 *n* = 4	47.32 ± 5.41 *n* = 4	23.37 ± 4.87** *n* = 4
CCL3	184.96 ± 30.83 *n* = 4	164.69 ± 23.54 *n* = 4	117.04 ± 22.97** *n* = 4
	With IL-4		
Cytokine	**Baseline**	**ML351 1 μM**	**ML351 10 μM**
CCL13	0.093 ± 0.02 *n* = 5	0.10 ± 0.01 *n* = 5	0.034 ± 0.006** *n* = 5
CCL22	3.77 ± 1.34 *n* = 5	4.06 ± 1.4 *n* = 5	2.01 ± 0.79* *n* = 5

Lung macrophages were incubated for 1 h in the presence or absence (the baseline condition) of ML351 (1–10 μM) or vehicle before being stimulated with (LPS 10 ng·mL^{-1}) or IL-4 (10 ng·mL^{-1}) for 24 h. The concentrations of chemokines in the culture supernatant were measured using ELISAs. The data are reported as the mean ± SEM of four to five independent experiments.
Indicates a significant difference relative to LPS or IL-4 ($P < 0.05$; **$P < 0.01$). Data for the vehicle are not shown because 0.05% DMSO had no effect on cytokine production.

both the LPS-induced release of CCL2, CCL3, CCL4, CXCL1, CXCL8 and CXCL10, and the IL-4/IL-13-induced release of CCL13, CCL18 and CCL22.

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). In the present study, *ALOX15B* was found to be strongly expressed in unstimulated human LMs. The stimulation of human MDMs with Th2 cytokines was associated with greater expression of *ALOX15B*, whereas increased *ALOX15* expression was observed with IL-4 and (to a much lesser extent) 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 associated with greater expression of *ALOX15B* in both human MDMs (Wuest *et al.*, 2012) and human LMs (the present study). Our data suggest that the LPS-induced activation of human LMs led specifically to the expression of *ALOX15B*, whereas the Th2 cytokine-induced activation led to the expression of *ALOX15*. In Western blot experiments, a marked increase in protein expression of 15-LOX-1 and 15-LOX-2 was seen after 48 h of stimulation by Th2 cytokines and LPS but not after 24 h of stimulation (Supporting Information Fig. S2).

The different effects of IL-4 and IL-13 on the expression of *ALOX5*, *ALOX5AP*, *PTGS2* and other genes of the eicosanoid pathways (Supporting Information) are probably explained by the fact that IL-4 only binds to type I receptors, whereas IL-13 binds to both type I and type II receptors. Both types of receptor are expressed by macrophages, although the respective downstream signalling components differ. When compared with IL-13, IL-4 induces stronger expression of markers of alternative polarization of macrophages and may also yield a somewhat different biological response profile (Bhattacharjee *et al.*, 2013; Van Dyken and Locksley, 2013).

The slight increase in 15-HETE levels in the supernatant after exposure to LPS and the absence of an IL-4/IL-13-induced increase in the production of 15-HETE is probably explained by the incorporation of 15-HETE into the cell's phospholipids – thus limiting its release into the supernatant (Norris *et al.*, 2014). Profita *et al.* (1999) demonstrated that IL-4 not only enhances 15-LOX activity but also increases the incorporation of 15-HETE into phospholipids in pulmonary epithelial cells. This IL-4-induced increase in the incorporation of 15-HETE into phospholipids further limits the release of 15-HETE into the supernatant, and so may explain (at least in part) the absence of an increase in 15-HETE levels in the supernatant after exposure to IL-4 in the present study. The incorporation of 15-HETE into phospholipids might regulate or alter the intracellular signal transduction by reducing the amount and/or production of second messengers. Accordingly, the 15-HETE incorporated into cellular phospholipids has been shown to modulate the receptor-mediated activation of human neutrophils (Takata *et al.*, 1994). Although further investigation of these intracellular mechanisms was beyond the scope of the present study, the mechanisms might explain why inhibition of 15-LOX can reduce cytokine release in the absence of a change in 15-HETE release into the supernatant.

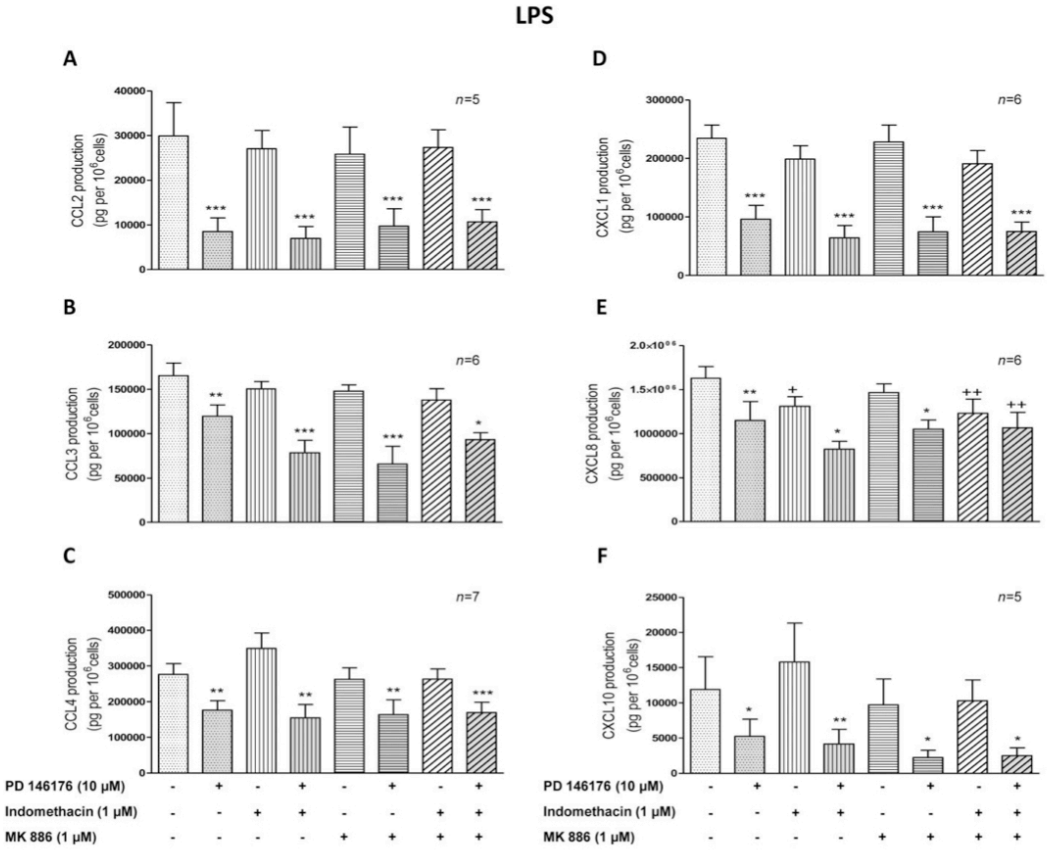


Figure 2

The roles of indomethacin and MK886 in the suppression of LPS-induced chemokine release from human LMs by PD146176. Human LMs were exposed to medium alone (the baseline condition) or medium supplemented with indomethacin (1 μM), MK886 (1 μM) or vehicles for 30 min before being pre-incubated for 1 h with PD146176 (10 μM) or vehicle. The cells were then stimulated with LPS (10 ng·mL^{-1}). Levels of chemokines (A) CCL2, (B) CCL3, (C) CCL4, (D) CXCL1, (E) CXCL8 and (F) CXCL10 in the culture supernatant were determined after 24 h of incubation. Data are reported as the mean ± SEM of five to seven independent experiments. *Indicates a significant difference relative to the corresponding control (*$P < 0.05$; **$P < 0.01$; ***$P < 0.001$). $^{+}$Indicates a significant difference relative to LPS ($^{+}P < 0.05$, $^{++}P < 0.01$).

The overexpression of 15-LOX-2 in macrophages derived from human monocyte THP-1 cells was seen to be associated with greater CXCL10 and CCL2 production (Danielsson *et al.*, 2008). Conversely, knock-down 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 and inhibition of 15-LOX-1 by ML351 were associated with a markedly lower production of LPS-induced chemokines (including CCL2, CCL5, CXCL8 and CXCL10) and Th2 cytokine-induced chemokines – suggesting the involvement of the 15-LOX pathways. Involvement of the 12-LOX-pathway can be ruled out, as human macrophages do not express 12-LOX (as seen in the present study and Wuest *et al.*, 2012).

Arachidonic acid is a common substrate for LOXs and COXs. Hence, inhibition of 15-LOXs by PD146176 or ML351 can cause the shunting of arachidonic acid metabolism to the 5-LOX and COX-1/2 (PTGS1/2) pathways, with a potential increase in the levels of associated eicosanoids (e.g. PGs E_2

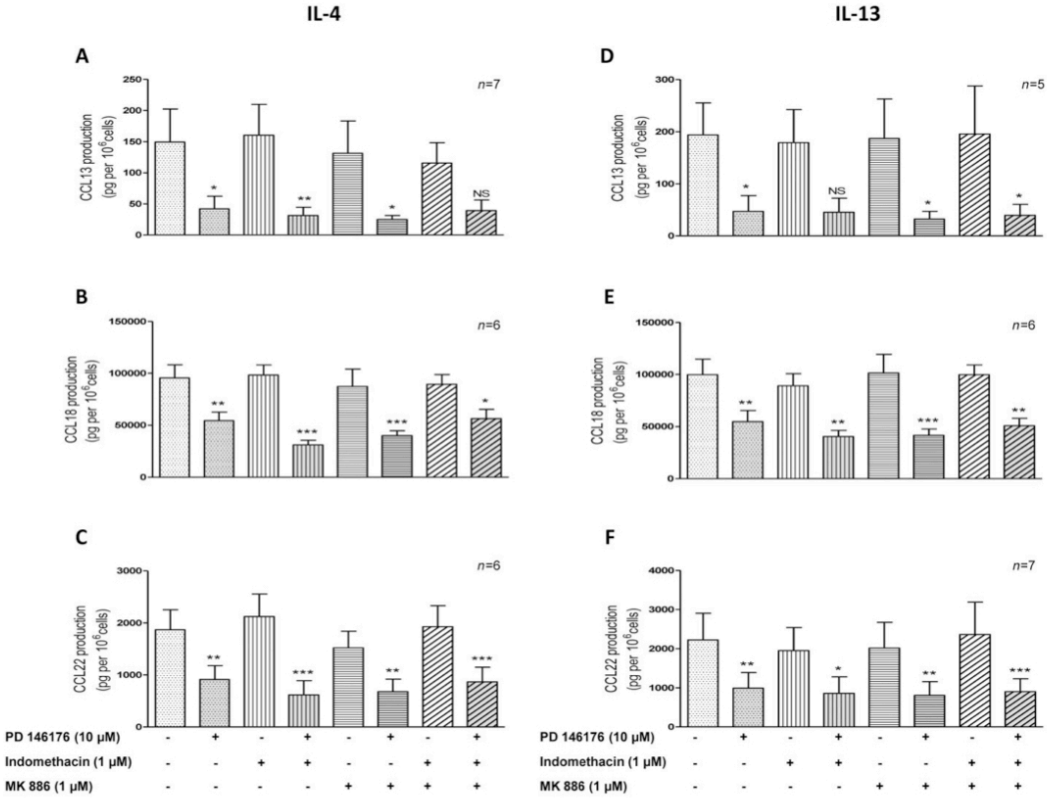


Figure 3

The roles of indomethacin and MK886 in the suppression of IL-4- or IL-13-induced chemokine release from human LMs by PD146176. Human LMs were exposed to medium alone (the baseline condition) or medium supplemented with indomethacin (1 μM), MK886 (1 μM) or vehicles for 30 min before being pre-incubated for 1 h with PD146176 (10 μM) or vehicle. The cells were then stimulated with IL-4 (10 ng·mL^{-1}) or IL-13 (50 ng·mL^{-1}). Levels of chemokine CCL13; CLL18 and CCL22 either induced by IL-4 (A, B, C) or by IL-13 (D, E, F) in the culture supernatant were determined after 24 h of incubation. Data are reported as the mean ± SEM of five to seven independent experiments. *Indicates a significant difference relative to the corresponding control (*$P < 0.05$; **$P < 0.01$; ***$P < 0.001$).

and I_2, 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 COX-dependent pathways (Levy *et al.*, 1993). As (i) human LMs expressed the 5-LOX and COX-1/2 (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 chemokines. To this end, we assessed the effect of 15-LOX inhibition by PD146176 or ML351 after blockade of the 5-LOX and COX-1/2 (PTGS1/2) pathways. Our results confirmed that 15-LOXs have a regulatory role in the production of chemokines induced by LPS and IL-4/IL-13.

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 work on bronchial epithelial cells, the induction of *ALOX15* expression by Th2 cytokines was associated with

increased 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 up-regulated by 15-LOX-1 overexpression and down-regulated 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 (in the present study) and airway epithelial cells.

Conversely, inhibition of 15-LOXs did not alter LPS-induced TNF-α production in human LMs, as previously shown in thioglycolate-elicited peritoneal murine macrophages (Middleton *et al.*, 2006). We and others have reported that LPS-induced release of TNF-α is potently inhibited by PGE_2 and PGI_2 (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_2 and 6-ketoPGF1α accumulate in the cell culture supernatant 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-α (in the present study, and as also shown with alveolar macrophages; Hempel *et al.*, 1996) by eliminating the predominant down-regulatory 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 LPS- and Th2 cytokine-induced chemokine production by human LMs; this fits with similar results in human alveolar macrophages for CXCL8 (Parkar *et al.*, 1990) and in human peritoneal macrophages for the pro-inflammatory cytokines IL-1β and IL-6 (Pruimboom *et al.*, 1994).

In conclusion, the *in vitro* activation of human LMs (by exposure to either LPS or IL-4/IL-13) is associated with an increase in the expression of *ALOX15B* and *ALOX15* respectively. Specific inhibition of the 15-LOXs was associated with a reduction in the production of chemokines induced by LPS and Th2 cytokines. However, it is known that 15-LOXs also contribute to the resolution of inflammation via the formation of specialized proresolving mediators (e.g. resolvins, protectins, maresins and new ketophospholipids) (Hammond *et al.*, 2012; Levy and Serhan, 2014). Our present results in LMs suggest that the 15-LOX pathways have several roles in the pathogenesis of inflammatory lung disorders and may thus constitute a potential drug target.

Acknowledgements

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

Author contributions

C. A., H. S. and M. B. prepared the lung macrophages and carried out immunoassays, the 15-lipoxygenase activity assay and RT-qPCRs. E. N. provided the human tissues and was also involved in preparation of the lung macrophages. C. A. analysed the results, prepared the figures, performed the statistical analysis and drafted the manuscript. P. D. and S. G. D. conceived the study, participated in its design, managed the work in the laboratory, analysed the results and drafted the manuscript.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

References

Alexander SPH, Benson HE, Faccenda E, Pawson AJ, Sharman JL, Spedding M *et al.* (2013a). The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2013/14: catalytic receptors. Br J Pharmacol 170: 1676–1705.

Alexander SPH, Benson HE, Faccenda E, Pawson AJ, Sharman JL, Spedding M *et al.* (2013b). The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2013/14: enzymes. Br J Pharmacol 170: 1797–1867.

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 171: 3551–3574.

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.

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.

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. Prog Lipid Res 50: 115–131.

Gillard J, Ford-Hutchinson AW, Chan C, Charleson S, Denis D, Foster A *et al.* (1989). L-663,536 (MK-886) (3-[1-(4-chlorobenzyl)-3-t-butyl-thio-5-isopropylindol-2-yl]-2,2 – dimethylpropanoic acid), a novel, orally active leukotriene biosynthesis inhibitor. Can J Physiol Pharmacol 67: 456–464.

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.

Hammond VJ, Morgan AH, Lauder S, Thomas CP, Brown S, Freeman BA *et al.* (2012). Novel keto-phospholipids are generated by monocytes and macrophages, detected in cystic fibrosis, and activate peroxisome proliferator-activated receptor-γ. J Biol Chem 287: 41651–41666.

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 (4 Pt 1): L596–L603.

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.

Kuhn H, O'Donnell VB (2006). Inflammation and immune regulation by 12/15-lipoxygenases. Prog Lipid Res 45: 334–356.

Kuo CH, Ko YC, Yang SN, Chu YT, Wang WL, Huang SK *et al.* (2011). Effects of PGI2 analogues on Th1- and Th2-related chemokines in monocytes via epigenetic regulation. J Mol Med (Berl) 89: 29–41.

Levy BD, Serhan CN (2014). Resolution of acute inflammation in the lung. Annu Rev Physiol 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–L203.

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.

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.

Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdt S *et al.* (2014). Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. Immunity 41: 14–20.

Norris PC, Gosselin D, Reichart D, Glass CK, Dennis EA (2014). Phospholipase A2 regulates eicosanoid class switching during inflammasome activation. Proc Natl Acad Sci U S A 111: 12746–12751.

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.

Pawson AJ, Sharman JL, Benson HE, Faccenda E, Alexander SP, Buneman OP *et al.*; NC-IUPHAR. (2014). The IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY: an expert-driven knowledgebase of drug targets and their ligands. Nucl Acids Res 42 (Database Issue): D1098–D1106.

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

- **Annexe 3 = article n°5**

Human lung and monocyte-derived macrophages differ with regard to the effects of β2-adrenoceptor agonists on cytokine release

Victoni T[1,2], **Salvator H[2,3]**, Abrial C[2], Brollo M[2], Porto LCS[1], Lagente V[4], Naline E[2,3], Grassin-Delyle S[3,5], Devillier P[6,7]

Respir Res. 2017 Jun 21;18(1):126. doi: 10.1186/s12931-017-0613-y

Résumé:

Il a été démontré que les agonistes des récepteurs β2-adrénergiques réduisent la libération de cytokines induite par le LPS par les macrophages dérivés de monocytes humains (MDM). Nous avons comparé l'expression des récepteurs β2-adrénergiques et l'effet inhibiteur du formotérol et du salmétérol sur la libération induite par le LPS du TNF-α, de l'IL-1β, de l'IL-6 et d'une gamme de chimiokines (CCL2, 3, 4 et CXCL8) par les macrophages pulmonaires humains (LM) et les MDM.

Les LM ont été isolés chez des patients opérés d'un cancer pulmonaire et les MDM ont été obtenus à partir de monocytes sanguins différenciés en présence de GM-CSF. Les LM et les MDM ont été incubés en l'absence ou en présence de formotérol ou de salmétérol avant stimulation par du LPS. Les effets du formotérol ont également été évalués en présence de roflumilast, un inhibiteur de la phosphodiestérase IV afin de chercher à révéler un effet de cet agoniste en renforçant le signal dépendant de l'AMPC.

La production de cytokines induite par le LPS était plus élevée dans les LM que dans les MDM. Le salmétérol et le formotérol ont exercé un effet inhibiteur sur la production de TNF-α, d'IL-6, de CCL2, de CCL3 et de CCL4 induite par le LPS dans les MDM. En revanche, les agonistes des récepteurs β2-adrénergiques étaient dénués de tout effet sur les LM, même en présence de roflumilast. L'expression des récepteurs β2-adrénergiques a été détectée en Western Blot dans les MDM, mais pas dans les LM.

Les concentrations d'agonistes des récepteurs β2-adrénergiques, reconnues pour entraîner la relaxation de bronches humaines, peuvent inhiber la production de cytokines par les MDM stimulés par du LPS, mais pas par les macrophages pulmonaires. Les MDM et les macrophages pulmonaires diffèrent significativement quant à l'expression des récepteurs β2-adrénergiques et l'effet des agonistes β2-adrénergiques sur la production de médiateurs de l'inflammation.

Victoni *et al. Respiratory Research* (2017) 18:126
DOI 10.1186/s12931-017-0613-y

Respiratory Research

RESEARCH Open Access

Human lung and monocyte-derived macrophages differ with regard to the effects of β_2-adrenoceptor agonists on cytokine release

Tatiana Victoni[1,2], Hélène Salvator[2,3], Charlotte Abrial[2], Marion Brollo[2], Luis Cristovão Sobrino Porto[1], Vincent Lagente[5], Emmanuel Naline[2,3], Stanislas Grassin-Delyle[3,4] and Philippe Devillier[2,3*]

Abstract

Background: β_2-adrenoceptor agonists have been shown to reduce the lipopolysaccharide (LPS)-induced cytokine release by human monocyte-derived macrophages (MDMs). We compare the expression of β_2-adrenoceptors and the inhibitory effect of formoterol and salmeterol on the LPS-induced release of tumor necrosis factor (TNF)-α, interleukin (IL)-1β, IL-6 and a range of chemokines (CCL2, 3, 4, and IL-8) by human lung macrophages (LMs) and MDMs.

Methods: LMs were isolated from patients undergoing resection and MDMs were obtained from blood monocytes in the presence of GM-CSF. LMs and MDMs were incubated in the absence or presence of formoterol or salmeterol prior to stimulation with LPS. The effects of formoterol were also assessed in the presence of the phosphodiesterase inhibitor roflumilast.

Results: LPS-induced cytokine production was higher in LMs than in MDMs. Salmeterol and formoterol exerted an inhibitory effect on the LPS-induced production of TNF-α, IL-6, CCL2, CCL3, and CCL4 in MDMs. In contrast, the β_2-adrenoceptor agonists were devoid of any effect on LMs - even in the presence of roflumilast. The expression of β_2-adrenergic receptors was detected on Western blots in MDMs but not in LMs.

Conclusions: Concentrations of β_2-adrenoceptor agonists that cause relaxation of the human bronchus can inhibit cytokine production by LPS-stimulated MDMs but not by LMs.

Keywords: β_2-adrenoceptor, Cytokines, Lipopolysaccharide, Lung macrophage, Monocyte-derived macrophage

Background

Pollens, house dust mites (HDMs), and cat dander are major triggers in allergic respiratory diseases such as asthma [1–3]. Air pollution is also associated with the acute worsening of pre-existing asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and with progression from asthma to COPD [4, 5].

In addition to its well-characterized involvement in the response to lipopolysaccharide (LPS), toll-like receptor 4 (TLR4) is involved in the airways' response to various allergens (e.g. ragweed pollen, house dust extract, and cat dander) and many air pollutants including particulate matter and their components other than allergens and LPS, such as viruses and fungal spores [6–9]. Particles that are less than 5 μm in size may gain access to the lower airways and alveoli, where they encounter macrophages (which account for more than 80% of the leukocyte population) [9]. LPS-mediated activation of macrophages causes the release of cytokines (tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin (IL)-1β and chemokines such as CCL2, CCL3, CCL4, and CXCL8 (IL-8)). This release contributes to airway inflammation by increasing the recruitment of inflammatory cells [10]. Recent research

* Correspondence: p.devillier@hopital-foch.com
[2]Laboratory of Research in Respiratory Pharmacology–UPRES EA220, UFR Sciences de la Santé Simone Veil, Université Versailles Saint-Quentin, Université Paris-Saclay, 11, rue Guillaume Lenoir, F-92150 Suresnes, France
[3]Department of Airway Diseases, Foch Hospital, Suresnes, France
Full list of author information is available at the end of the article

BioMed Central

© The Author(s). 2017 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

has highlighted the role of neutrophil recruitment in the response to allergen exposure and the subsequent development of allergen sensitization and inflammation [11].

In murine models of LPS-induced lung inflammation, formoterol and salmeterol reduce the recruitment of neutrophils to the lung and inhibit the release of pro-inflammatory mediators [12, 13]. We recently described the anti-inflammatory effect of the long-acting β_2-adrenoceptor agonist (LABA) olodaterol on (i) murine and guinea pig models of cigarette smoke- and LPS-induced lung inflammation, and (ii) LPS-induced cytokine release from explants of human lung parenchyma [14]. In a clinical setting, salmeterol also reduces neutrophil influx, neutrophil degranulation and TNF-α release after LPS inhalation by healthy individuals [15].

β_2-adrenoceptors are widely expressed throughout the lung [16, 17], and are found on epithelial and bronchial smooth muscle cells, endothelial and vascular smooth muscle cells, and pneumocytes [18, 19]. The β_2-adrenoceptors expressed by airway smooth muscle are involved in the relaxant effect of β_2-adrenoceptor agonists. Moreover, β_2-adrenoceptors are expressed on inflammatory cells, such as neutrophils, monocytes/macrophages and lymphocytes [20–23]. With respect to the monocyte/macrophage lineage, β_2-adrenoceptor activation was shown to variably reduce the LPS-stimulated release of leukotriene B4 (LTB4), TNF-α, IL-1β, IL-8 and CCL3 from human peripheral blood mononuclear cells [24–29]. Formoterol and salmeterol suppressed the LPS-induced release of TNF-α by monocyte-derived macrophages (MDMs) [30]. Clenbuterol and terbutaline suppressed the LPS-induced TNF-α and IL-6 release by phorbol-myristate-acetate-differentiated U937 human macrophages [31]. Furthermore, salmeterol reduced the cigarette-smoke-extract-induced release of IL-8 by MDMs [32].

Human monocytes, MDMs and U937 macrophages are all surrogate cell models that do not adequately recapitulate the biology of primary tissue macrophages. Previous studies have identified a large number of differentially expressed proteins [33, 34] and genes [35, 36] when comparing unstimulated monocytes, MDMs and human lung macrophages (LMs). It is noteworthy that the scarce data on the anti-inflammatory effects of β_2-adrenoceptor agonists are much less clear for LMs than for MDMs or monocytes. The non-selective β_2-adrenergic agonist isoprenaline did not alter the zymosan- and IgE-triggered release of the eicosanoids LTB_4 and thromboxane B_2 (TXB_2) [37], whereas high concentrations of salmeterol inhibited the release of TXB_2 in LMs [38]. Neither the short-acting β_2-adrenergic agonists salbutamol and terbutaline nor the LABAs salmeterol and formoterol inhibit the LPS-stimulated release of IL-1β [39]. However, treatment with isoprenaline was associated with an increase in levels of cyclic AMP (cAMP) in LMs via the activation of β_2-adrenergic receptors [22, 40, 41]. Furthermore, other cAMP-elevating agents (adenosine receptor agonists, phosphodiesterase 4 (PDE4) inhibitors, $PGE_{1/2/4}$ and forskolin) either increased the cAMP content [22, 40] or had inhibitory effects on LPS-induced cytokine release by LMs [41–44]. During the preparation of the present manuscript, Gill et al. reported on the inhibitory effects of high concentrations of β_2-adrenoceptor agonists on the LPS-induced production of TNF-α and IL-6 by LMs [45].

Hence, the present study was designed to assess and compare the effects of the LABAs formoterol and salmeterol on LPS-stimulated cytokine production and the expression of β_2-adrenoceptors by LMs and MDMs. We selected a LABA concentration range (10^{-11} to 10^{-7} M) that relaxes isolated human bronchus [46, 47], and we used an LPS preparation that is selective for TLR4. We assessed the production of TNF-α, IL-6 and three CC chemokines (CCL2, CCL3, and CCL4), levels of which are markedly increased by LPS exposure and inhibited by cAMP-elevating agents [30, 41–45]. Furthermore, we assessed the LABAs' effects on the LPS-induced production of IL-1β and IL-8, which is only weakly or not altered by various cAMP-elevating agents [30, 39, 42–44].

Methods

Reagents

Penicillin-streptomycin, dimethyl sulfoxide (DMSO), fetal calf serum (FCS), LPS from *Escherichia coli* (serotype 0111:B4), trypan blue dye, indomethacin, PGE_2, salmeterol xinafoate, and formoterol fumarate were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Acrylamide, SDS, Tris, HEPES, RPMI 1640 medium, phosphate-buffered saline (PBS) and bovine serum albumin (BSA) were obtained from Eurobio Biotechnology (Les Ulis, France). Roflumilast was synthesized by Nycomed GmbH (Konstanz, Germany; a gift from Dr. H. Tenor). Recombinant human GM-CSF (rhGM-CSF) was purchased from R&D Systems Europe (Lille, France). All cell culture plastics were from CML (Nemours, France). Specific antibodies against β_2-adrenoceptors and β-actin were obtained from Thermo Scientific (Vilnius, Lithuania) and Cytoskeleton (Denver, CO, USA), respectively. A Bradford protein assay and Precision Plus Protein Dual Color Standards were purchased from Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Stock solutions of roflumilast and indomethacin were prepared in DMSO. A PGE_2 stock solution (10 mM) was prepared in ethanol. All subsequent dilutions were prepared daily in complete medium. The DMSO concentration applied to cells in culture never exceeded 0.1%. Neither the vehicle nor any of the compounds used in this study altered cell viability. All wells were run in duplicate for each series of experiments performed with LMs or MDMs obtained from a single patient's sample.

human β_2-adrenoceptors (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania) and diluted (1/1000) for 2 h at room temperature. After washing, the membranes were incubated for 2 h with a horseradish-peroxidase-conjugated anti-mouse antibody (Dako, Glostrup, Denmark). The membranes were then incubated with an enhanced chemiluminescence solution for 1 min and quantified with QuantityOne 4.2.1 (Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, France).

Statistical analysis

Data were expressed as the mean ± SEM; n represents the number of patients from whom MDM or LM preparations were obtained. Wilcoxon's test or a one-way ANOVA for repeated measures was followed by Dunnett's post-tests, as appropriate. The threshold for statistical significance was set to $p \leq 0.05$.

Results

Effects of LPS on cytokine production by MDMs and LMs

There was no significant difference between unstimulated LMs and MDMs in terms of the production of TNF-α, IL-1β, and the chemokines (IL-8, CCL2, CCL3, and CCL4). However, IL-6 production was higher in MDMs. Following incubation with LPS, the release of all cytokines other than TNF-α and CCL4 was greater for LMs than for MDMs (Table 1).

Effects of formoterol and salmeterol on LPS-induced cytokine release by MDMs and LMs

We next investigated the effects of serial increases in the concentration (10^{-11} to 10^{-7} M) of formoterol and salmeterol on LPS-induced cytokine release. In MDMs, formoterol and salmeterol inhibited the LPS-induced production of TNF-α, IL-6 and the three CCL chemokines at concentrations greater than or equal to 10^{-10} M (Figs. 1 and 2). The respective effects of formoterol and salmeterol on the (weak) production of IL-1β were highly variable from one preparation to another. The production of IL-8 was not altered by the two LABAs. In sharp contrast to the results for MDMs, formoterol and salmeterol did not alter the LPS-induced production of any of the seven cytokines by LMs (Figs. 1 and 2). To definitively establish that the LMs' lack of response is not restricted to these two LABAs, we performed additional experiments on four preparations of MDMs and LMs with salbutamol at 1 μM (a concentration that causes maximal relaxation of isolated human bronchus and is equipotent to the concentrations used in the present study with the LABAs (0.01 μM for formoterol and 0.1 μM for salmeterol)). Our results confirmed that this short-acting β_2-adrenoceptor agonist inhibited MDMs (to much the same extent as in the work by Gill et al. [45]) but had no effect on LMs [see Additional file 2].

Table 1 The effect of LPS on cytokine levels in the supernatants of MDM and LM cultures

	Monocyte-derived macrophages		Lung macrophages	
Cytokine	LPS -	LPS +	LPS -	LPS +
TNF-α	1.8 ± 0.5	16.4 ± 6.5	0.7 ± 0.1	33.8 ± 7.1
IL-1ß	0.05 ± 0.01	0.09 ± 0.02	0.07 ± 0.03	0.54 ± 0.18*
IL-6	1.3 ± 0.5	13.2 ± 3.6	0.2 ± 0.1*	229.2 ± 80.3*
CCL2	2.2 ± 0.6	9.7 ± 2.4	3.1 ± 0.9	19.6 ± 3.9*
CCL3	4.5 ± 2.5	22.2 ± 8.1	3.1 ± 0.8	148.7 ± 41.2*
CCL4	6.5 ± 2.3	86.5 ± 31.4	6.8 ± 2.3	264.2 ± 78.6
IL-8	5.5 ± 2.3	93.2 ± 32.1	39.3 ± 14.3	1411.4 ± 383.1*

Macrophages were incubated with medium only (LPS-) or 10 $ng.ml^{-1}$ LPS in medium (LPS+) for 24 h. Cell culture supernatants were collected and analyzed using an ELISA. Data are expressed as the mean ± SEM $ng.10^{-6}$ cells from 5 to 8 experiments. Asterisks indicate significant differences (Wilcoxon's t test) between MDM and LM experiments

Effect of formoterol on LPS-induced cytokine release in the presence of roflumilast

Since formoterol was more potent than salmeterol in altering LPS-induced cytokine production by MDMs, we also looked at whether the presence of roflumilast could unmask an effect of 10^{-8} M formoterol on the LPS-induced release of TNF-α and the CCL chemokines by LMs. In this series of experiments, formoterol has no effect alone or in the presence of roflumilast on LPS-induced release of TNF-α, CCL2, CCL3 and CCL4 (Fig. 3). In contrast, the greater inhibitory effect of PGE_2 on production of the four cytokines in the presence of roflumilast evidences the latter drug's effect on a cAMP-elevator other than the LABAs in LMs (Fig. 3). In addition, formoterol did not increase significantly the inhibitory effect of PGE_2 (data not shown).

Expression of β_2-adrenoceptors on MDMs and LMs in presence and absence of LPS

Levels of β_2-adrenoceptor transcript expression were similar in MDMs and LMs (Table 2), whereas β_1- and β_3-adrenoceptor transcripts were only found in macrophages from two and three patients, respectively (data not shown). Strikingly, incubation of LMs with LPS for 24 h induced an approximately 7-fold decrease in β_2-adrenoceptor expression (Table 2).

To determine whether the LMs' absence of response to the β_2-adrenoceptor agonists was related to a loss of β_2-adrenoceptors relative to MDMs, we performed a Western blot analysis. As shown in Fig. 4, MDMs (but not LMs) expressed β_2-adrenoceptors. LPS treatment for 24 h did not alter the expression of the β_2-adrenoceptors in MDMs.

Discussion

Our present results notably showed that (i) cytokine production in response to LPS differs in MDMs and

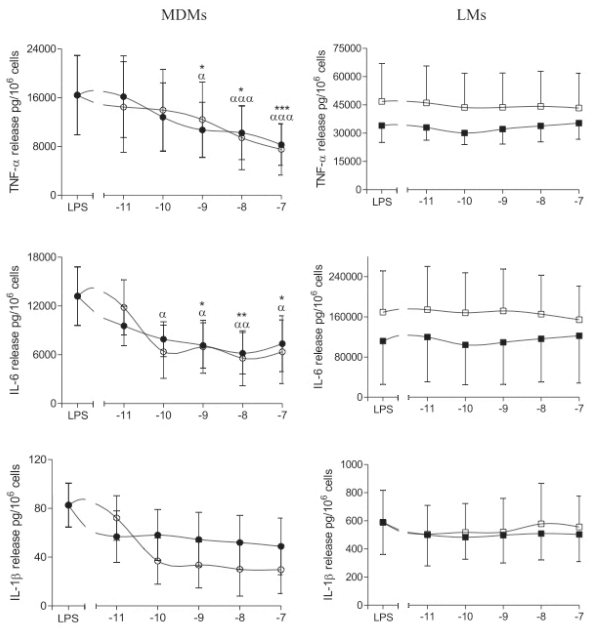


Fig. 1 Effects of formoterol and salmeterol on LPS-induced release of TNF-α, IL-6 and IL-1β by monocyte-derived macrophages (MDMs) and lung macrophages (LMs). MDMs (*left-hand column*) and LMs (*right-hand column*) were incubated with formoterol (○,□) and salmeterol (●,■) for 1 h prior to stimulation with LPS (10 ng.ml^{-1}) for 24 h. The culture supernatants were collected, and the cytokine concentrations were measured using an ELISA. The data represent the mean ± SEM of 5 to 8 independent experiments.*$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$ for salmeterol vs. LPS, $^{\alpha}$ $p < 0.05$, $^{\alpha\alpha}$ $p < 0.01$, $^{\alpha\alpha\alpha}$ $p < 0.001$ for formoterol vs. LPS

LMs, (ii) salmeterol and formoterol exert an inhibitory effect on the LPS-induced production of TNF-α, IL-6, CCL2, CCL3, and CCL4 by MDMs, (iii) the two LABAs were strikingly devoid of any effect on LMs, and (iv) Western blots revealed β_2-adrenergic receptor in MDMs but not in LMs.

We confirmed the recent report in which formoterol and salmeterol can inhibit the LPS-induced release of TNF-α and IL-6 from MDMs [30]. We extended these findings to three CCL chemokines (CCL2, CCL3 and CCL4) involved in the recruitment of monocytes, immature dendritic cells and T cells [51–53]. The range of concentrations at which these two LABAs influence LPS-induced cytokine production is suggestive of a β_2-adrenoceptor-dependent mechanism; this is also suggested by the attenuating effect of a β_2-adrenoceptor antagonist on formoterol's inhibitory action [30]. We also confirmed that the two LABAs did not alter the LPS-induced production of IL-1β and IL-8.

In a very recent study [45], salmeterol and indacaterol were found to inhibit the LPS-induced production of TNF-α and IL-6 by human LMs. However, four other β_2-adrenoceptor agonists (formoterol, salbutamol, terbutaline and isoprenaline) were inactive, and the inhibitory effect of the two LABAs was only observed at a concentration (10^{-5} M) that is at least 100-fold higher than those used in the present study and caused maximum relaxation of isolated human bronchi [46, 47]. These differences in the inhibitory activities of the various β_2-adrenoceptor agonists and the high concentration of the two active LABAs used in Gill et al.'s study calls into question both the clinical relevance of these results and the involvement of a β_2-adrenoceptor-mediated effect. It should be noted that the inhibitory effect of indacaterol was only partly reversed by a selective β_2-adrenoceptor antagonist, and the inhibitory effect of salmeterol was not reversed [45]. Moreover, the production of TXB_2 by LMs stimulated with either zymosan or the calcium ionophore A23187 was not inhibited by salbutamol (at concentrations up to 10^{-5} M), and the inhibitory effect of salmeterol was not blocked by propranolol - further suggesting that the effects of high concentrations of LABAs are not mediated by β_2-adrenoceptors in LMs [38], as also reported for human monocytes [27, 38].

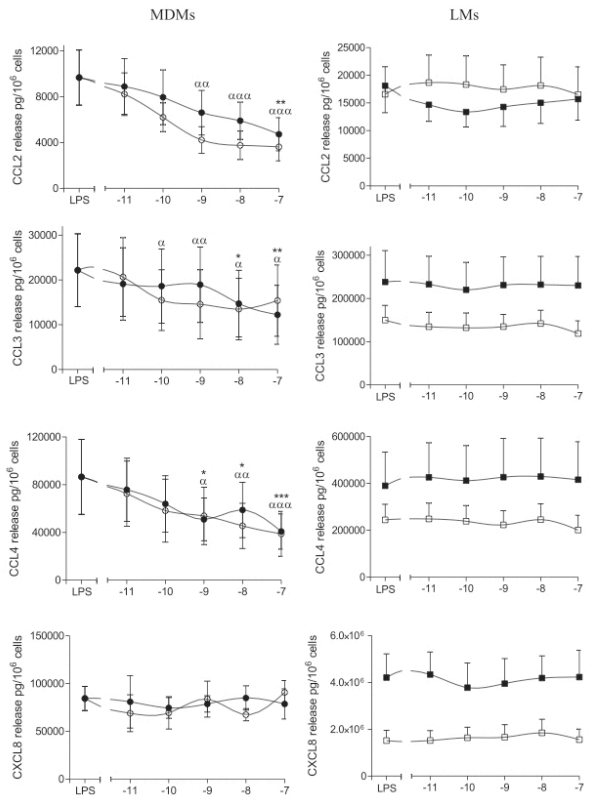


Fig. 2 Effects of formoterol and salmeterol on LPS-induced release of chemokines by monocyte-derived macrophages (MDMs) and lung macrophages (LMs). MDMs (left-hand column) and LMs (right-hand column) were incubated with formoterol (○,□) and salmeterol (●,■) for 1 h prior to stimulation with LPS (10 ng.ml^{-1}) for 24 h. The culture supernatants were collected, and the cytokine concentrations were measured using an ELISA. The data represent the mean ± SEM of 5 to 8 independent experiments. *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$ for salmeterol vs. LPS, $^{\alpha}$ $p < 0.05$, $^{\alpha\alpha}$ $p < 0.01$, $^{\alpha\alpha\alpha}$ $p < 0.001$ for formoterol vs. LPS

Furthermore, four β_2-adrenoceptor agonists (salmeterol, formoterol, salbutamol, and terbutaline) did not alter LPS- or zymosan-induced LTB_4 release from LMs at concentrations up to 10^{-5} M [39]. Taken as a whole, these results suggest that the inhibitory effects of β_2-adrenoceptor agonists on LMs is weak or even null, and might only be produced at very high concentrations via a β_2-adrenoceptor-independent mechanism. Given that macrophages express membrane-associated CD14, activation of the TLR4/MD-2 complex by LPS does not therefore require dimerization of the complex induced by LPS binding protein (LBP) [54]. Nevertheless, LBP (if required) was present in the FCS added to the culture medium. Hence, LBP and CD14 do not account for the results and conclusions of the present work.

MDMs differentiated by treatment with GM-CSF have been typically considered to be phenotypically and "behaviorally" similar to LMs [30, 32, 55]. However, recent high-throughput analyses have revealed remarkable differences in gene expression between MDMs and LMs; these differences include the transcripts for G-protein-coupled receptors [35, 36]. These results call into question the use of macrophage surrogates (such as MDMs) to mimic the behavior of LMs. Although β_2-adrenoceptor transcript levels were similar in MDMs and LMs ([35] and the present study), we found that protein levels of these receptors (as assessed by Western blotting) were much lower in LMs than in MDMs. Western blotting based on a peroxidase-conjugated secondary antibody is probably less sensitive than radioligand binding methods for detecting

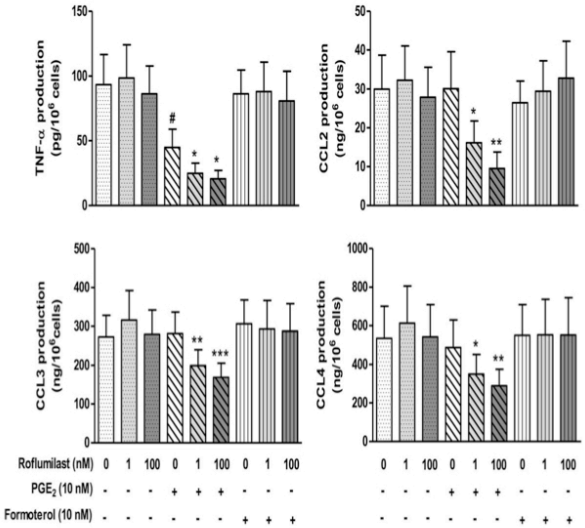


Fig. 3 Effects of formoterol, PGE_2 and roflumilast on LPS-induced TNF-α, CCL2, CCL3 and CCL4 release from LMs. Cells were pre-incubated with indomethacin (1 μM) for 30 min, followed by incubation with roflumilast (1 nM or 100 nM), PGE_2 (10 nM), formoterol (10 nM) or vehicle for another 30 min prior to stimulation with LPS (10 $ng.ml^{-1}$) for 24 h). The data represent the mean ± SEM of 6 different experiments, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ vs. LPS + PGE2 treatment; $\#p < 0.05$ vs. LPS

receptors. Human macrophages isolated from bronchoalveolar lavages (either by elutriation or adherence to culture dishes) were found to express a moderate density of β_2-adrenoceptors in radioligand binding studies [21, 22]. In both of the latter studies [21, 22], the β_2-adrenoceptors appear to be functionally coupled to adenylate cyclase; exposure to high concentrations of isoprenaline ($\geq 10^{-7}$ M) in the presence of the PDE inhibitor isobutylmethylxanthine resulted in increased cAMP accumulation. However, the increase in cAMP was much lower in the absence of isobutylmethylxanthine, and the two studies did not determine whether the increase in cAMP levels impacted macrophage function. It is noteworthy that in a subsequent study by one of the research groups, β_2-adrenoceptor agonists did not alter the LPS- or zymosan-induced release of LTB_4 from LMs [39] suggesting that the signal induced by the agonists was not strong enough to inhibit the effect of either LPS or zymosan. Furthermore, in the presence of roflumilast at a concentration that enhances the inhibitory influence of PGE_2 on LPS-induced TNF-α and chemokine production by LMs, we found that formoterol also remained inactive. This finding suggests that stimulation of the β_2-adrenoceptors did not increase the cAMP level enough to inhibit the production of the four cytokines. In line with these results, isoprenaline alone or in combination with a PDE inhibitor had

Table 2 Expression of β_2-adrenoreceptor mRNA transcripts (*ADRB2*) in human MDMs and LMs

	Relative expression in control (LPS-)	Relative expression after LPS exposure	Fold-change for LPS versus control
MDMs	172.6 [134.2, 228.7]	108.6 [76.2, 158.4]	−1.6
LMs	310.8 [187.1, 546.0]	44.7 [23.6, 75.3]	−7.5

The quoted result is the median [min, max] × 1000 of 3 to 5 independent experiments

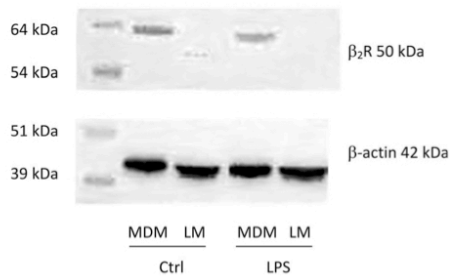


Fig. 4 Western blot analysis of the expression of β_2-adrenoceptors on MDMs and LMs. MDMs and LMs were incubated with medium alone (control) or LPS (10 $ng.ml^{-1}$) for 24 h. Cell lysates were immunoblotted with a β_2-adrenoceptor-specific antibody

any inhibitory effect on the release of eicosanoids induced by zymosan or IgE/anti-IgE complexes by LMs. These results for LMs contrast with the additive effects of formoterol and a PDE inhibitor (roflumilast or rolipram) in human monocytes and MDMs [30, 56].

However, forskolin inhibits TXB_2 release [37] and PGE_2 ([41, 42, 44] and the present study), NECA and roflumilast [43, 44] inhibit the LPS-induced production of cytokines by LMs - demonstrating that other cAMP elevators than LABAs are able to curb the production of eicosanoids or cytokines from LMs. Since the adenylyl cyclase/cAMP/cAMP-dependent protein kinase A axis stimulated by PGE_2 reduces the LPS-induced cytokine production [42], the β_2-adrenoceptor agonists' lack of effect in LMs is probably due to the low expression of β_2-adrenoceptors in these cells and thus insufficient stimulation of the pathway. The use of ten-fold lower concentrations of LPS (to markedly reduce the strength of the stimulus) unmasked a modest inhibitory effect of salbutamol on the release of TNF-α by LMs [45] - suggesting that the β_2-adrenoceptor-dependent rise in cAMP content might be only sufficient to counteract a relatively weak inflammatory stimulus. Lastly, the absence of an inhibitory effect of formoterol in LMs (evidenced in the present study) rules out the involvement of this cell type in the inhibitory effect of this LABA [57] and olodaterol [14] on LPS-induced cytokine release by human lung explants. Macrophages have been implicated in the pathophysiology of COPD and (to a lesser degree) in the inflammatory load in asthma. However, given the absence of LABAs' effects on LMs in vitro, macrophages are unlikely to account for these compounds' anti-inflammatory effects.

Conclusion

Our present results showed that concentrations of β_2-adrenoceptor agonists that cause the relaxation of isolated human bronchus can inhibit cytokine production by LPS-stimulated MDMs but not by LPS-stimulated LMs - even in the presence of a PDE inhibitor. The LMs' lack of response could be due to low β_2-adrenoceptor expression and thus an insufficiently strong cAMP-dependent trigger for the LPS-induced inflammatory response, since other cAMP elevators were able to inhibit the LPS-induced responses. The present results highlighted the lack of a clinically relevant, anti-inflammatory effect of β_2-adrenoceptor agonists on LMs.

Additional files

Additional file 1: LPS concentration-response data for MDMs and LMs, and time-course experiments in LMs (figures). (PDF 94 kb)

Additional file 2: Effect of salbutamol (1 μM) on LPS-induced cytokine production by MDMs and LMs (figures). (PDF 52 kb)

Abbreviations

BSA: Bovine serum albumin; cAMP: Cyclic AMP; COPD: Chronic obstructive pulmonary disease; DMSO: Dimethyl sulfoxide; FCS: Fetal calf serum; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; HDMs: House dust mites; IL: Interleukin; LMs: Human lung macrophages; LPS: Lipopolysaccharide; LTB4: Leukotriene B4; MDMs: Human monocyte-derived macrophages; PBS: Phosphate-buffered saline; PDE4: Phosphodiesterase 4; rhGM-CSF: Recombinant human GM-CSF; TLR4: Toll-like receptor 4; TNF: Tumor necrosis factor; TXB2: Thromboxane B_2

Acknowledgments

The authors thank CAPES–COFECUB for additional, bilateral funding (Brazil–France) and David Fraser PhD (Biotech Communication SARL, Ploudalmezeau, France) for copy-editing assistance. CA received a doctoral grant from Foch Hospital.

Funding

none.

Availability of data and materials

The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Authors' contributions

EN, SG-D, MB, LCSP, TV and CA performed the research. VL and PD designed the research. TV, SG-D, MB and PD analyzed the data. TV and PD wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors have no conflicts of interest with regard to the present study, which was not sponsored by a company. PD and EN have received research funding from Boehringer-Ingelheim in the field of respiratory research. PD has received consulting fees, honoraria for lectures and/or participation in scientific advisory boards from AstraZeneca, Boehringer Ingelheim, Chiesi, GlaxoSmithKline and Novartis. TV, CA, MB, VL, SGD, HS and LP have no competing interests.

Consent for publication

Not applicable.

Ethics approval and consent to participate

The use of human lung tissue for in vitro experiments was approved by the local independent ethics committee (*Comité de Protection des Personnes Ile de France VIII*, Boulogne-Billancourt, France). In line with the French legislation on clinical research (and as approved by the independent ethics committee), only verbal informed consent (rather than written consent) was required. A brief note from the investigating physician (stating that consent had been requested and verbally granted at the time of the consultation) was included in the patient's medical records. If the patients disagreed (by ticking a box and signing the information sheet [available on request]), their lung tissue (if any) was not made available to our laboratory.
Hence, informed consent was obtained from each patient.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

[1]Laboratory of Histocompatibility and Cryopresevation, Laboratory of Tissue Repair, Rio de Janeiro, Brazil. [2]Laboratory of Research in Respiratory Pharmacology–UPRES EA220, UFR Sciences de la Santé Simone Veil, Université Versailles Saint-Quentin, Université Paris-Saclay, 11, rue Guillaume Lenoir, F-92150 Suresnes, France. [3]Department of Airway Diseases, Foch Hospital, Suresnes, France. [4]INSERM UMR1173 & Mass Spectrometry Facility, UFR Sciences de la Santé Simone Veil, Université Versailles Saint-Quentin, Université Paris-Saclay, Montigny-le-Bretonneux, France. [5]Nutrition Metabolisms and Cancer, INSERM, INRA, Université Rennes 1, Université Bretagne Loire, Rennes, France.

Received: 12 January 2017 Accepted: 15 June 2017
Published online: 21 June 2017

References

1. Nelson Jr RP, DiNicolo R, Fernandez-Caldas E, Seleznick MJ, Lockey RF, Good RA. Allergen-specific IgE levels and mite allergen exposure in children with acute asthma first seen in an emergency department and in nonasthmatic control subjects. J Allergy Clin Immunol. 1996;98:258–63.
2. Salo PM, Calatroni A, Gergen PJ, Hoppin JA, Sever ML, Jaramillo R, Arbes Jr SJ, Zeldin DC. Allergy-related outcomes in relation to serum IgE: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 2005–2006. J Allergy Clin Immunol. 2011;127:1226–35. e1227.
3. Terreehorst I, Oosting AJ, Tempels-Pavlica Z, de Monchy JG, Bruijnzeel-Koomen CA, Hak E, van Wijk RG. Prevalence and severity of allergic rhinitis in house dust mite-allergic patients with bronchial asthma or atopic dermatitis. Clin Exp Allergy. 2002;32:1160–5.
4. To T, Feldman L, Simatovic J, Gershon AS, Dell S, Su J, Foty R, Licskai C. Health risk of air pollution on people living with major chronic diseases: a Canadian population-based study. BMJ Open. 2015;5:e009075.
5. To T, Zhu J, Larsen K, Simatovic J, Feldman L, Ryckman K, Gershon A, Lougheed MD, Licskai C, Chen H, et al. Progression from asthma to chronic obstructive pulmonary disease. Is air pollution a risk factor? Am J Respir Crit Care Med. 2016;194:429–38.
6. Bauer RN, Diaz-Sanchez D, Jaspers I. Effects of air pollutants on innate immunity: the role of Toll-like receptors and nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors. J Allergy Clin Immunol. 2012;129: 14–24. quiz 25–16.
7. Gregory LG, Lloyd CM. Orchestrating house dust mite-associated allergy in the lung. Trends Immunol. 2011;32:402–11.
8. Lam D, Ng N, Lee S, Batzer G, Horner AA. Airway house dust extract exposures modify allergen-induced airway hypersensitivity responses by TLR4-dependent and independent pathways. J Immunol. 2008;181:2925–32.
9. Minnicozzi M, Sawyer RT, Fenton MJ. Innate immunity in allergic disease. Immunol Rev. 2011;242:106–27.
10. Barnes PJ. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. J Clin Invest. 2008;118:3546–56.
11. Hosoki K, Itazawa T, Boldogh I, Sur S. Neutrophil recruitment by allergens contribute to allergic sensitization and allergic inflammation. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2016;16:45–50.
12. Bosmann M, Grailer JJ, Zhu K, Matthay MA, Sarma JV, Zetoune FS, Ward PA. Anti-inflammatory effects of beta2 adrenergic receptor agonists in experimental acute lung injury. FASEB J. 2012;26:2137–44.
13. Maris NA, van der Sluijs KF, Florquin S, de Vos AF, Pater JM, Jansen HM, van der Poll T. Salmeterol, a beta2-receptor agonist, attenuates lipopolysaccharide-induced lung inflammation in mice. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2004;286:L1122–8.
14. Wex E, Kollak I, Duechs MJ, Naline E, Wollin L, Devillier P. The long-acting beta2 -adrenoceptor agonist olodaterol attenuates pulmonary inflammation. Br J Pharmacol. 2015;172:3537–47.
15. Maris NA, de Vos AF, Dessing MC, Spek CA, Lutter R, Jansen HM, van der Zee JS, Bresser P, van der Poll T. Antiinflammatory effects of salmeterol after inhalation of lipopolysaccharide by healthy volunteers. Am J Respir Crit Care Med. 2005;172:878–84.
16. Ikeda T, Anisuzzaman AS, Yoshiki H, Sasaki M, Koshiji T, Uwada J, Nishimune A, Itoh H, Muramatsu I. Regional quantification of muscarinic acetylcholine receptors and beta-adrenoceptors in human airways. Br J Pharmacol. 2012; 166:1804–14.
17. Spina D, Rigby PJ, Paterson JW, Goldie RG. Autoradiographic localization of beta-adrenoceptors in asthmatic human lung. Am Rev Respir Dis. 1989;140: 1410–5.
18. Barnes PJ, Basbaum CB, Nadel JA, Roberts JM. Localization of beta-adrenoreceptors in mammalian lung by light microscopic autoradiography. Nature. 1982;299:444–7.
19. Carstairs JR, Nimmo AJ, Barnes PJ. Autoradiographic visualization of beta-adrenoceptor subtypes in human lung. Am Rev Respir Dis. 1985; 132:541–7.
20. Barnes PJ. Effect of beta-agonists on inflammatory cells. J Allergy Clin Immunol. 1999;104:S10–7.
21. Hjemdahl P, Larsson K, Johansson MC, Zetterlund A, Eklund A. Beta-adrenoceptors in human alveolar macrophages isolated by elutriation. Br J Clin Pharmacol. 1990;30:673–82.
22. Liggett SB. Identification and characterization of a homogeneous population of beta 2-adrenergic receptors on human alveolar macrophages. Am Rev Respir Dis. 1989;139:552–5.
23. Anderson R, Theron AJ, Steel HC, Durandt C, Tintinger GR, Feldman C. The beta-2-adrenoreceptor agonists, formoterol and indacaterol, but not salbutamol, effectively suppress the reactivity of human neutrophils in vitro. Mediators Inflamm. 2014;2014:105420.
24. Ezeamuzie CI, Shihab PK, Al-Radwan R. Loss of surface beta-2 adrenoceptors accounts for the insensitivity of cultured human monocytes to beta-2 adrenoceptor agonists. Int Immunopharmacol. 2011;11:1189–94.
25. Li CY, Tsai CS, Chueh SH, Hsu PC, Wang JY, Wong CS, Ho ST. Dobutamine inhibits monocyte chemoattractant protein-1 production and chemotaxis in human monocytes. Anesth Analg. 2003;97:205–9. table of contents.
26. Li CY, Tsai CS, Hsu PC, Wu CT, Wong CS, Ho ST. Dobutamine modulates lipopolysaccharide-induced macrophage inflammatory protein-1alpha and interleukin-8 production in human monocytes. Anesth Analg. 2003;97:210–5. table of contents.
27. Linden M. The effects of beta 2-adrenoceptor agonists and a corticosteroid, budesonide, on the secretion of inflammatory mediators from monocytes. Br J Pharmacol. 1992;107:156–60.
28. Yoshimura T, Kurita C, Nagao T, Usami E, Nakao T, Watanabe S, Kobayashi J, Yamazaki F, Tanaka H, Inagaki N, Nagai H. Inhibition of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1-beta production by beta-adrenoceptor agonists from lipopolysaccharide-stimulated human peripheral blood mononuclear cells. Pharmacology. 1997;54:144–52.
29. Yoshimura T, Kurita C, Nagao T, Usami E, Nakao T, Watanabe S, Kobayashi J, Yamazaki F, Tanaka H, Nagai H. Effects of cAMP-phosphodiesterase isozyme inhibitor on cytokine production by lipopolysaccharide-stimulated human peripheral blood mononuclear cells. Gen Pharmacol. 1997;29:633–8.
30. Donnelly LE, Tudhope SJ, Fenwick PS, Barnes PJ. Effects of formoterol and salmeterol on cytokine release from monocyte-derived macrophages. Eur Respir J. 2010;36:178–86.
31. Izeboud CA, Monshouwer M, van Miert AS, Witkamp RF. The beta-adrenoceptor agonist clenbuterol is a potent inhibitor of the LPS-induced production of TNF-alpha and IL-6 in vitro and in vivo. Inflamm Res. 1999;48:497–502.
32. Sarir H, Mortaz E, Karimi K, Johnson M, Nijkamp FP, Folkerts G. Combination of fluticasone propionate and salmeterol potentiates the suppression of cigarette smoke-induced IL-8 production by macrophages. Eur J Pharmacol. 2007;571:55–61.
33. Jin M, Opalek JM, Marsh CB, Wu HM. Proteome comparison of alveolar macrophages with monocytes reveals distinct protein characteristics. Am J Respir Cell Mol Biol. 2004;31:322–9.
34. Tomechko SE, Lundberg KC, Jarvela J, Bebek G, Chesnokov NG, Schlatzer D, Ewing RM, Boom WH, Chance MR, Silver RF. Proteomic and bioinformatics profile of paired human alveolar macrophages and peripheral blood monocytes. Proteomics. 2015;15:3797–805.
35. Groot-Kormelink PJ, Fawcett L, Wright PD, Gosling M, Kent TC. Quantitative GPCR and ion channel transcriptomics in primary alveolar macrophages and macrophage surrogates. BMC Immunol. 2012;13:57.
36. 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;81:328–35.
37. Fuller RW, O'Malley G, Baker AJ, MacDermot J. Human alveolar macrophage activation: inhibition by forskolin but not beta-adrenoceptor stimulation or phosphodiesterase inhibition. Pulm Pharmacol. 1988;1:101–6.
38. Baker AJ, Palmer J, Johnson M, Fuller RW. Inhibitory actions of salmeterol on human airway macrophages and blood monocytes. Eur J Pharmacol. 1994; 264:301–6.
39. Zetterlund A, Linden M, Larsson K. Effects of beta2-agonists and budesonide on interleukin-1beta and leukotriene B4 secretion: studies of human monocytes and alveolar macrophages. J Asthma. 1998;35:565–73.
40. Zetterlund A, Hjemdahl P, Larsson K. beta2-Adrenoceptor desensitization in human alveolar macrophages induced by inhaled terbutaline in vivo is not counteracted by budesonide. Clin Sci (Lond). 2001;100:451–7.
41. Gill SK, Yao Y, Kay LJ, Bewley MA, Marriott HM, Peachell PT. The anti-inflammatory effects of PGE2 on human lung macrophages are mediated by the EP4 receptor. Br J Pharmacol. 2016;173:3099–109.
42. Birrell MA, Maher SA, Dekkak B, Jones V, Wong S, Brook P, Belvisi MG. Anti-inflammatory effects of PGE2 in the lung: role of the EP4 receptor subtype. Thorax. 2015;70:740–7.

43. 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. Br J Pharmacol. 2010;159:1304–11.
44. 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. Br J Pharmacol. 2012;165:1877–90.
45. Gill SK, Marriott HM, Suvarna SK, Peachell PT. Evaluation of the anti-inflammatory effects of beta-adrenoceptor agonists on human lung macrophages. Eur J Pharmacol. 2016;793:49–55.
46. Bouyssou T, Casarosa P, Naline E, Pestel S, Konetzki I, Devillier P, Schnapp A. Pharmacological characterization of olodaterol, a novel inhaled beta2-adrenoceptor agonist exerting a 24-hour-long duration of action in preclinical models. J Pharmacol Exp Ther. 2010;334:53–62.
47. Naline E, Trifilieff A, Fairhurst RA, Advenier C, Molimard M. Effect of indacaterol, a novel long-acting beta2-agonist, on isolated human bronchi. Eur Respir J. 2007;29:575–81.
48. Gicquel T, Victoni T, Fautrel A, Robert S, Gleonnec F, Guezingar M, Couillin I, Catros V, Boichot E, Lagente V. Involvement of purinergic receptors and NOD-like receptor-family protein 3-inflammasome pathway in the adenosine triphosphate-induced cytokine release from macrophages. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2014;41:279–86.
49. Hatzelmann A, Schudt C. Anti-inflammatory and immunomodulatory potential of the novel PDE4 inhibitor roflumilast in vitro. J Pharmacol Exp Ther. 2001;297:267–79.
50. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(−Delta Delta C(T)) method. Methods. 2001;25:402–8.
51. Bachelerie F, Ben-Baruch A, Burkhardt AM, Combadiere C, Farber JM, Graham GJ, Horuk R, Sparre-Ulrich AH, Locati M, Luster AD, et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. [corrected]. LXXXIX. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors. Pharmacol Rev. 2014; 66:1–79.
52. Brusselle GG, Joos GF, Bracke KR. New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease. Lancet. 2011;378:1015–26.
53. Ravi AK, Khurana S, Lemon J, Plumb J, Booth G, Healy L, Catley M, Vestbo J, Singh D. Increased levels of soluble interleukin-6 receptor and CCL3 in COPD sputum. Respir Res. 2014;15:103.
54. Tsukamoto H, Fukudome K, Takao S, Tsuneyoshi N, Kimoto M. Lipopolysaccharide-binding protein-mediated Toll-like receptor 4 dimerization enables rapid signal transduction against lipopolysaccharide stimulation on membrane-associated CD14-expressing cells. Int Immunol. 2010;22:271–80.
55. Komuro I, Keicho N, Iwamoto A, Akagawa KS. Human alveolar macrophages and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced monocyte-derived macrophages are resistant to H2O2 via their high basal and inducible levels of catalase activity. J Biol Chem. 2001;276:24360–4.
56. Tannheimer SL, Sorensen EA, Haran AC, Mansfield CN, Wright CD, Salmon M. Additive anti-inflammatory effects of beta 2 adrenoceptor agonists or glucocorticosteroid with roflumilast in human peripheral blood mononuclear cells. Pulm Pharmacol Ther. 2012;25:178–84.
57. Buenestado A, Chaumais MC, Grassin-Delyle S, Risse PA, Naline E, Longchampt E, Tenor H, Devillier P. Roflumilast inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha and chemokine production by human lung parenchyma. PLoS One. 2013;8:e74640.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

BioMed Central

- **Annexe 4 = Article n° 6**

The role of Toll-like receptors in the production of cytokines by human lung macrophages

Stanislas Grassin-Delyle[1,2], Charlotte Abrial[3], **Hélène Salvator[1,3]**, Marion Brollo[3],

Emmanuel Naline[1,3] and Philippe Devillier[1,3]

Accepté pour publication dans Journal of Innate Immunity, octobre 2018

Résumé:

La famille des récepteurs de type Toll (TLR) est impliquée dans la reconnaissance et la réponse aux infections microbiennes. Ces récepteurs sont exprimés dans les leucocytes et la stimulation des TLR induit la production de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires. Étant donné que les macrophages pulmonaires humains constituent une des premières lignes de défense contre les agents pathogènes inhalés, l'objectif de la présente étude était d'étudier l'expression et la fonction des sous-types de TLR dans cette population cellulaire.

Les macrophages pulmonaires primaires humains ont été obtenus chez des patients subissant une résection chirurgicale. Les niveaux d'expression d'ARN et de protéines des TLR, des chimiokines et des cytokines ont été évalués après incubation avec des agonistes sélectifs des sous-types.

Dans les macrophages pulmonaires humains, les niveaux d'expression des TLR variaient selon le sous-type de TLR. La stimulation avec des agonistes sélectifs des sous-types de TLR a induit une augmentation intense, dépendante de la concentration et du temps, de la production de chimiokines et de cytokines. La stimulation du TLR4 a induit l'effet le plus puissant, tandis que la stimulation du TLR9 a induit une réponse beaucoup plus faible.

La stimulation des TLR dans les macrophages pulmonaires humains induit une production intense de cytokines et de chimiokines, caractéristique du phénotype proinflammatoire des macrophages M1.

Research Article

Journal of Innate Immunity

J Innate Immun
DOI: 10.1159/000494463

Received: June 4, 2018
Accepted after revision: October 13, 2018
Published online: December 17, 2018

The Role of Toll-Like Receptors in the Production of Cytokines by Human Lung Macrophages

Stanislas Grassin-Delyle[a, b] Charlotte Abrial[c] Hélène Salvator[a, c]
Marion Brollo[c] Emmanuel Naline[a, c] Philippe Devillier[a, c]

[a]Département des Maladies Respiratoires, Hôpital Foch, Suresnes, France; [b]INSERM UMR 1173 et Plateforme de spectrométrie de masse MasSpecLab, UFR des Sciences de la Santé Simone Veil, Université Versailles Saint Quentin, Université Paris Saclay, Montigny-le-Bretonneux, France; [c]Laboratoire de Pharmacologie UPRES EA220, Université Versailles Saint Quentin, Université Paris Saclay, Hôpital Foch, Suresnes, France

Keywords
Toll-like receptor · Lung macrophage · Polarization · Cytokine · Chemokine

Abstract
Background: The Toll-like receptor (TLR) family is involved in the recognition of and response to microbial infections. These receptors are expressed in leukocytes. TLR stimulation induces the production of proinflammatory cytokines and chemokines. Given that human lung macrophages (LMs) constitute the first line of defense against inhaled pathogens, the objective of this study was to investigate the expression and function of TLR subtypes in this cell population. ***Methods:*** Human primary LMs were obtained from patients undergoing surgical resection. The RNA and protein expression levels of TLRs, chemokines, and cytokines were assessed after incubation with subtype-selective agonists. ***Results:*** In human LMs, the TLR expression level varied from one subtype to another. Stimulation with subtype-selective agonists induced an intense, concentration- and time-dependent increase in the production of chemokines and cytokines. TLR4 stimulation induced the strongest effect, whereas TLR9 stimulation induced a much weaker response. ***Conclusions:*** The stimulation of TLRs in human LMs induces intense cytokine and chemokine production, a characteristic of the proinflammatory M1 macrophage phenotype.

© 2018 The Author(s)
Published by S. Karger AG, Basel

Introduction

Macrophages are major players in the homeostatic clearance of apoptotic/damaged cells, the recognition of pathogens, and the induction of an adaptive immune response. These cells reside in all organs but are particularly well-represented in the lungs, where they perform immune surveillance and constitute the body's first line of defense against inhaled pathogens. In addition to their role in innate immunity, macrophages may also promote adaptive immunity through their ability to act as antigen-presenting cells [1]. Macrophages interact with (and then phagocytize) pathogens and damaged cells by binding to a number of receptors expressed at their cell surface (such as scavenger receptors, mannose receptors, and β-glucan receptors). It is known that the pattern-recognition receptors (PRRs) expressed in macrophages are involved in

KARGER

E-Mail karger@karger.com
www.karger.com/jin

© 2018 The Author(s)
Published by S. Karger AG, Basel

Karger Open access

This article is licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License (CC BY-NC-ND) (http://www.karger.com/Services/OpenAccessLicense). Usage and distribution for commercial purposes as well as any distribution of modified material requires written permission.

Dr. Stanislas Grassin-Delyle
Département des Maladies Respiratoires, Hôpital Foch
11 Rue Guillaume Lenoir
FR–92150 Suresnes (France)
E-Mail s.grassindelyle@hopital-foch.org

the recognition of either conserved microbial ligands (pathogen-associated molecular patterns [PAMPs]) or endogenous ligands originating from injured cells (damage-associated molecular patterns [DAMPs]) [2]. PRRs encompass the Toll-like receptor (TLR) family, which has 10 members in humans. The TLRs are transmembrane proteins that primarily sense PAMPs (but can also bind to DAMPs) and then induce an immune response. The latter is mainly implemented via the modified expression of transcription factors and inflammatory genes, and the production of mediators (e.g., cytokines). Each of the TLR subtypes has its own specific recognition pattern. TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, and TLR6 are located at the cell surface, where they sense external microbial components such as lipopeptides, flagellins, and lipopolysaccharide (LPS, the cell-wall component of gram-negative bacteria). TLR3, TLR7, TLR8, and TLR9 are expressed in intracellular compartments (endosomes) and bind to nucleic acids (such as single- or double-stranded viral RNA and CpG DNA). Some TLRs function as homodimers (TLR3, TLR4, TLR5, and TLR9) or heterodimers (TLR1/2 and TLR2/6), while others are active as monomers (TLR7 and TLR8) [3]. TLR4 (the first subtype to be identified in humans) is the most widely studied, due to its ability to bind LPS, various allergens (e.g., ragweed pollen, house dust extract, and cat dander), and many air pollutants (including particulate matter). It is known that TLR2, TLR4, and TLR9 are expressed in human alveolar macrophages (AMs) at the mRNA level [4, 5] and protein level [6, 7].

TLR signaling engages an early cytokine response that amplifies the inflammatory response and recruits other cells to combat the invading microorganisms [8]. Macrophages are particularly involved in the production of cytokines; indeed, tumor necrosis factor (TNF)-α and interleukin (IL)-1β, IL-6, IL-10, and IL-12 are released by AMs following the activation of TLR2, TLR4, and TLR9 [6, 7]. The inhaled microbes recognized by TLR2, TLR4, and TLR9 may cause lung infections and acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma. Indeed, it was recently reported that bacteria and viruses are associated with, respectively, 55 and 29% of COPD exacerbations [9]. Viral respiratory tract infections (predominantly due to rhinoviruses) are associated with up to 85% of asthma exacerbations [10]. Genetic polymorphisms in the TLR genes are also associated with asthma [11, 12]. Cigarette smoke, the most prevalent risk factor for COPD, is also known to alter TLR expression and function in monocyte-derived macrophages [13–15]. Some researchers have therefore suggested that TLRs are potential drug targets for asthma and COPD [16, 17]. Characterization of the response of human lung macrophages (LMs) to TLR stimulation is also of therapeutic interest, since this cell type is a target for TLR-modulating drugs in the preclinical or early clinical development for the treatment of asthma or cystic fibrosis; these drugs include chemically modified mRNAs that modulate TLR expression [18–20] and oligonucleotide TLR9 agonists [21].

It is now acknowledged that macrophages can be polarized into a range of functional phenotypes, depending on various environmental cues. The two ends of the spectrum correspond to proinflammatory M1 macrophages (also referred to as classically activated macrophages) and immunoregulatory M2 macrophages (also referred to as alternatively activated macrophages), thus mirroring the Th1/Th2 dichotomy. M1 macrophages are obtained after stimulation with LPS or by exposure to Th1-cytokines like interferon (IFN)-γ; the cells are involved in mounting effective responses against microorganisms and tumor cells. M2 macrophages result from stimulation by the Th2 cytokines IL-4 and IL-13, or by IL-10, immune complexes, or glucocorticoids [22]. They are considered to be "wound-healing" macrophages, as illustrated by their role in the regulation of lung inflammation and tissue remodeling in mouse models of asthma [23, 24]. M1 and M2 macrophages differ markedly with regard to their cytokine production, enzyme content, and surface protein expression. For example, TNF-α, CCL3 and CXCL8 are M1 cytokines whereas CCL18 and CCL22 are M2 cytokines [22]. Since some of macrophages' main functions in innate immunity rely on the ability to produce cytokines, we decided to focus on the production of these mediators following the activation of each TLR subtype in human LMs. As recently emphasized [25], there are few literature data on this topic; in particular, there are no comparative data on the stimulation of each TLR subtype in primary cultures of human LMs. Our objective was to map the expression of TLRs in human LMs and characterize the response of cells to selective agonists of each TLR subtype.

Methods

Reagents

Penicillin, streptomycin and L-glutamine were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). RPMI 1640 medium, PBS, FCS, and BSA were obtained from Eurobio Biotechnology (Les Ulis, France). Agonists of TLR1/2 (Pam3CSK4), TLR2 (a heat-killed preparation of *Listeria monocytogenes* [HKLM]), TLR3 (low- or high-molecular-weight [LMW or HMW] poly[I:C]), TLR4 (LPS from *Escherichia coli* serotype K12), TLR5 (flagellin from *Salmo-*

nella typhimurium), TLR6/2 (FSL-1), TLR7 (imiquimod), TLR8 (ssRNA40), and TLR9 (ODN2006) were purchased from InvivoGen (San Diego, CA, USA) and resuspended in endotoxin-free water. The maximal concentrations used in this study are listed in online supplemental Table 1 (for all online suppl. material, see www.karger.com/doi/10.1159/000494463). All other chemicals were of analytical grade and were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). All cell culture plastics were purchased from CML (Nemours, France).

Patient Population

The use of resected lung tissue was approved by the regional investigational review board (Comité de Protection des Personnes Ile de France VIII, Boulogne-Billancourt, France), and the patients undergoing surgical lung resection gave their informed consent. Lung tissue was obtained from 19 patients with the following demographic characteristics: a median age of 67 years (interquartile range [IQR] 56–77 years), 11 males and 8 females, a ratio of current smokers/ex-smokers/never-smokers of 12:6:1, median pack-years $n = 37$ (IQR 35–60), and % FEV_1 predicted of 79% (IQR 67–98%). Five patients were suffering from COPD (as defined by a postbronchodilator FEV_1/FVC ratio <0.7), none had FEV_1 <50% predicted, and none had undergone chemotherapy or radiotherapy prior to surgical lung resection.

Isolation and Culture of Human LMs

The procedure for preparation of LMs has been described elsewhere [26–28]. Briefly, peripheral lung tissue obtained from sites distant from the tumor were minced finely and then washed 3 times with RPMI medium. The washings were filtered and centrifuged (300 *g*, 10 min), and the cell pellet was resuspended in RPMI medium supplemented with 10% heat-inactivated FCS, 2 mM L-glutamine, 100 μg/mL streptomycin, and 100 U/mL penicillin. The resuspended cells were then plated at 10^6 viable cells•mL^{-1}. Following incubation for at least 1 h at 37 °C in a 5% CO_2 humidified atmosphere, nonadherent cells were removed by gentle washing. Ninety-five percent of the adherent cells were macrophages, and the cell viability exceeded 95% (in a trypan blue dye exclusion assay).

The next day, adherent LMs were washed with warm RPMI medium lacking FCS, and 1 mL of fresh medium supplemented with 1% FCS was then added per well. The cells were treated with the selected TLR1–9 agonists or vehicle. After incubation for between 4 and 48 h, supernatants were collected and stored at –80 °C for subsequent cytokine assays. The adherent cells were counted when the supernatant was collected. Adherent cells were also collected in TRIzol reagent for molecular analysis.

Reverse Transcriptase Quantitative Polymerase Chain Reaction

After stimulation of the LMs with TLR agonists, the cells were lysed and harvested. Total RNA was extracted with TRIzol® reagent (Life Technologies, Saint Aubin, France). The RNA concentration was determined using a Biowave DNA spectrophotometer (Biochrom, Cambridge, England), and the RNA's purity was evaluated on an Experion microfluidics electrophoresis system using RNA standard sensitivity kits (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Next, after treatment with DNase I (Life Technologies), 1 μg of total RNA was reverse-transcribed using SuperScript® III first-strand SuperMix kit (Life Technologies). A TaqMan® human chemokines array and specific TaqMan® arrays based on predesigned reagents (Life Technologies) were used for the analysis of cytokines, chemokines, and TLR transcripts. Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was performed using Gene Expression Master Mix (Life Technologies), with 20 ng of cDNA in a StepOnePlus thermocycler (Life Technologies). Thermal cycling conditions were as follows: initial denaturation at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s, and 60 °C for 1 min. Three housekeeping genes (hypoxanthine phosphoribosyltransferase [*HPRT1*], glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [*GAPDH*], and β-glucuronidase [*GUSB*]) were used for the normalization of transcript levels. The expression of 59 cytokine transcripts (22 CC chemokines, 14 CXC chemokines, the 2 C chemokines, the CX_3C chemokine fractalkine, 13 ILs, 2 IFNs, 2 colony-stimulating factors [CSFs], and 3 TNFs) was assessed in the presence of vehicle or each of the subtype-selective TLR agonists.

Immunoassays

Cytokines in the LM culture supernatants were measured using an ELISA (Duoset Development System, R&D Systems, Lille, France). Cytokine concentrations were expressed in ng/10^6 LMs. The assays' limits of detection were 4 pg•mL^{-1} for CCL3, CCL18, CCL22, and IL-1β; 8 pg•mL^{-1} for TNF-α, CCL1, and CCL4; 9 pg•mL^{-1} for IL-6; and 16 pg•mL^{-1} for CXCL1 and CXCL8.

Data Expression

Data were expressed as the mean ± standard error of the mean (SEM); below, *n* corresponds to the number of patients from whom LMs were isolated. The RT-qPCR data were expressed as the relative expression ($2^{-\Delta Ct}$) [29]. A gene was considered to be up- or downregulated when its fold-change was >2.

Results

Expression of TLR Transcripts in Human LMs

LMs were screened for the expression of the genes coding for TLRs. All 10 transcripts were detectable, and the magnitudes of TLR transcript expression were as follows: TLR8 > TLR4 > TLR1 > TLR2 > TLR7 > TLR6 > TLR5 > TLR3 > TLR9 > TLR10 (Fig. 1). There was no correlation between TLR expression on the one hand and sex or FEV_1 on the other; however, TLR2 expression was correlated with age (Spearman's $r = 0.7474$; $p = 0.0070$).

Transcriptional Cytokinome Profiling

The human LMs were stimulated with the TLR1/2 agonist Pam3CSK4 (1 μg•mL^{-1}), the TLR2 agonist HKLM (10^8 cells•mL^{-1}), the TLR3 agonists LMW and HMW poly(I:C) (10 μg•mL^{-1} for both), the TLR4 agonist LPS (10 μg•mL^{-1}), the TLR5 agonist flagellin (1 μg•mL^{-1}), the TLR6/2 agonist FSL-1 (1 μg•mL^{-1}), the TLR7 agonist imiquimod (1 μg•mL^{-1}), the TLR8 agonist ssRNA40 (1 μg•mL^{-1}), and the TLR9 agonist ODN2006 (4 μM). The results are presented in Figure 2.

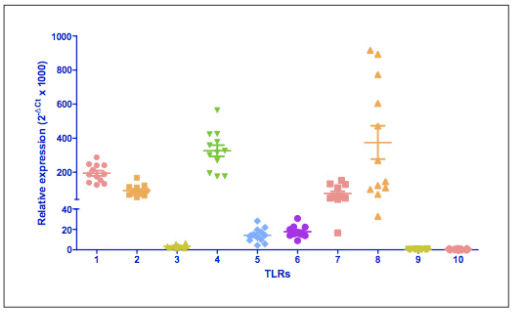


Fig. 1. Transcript expression levels for TLRs in human LMs. Levels of TLR transcripts were determined by RT-qPCR in LMs isolated from 12 patients and normalized against the expression of 3 housekeeping genes, *HPRT1*, *GAPDH*, and *GUSB*.

Of the 22 CC chemokines, 4 (CCL11, CCL16, CCL21, and CCL25) were not expressed in unstimulated LMs, and were not expressed or only weakly expressed following TLR stimulation. Furthermore, 3 CC chemokines (CCL26, CCL27, and CCL28) were weakly expressed in unstimulated LMs and were not upregulated by exposure to the TLR agonists. CCL18 was highly expressed in unstimulated LMs but was not upregulated by the TLR agonists.

The transcripts of all CXCL, C, and CX3C chemokines were found in unstimulated LMs. CXCL4 and CXCL9 were relatively weakly expressed in unstimulated LMs and only weakly upregulated in response to the TLR agonists. Very high expression levels were observed for CXCL5 and CXCL8 in unstimulated LMs. Conversely, CXCL12 transcripts were found in unstimulated cells but could no longer be detected after stimulation with most of the TLR agonists.

Of the 13 ILs, 6 (IL-2, IL-4, IL-5, IL-9, IL-12A, and IL-13) were not expressed or only weakly expressed in unstimulated LMs and in response to TLR stimulation. In contrast, IL-12B was weakly expressed in unstimulated LMs but strongly expressed in response to TLR stimulation (except with the TLR3, TLR7, and TLR9 agonists). IL-16 was not upregulated by the TLR agonists. For the growth factors CSF2 and CSF3, transcript levels were higher after exposure to the TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, and TLR6 agonists. Transcript levels of both IFN-γ and IFN-κ were low and only weakly upregulated by TLR agonists.

Although the 3 TNF transcripts were found in unstimulated LMs, only TNF and TNFSF10 were upregulated by exposure to TLR agonists.

The TLR3, TLR4, and TLR5 agonists, i.e., LPS, flagellin, and HMW poly(I:C), respectively, upregulated the greatest number of cytokine transcripts (32, 43, and 41 genes, respectively). The most intense upregulations were observed for HMW poly(I:C), LPS, and LMW poly(I:C), with >80-fold increases for the following genes: *CCL4*, *CCL5*, *CCL8*, *CXCL1*, *CXCL8*, *CXCL10*, *CXCL11*, *IL-1A*, *IL-1B*, *IL-6*, *CSF2*, *CSF3*, *TNF*, and *TNFSF10*. Imiquimod and ODN2006 induced no or very weak increases in cytokine transcript expression. In contrast, very few genes were downregulated: only 1 was downregulated by Pam3CSK4 (*TNFSF10*), HKLM (*TNFSF10*), HMW poly(I:C) (*IL-16*) and flagellin (*CCL28*), and only 3 by LPS (*IL-16*, *CCL28*, and *TNFSF14*). The fold-decreases in gene expression were small (range 3.1–6.3).

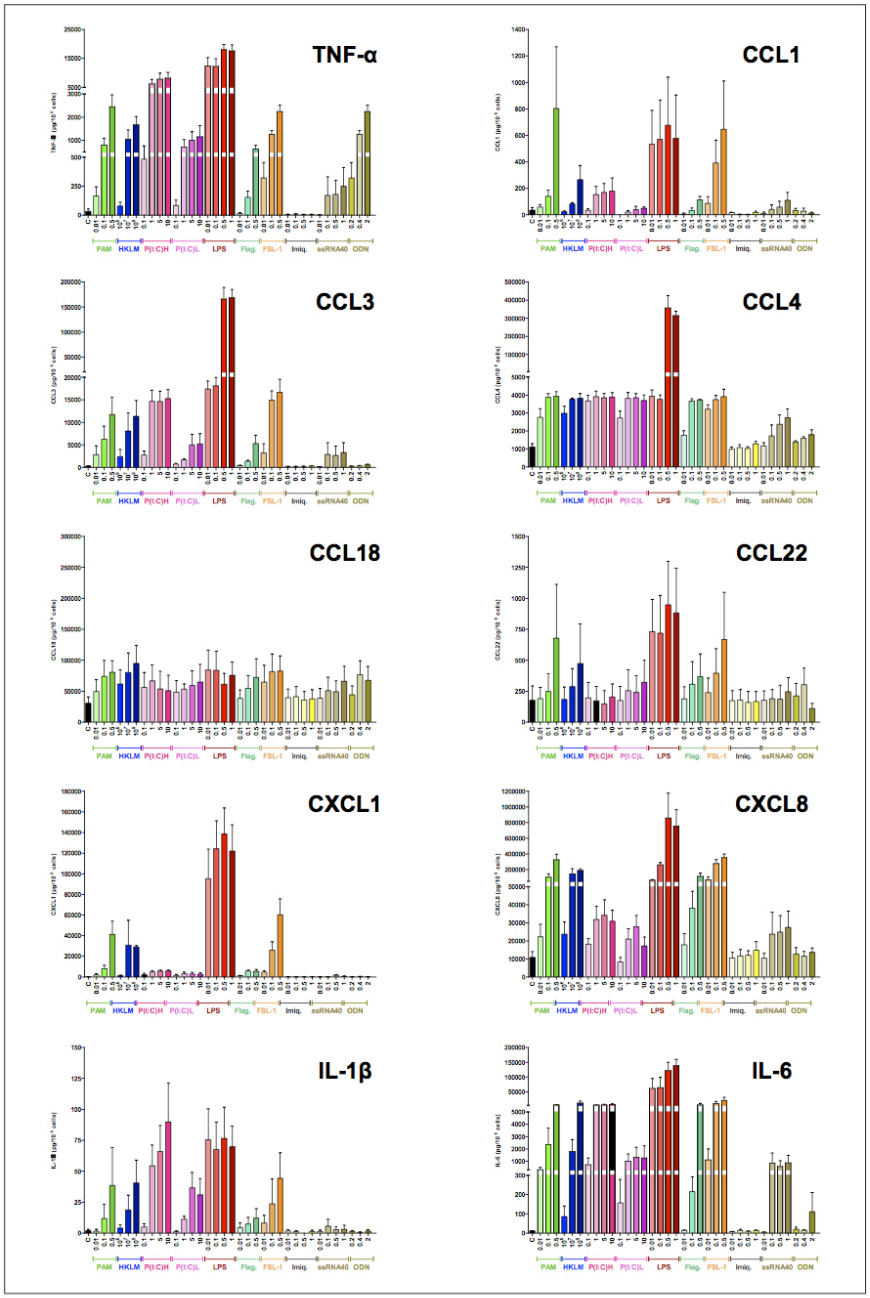
The Protein Cytokinome: Time Courses and Concentration-Response Curves

In view of the transcriptional cytokinome profiling described above, our previous published and unpublished data on LPS [26–28, 30], the known involvement of some cytokines in (i) the pathophysiology of COPD and asthma and (ii) the M1/M2 states of macrophage activation, we established concentration-response curves with the different TLR agonists for the production of 10 selected cytokines (Fig. 3). A concentration-dependent response was clearly observed for TNF-α, CCL3, CXCL8, IL-1β, and IL-6, was less pronounced for CCL1, CCL4, and CXCL1, and was almost nonexistent for CCL18 and CCL22. Among the different TLR agonists, a concentration-response relationship was most often observed for Pam3CSK4, LPS, and FSL-1. Maximum production was usually obtained with the highest concentration of agonist tested. LPS usually induced the greatest increases in cytokine production.

The amounts of cytokine protein released were associated with their transcript level, with the exception of IL-1β. It is well known that the release of IL-1β is markedly enhanced by extracellular ATP and the toxin nigericin, inducing the caspase-1-dependent release of IL-1β dependent following the formation of the NLRP3 inflammasome [31]. However, an assessment of the regulation of IL-1β release by LMs was beyond the scope of this study. As with the transcript results, the lowest level of cytokine production was observed with imiquimod and ODN2006 (with the exception of TNF-α, which was released in large quantities following LM stimulation with ODN2006).

To further investigate the response to agonists, time-response curves were obtained for 6 cytokines (Fig. 4).

Fig. 2. Expression of cytokine genes in human LMs stimulated (or not [control]) with TLR agonists. Human LMs ($n = 3$) were cultured for 6 h in the presence or absence of maximal concentrations of the following TLR agonists: the TLR1/2 agonist Pam3CSK4 (1 μg•mL^{-1}); the TLR2 agonist HKLM (108 cells•mL^{-1}); the TLR3 agonists LMW poly(I:C) (10 μg•mL^{-1}) and HMW poly(I:C) (10 μg•mL^{-1}); the TLR4 agonist LPS (10 g•mL^{-1}); the TLR5 agonist flagellin (1 μg•mL^{-1}); the TLR6/2 agonist FSL-1 (1 μg•mL^{-1}); the TLR7 agonist imiquimod (1 μg•mL^{-1}); the TLR8 agonist ssRNA40 (1 μg•mL^{-1}); and the TLR9 agonist ODN2006 (4 μM). Gray, not expressed.



3

(For legend see next page.)

For TNF-α, CCL3, and CXCL8, an early response (within 4–8 h) was observed for all agonists tested, other than imiquimod and ssRNA40, which had no effect for up to 48 h. For the remaining cytokines, the response time course was intermediate (CXCL1: 8–12 h) or late (CCL18 and CCL22: 24–48 h).

Discussion and Conclusions

We have described the TLR expression and chemokine production resulting from the stimulation of human LMs with a spectrum of TLR agonists; this enabled us to compare the cell activations triggered by each TLR subtype.

With respect to TLR transcripts, our results are in agreement with those of previous reports in which the highest expression levels were observed for TLR8, TLR1, TLR2, and TLR4 [5]. There was little interpatient variation in the transcript level for all TLRs other than TLR8, which displayed 20-fold variations from one primary culture to another. In a previous study on mouse AMs obtained by whole lung lavage, the TLR2 and TLR4 transcripts were readily detected but, strikingly, TLR9 transcripts were expressed at negligible levels [32]. In contrast, human AMs obtained by bronchoalveolar lavage from both healthy subjects and patients suffering from sarcoidosis expressed TLR2, TRL6, and TLR9 at similar levels [33]. Our results also indicate that human LMs express TLR9, albeit at a lower level than TLR6, and a much lower level than TLR2.

We also analyzed the transcription of genes coding for cytokines and chemokines after stimulation of the LMs with the different agonists. Overall, all the subtype-selective agonists gave much the same spectrum of transcripts. Only a quantitative analysis might reveal differences between the agonists; the TLR4 agonist appeared to induce the strongest response whereas the TLR7 and TLR9 agonists induced the weakest response. In a mouse model of asthma, an allergic bronchial challenge caused a marked increase in inflammatory reactivity to TLR3, TLR4, and TLR7 [34]. In sharp contrast, TLR7 expression and function were found to be markedly reduced in AMs from patients with severe asthma, and this deficiency was linked to an altered microRNA profile [35].

TLR9 mRNA is almost absent in mouse AMs, which are not sensitive to CpG-ODN [32]. The AMs from patients with sarcoidosis were found to express TLR9, and the highest TLR9 expression and the greatest increase in CXCL10 release in response to CpG ODNs was mainly observed in patients with the more acute forms of sarcoidosis, in which macrophages are thought to be classically activated [33]; however, in this particular study, stimulation with CpG ODNs did not significantly change the release of TNF-α, IL-6, IL-12p40, CXCL8, CXCL9, or CXCL11. In our study, the TLR9 agonist clearly increased the production of TNF-α and (to a much lesser degree) IL-6 but did not cause an increase in the production of IL-1β, CCL, and CXC chemokines.

Taken as a whole, our data and the literature data on TLR expression and function in LMs emphasize that the mouse AM is a surrogate cell model that does not adequately recapitulate the biology of human primary LMs.

We next selected a set of M1- and M2-type cytokines involved in COPD or asthma for protein assays [36–40]. TNF-α and chemokines involved in the recruitment of T-lymphocytes (CCL3), monocytes (CCL1), and neutrophils (CXCL1 and CXCL8) were selected as markers of the M1 activation state [37–40], and CCL18 and CCL22 were selected as markers of the M2 activation state [41]. In unstimulated cells, transcript levels and protein levels were closely related. For example, TNF-α, CCL1, CCL22, and CXCL1 transcripts and proteins were expressed at low levels in unstimulated LMs whereas CCL18 and CXCL8 displayed high transcript and protein levels. Similarly, most of the TLR agonists induced a concentration- and/or time-dependent increase in chemokine protein expression, which was closely related to the observed increase in the transcript level. However, these relationships were not always observed in LMs stimulated with TLR agonists. On the one hand, the transcripts of TLR1, TLR2, and TLR4 were strongly expressed, and stimulation of these subtypes induced strong cytokine production. On the other hand, TLR8 transcripts were expressed at much the same level as for TLR1, TLR2, and TLR4, although incubation with the agonist ssRNA40 barely produced a cytokine response. This might be related to the physicochemical properties of single-stranded RNA, which might not always be able to gain access to intracellular TLR8. In contrast, ODN2006 (the agonist of TLR9,

Fig. 3. Concentration-response curves for the chemokine production induced by subtype-selective TLR agonists. Human LMs were incubated for 6 h with vehicle or the TLR agonists Pam3CSK4 (TLR1/2 agonist, 0.01–0.5 μg•mL^{-1}), HKLM (TRL2 agonist, 10^6–10^8 cells•mL^{-1}), LMW poly(I:C) (TLR3 agonist, 0.1–10 μg•mL^{-1}), HMW poly(I:C) (TLR3 agonist, 0.1–10 μg•mL^{-1}), LPS (TLR4 agonist, 0.01–1 μg•mL^{-1}), flagellin (TLR5 agonist, 0.01–0.5 μg•mL^{-1}), FSL-1 (TLR6/2 agonist, 0.01–0.5 μg•mL^{-1}), imiquimod (TLR7 agonist, 0.01–1 μg•mL^{-1}), ssRNA40 (TLR8 agonist, 0.01–1 μg•mL^{-1}), and ODN2006 (TLR9 agonist, 0.2–2 μM). The values correspond to the mean ± SEM of 3 or 4 experiments.

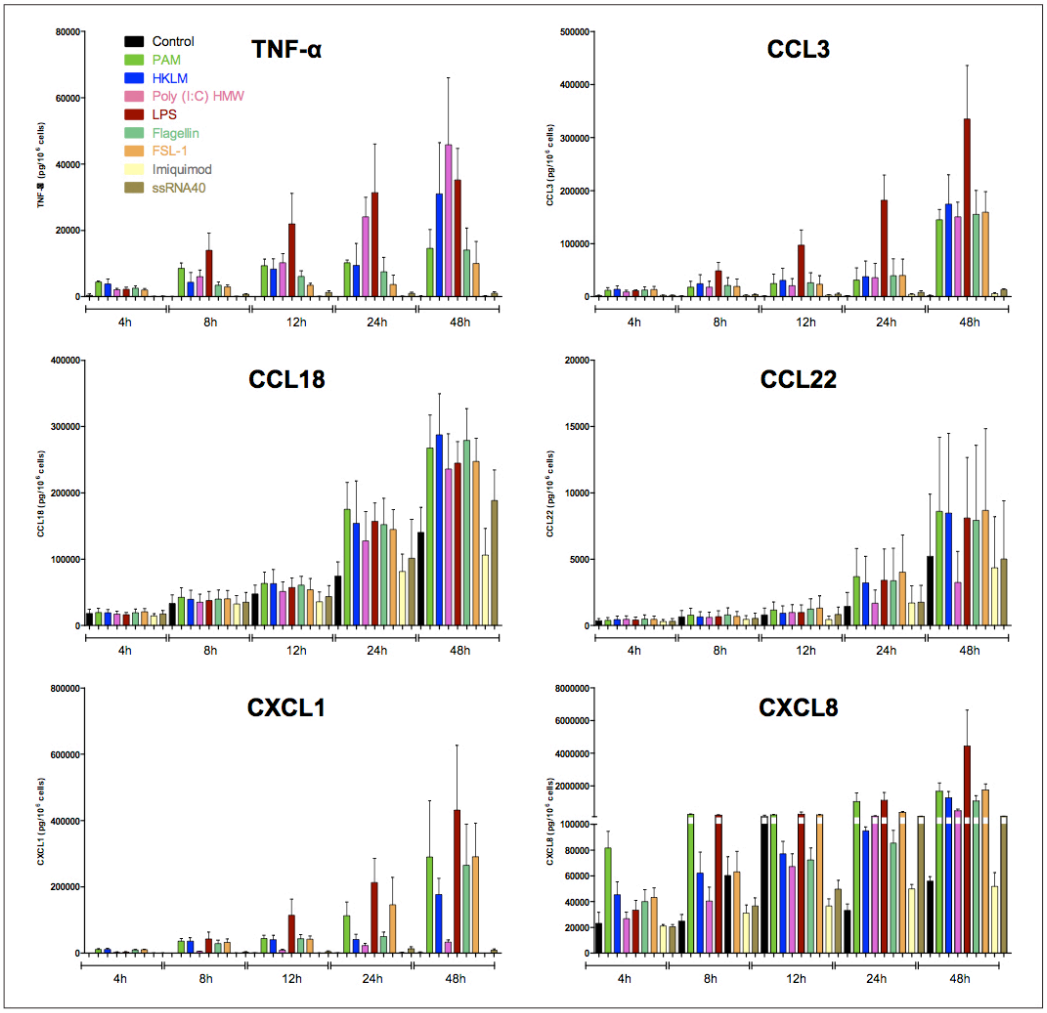


Fig. 4. Time-response curves for the chemokine production induced by subtype-selective TLR agonists. Human LMs were incubated for 4–48 h with vehicle or the TLR agonists Pam3CSK4 (TLR1/2 agonist, 1 μg•mL^{-1}), HKLM (TRL2 agonist, 10^8 cells•mL^{-1}), LMW poly(I:C) (TLR3 agonist, 10 μg•mL^{-1}), HMW poly(I:C) (TLR3 agonist, 10 μg•mL^{-1}), LPS (TLR4 agonist, 1 μg•mL^{-1}), flagellin (TLR5 agonist, 1 μg•mL^{-1}), FSL-1 (TLR6/2 agonist, 1 μg•mL^{-1}), imiquimod (TLR7 agonist, 1 μg•mL^{-1}), ssRNA40 (TLR8 agonist, 1 μg•mL^{-1}), and ODN2006 (TLR9 agonist, 4 μM). The values correspond to the mean ± SEM of 3 experiments.

which was very weakly expressed at the mRNA level) induced the intense production of TNF-α but did not induce production of the other cytokines tested. The release of cytokines considered to be specific for the M2 macrophage polarization state (e.g., CCL18 and CCL26) was not stimulated by the TLR agonists, whereas the release of other cytokines (e.g., CCL13 and 22) increased moderately (3- to 8-fold). Levels of CCL17 (also considered to

be an M2 cytokine) increased 10- and 21-fold after LM stimulation with LPS and flagellin, respectively.

Some of the chemokines that were not stimulated at the mRNA level (e.g., CCL18) were also not stimulated at the protein level in our study of the concentration-response relationship. This is probably due to the effect of time. In fact, CCL18 is often described as an M2-type cytokine that is released in the late phase of the inflammatory response (i.e., to end inflammation and induce immunoregulation). Hence, the increase in the CCL18 protein level was observed at later time points (from 24 h onwards), and so one would expect transcript levels to increase too during this period. Similar conclusions can be drawn for CCL22, for exactly the same reasons. In contrast, the M1-type chemokines assessed in this study had an early time course of expression at both the transcript and protein levels, as is typically observed. This finding is in agreement with the commonly described switch in macrophage polarization, where M1 macrophages actively participate in the onset of the inflammatory reaction and then switch to the M2 phenotype involved in the healing and repair processes [42].

When analyzing the pattern of cytokines and chemokines produced here in response to the TLR agonists, we noted that very similar transcript and protein profiles were produced in response to all the agonists. Even though various agonists from different microbial sources stimulated different TLRs, the subsequent innate immune responses were similar in terms of the nature of the chemokines produced, although the relative intensity of expression could differ. Most of the chemokines produced in response to TLR stimulation are involved in the onset and then maintenance of the inflammatory response via the recruitment of several cell types. In the this study, the target cell types are relevant to lung diseases. For example, we observed changes in the production of the chemokines involved in the recruitment of T-lymphocytes (CCL3, CCL4, CXCL9, and CXCL10), monocytes (CCL2), and neutrophils (CXCL1, CXCL5, and CXCL8); infiltration of the lungs by these inflammatory cell types is a hallmark of COPD [36–40].

The strengths of our study include a comparison of the effects of TLR activation on a broad spectrum of cytokines, in a series of experiments on paired preparations. The potential limitations relate to the use of LMs harvested from resected lung tissues and from a mixture of current smokers and ex-smokers. The cell isolation procedure using minced lung tissues had the enormous advantage of providing the large number of cells required for the paired series of experiments that we conducted; this would hardly be possible with macrophages obtained from bronchoalveolar lavage. However, our preparations might have contained a small proportion of interstitial/tissue resident macrophages, along with the great majority of AMs. A recent study with a pig model demonstrated that AMs and dendritic cells are similar to their interstitial counterparts [43]. Hoppstädter et al. [5] did not find any differences between interstitial and alveolar populations with respect to TLR expression levels or phagocytotic function but did suggest that the LPS-induced release of IL-6, IL-1β, or IL-12 differed between the 2 macrophage subtypes when stimulated after several days in culture. Once extracted from their native microenvironment and cultured ex vivo, macrophages undergo rapid morphological and phenotypical changes; the results of studies of ex vivo-cultured interstitial macrophages must therefore be interpreted with caution [44]. In the lung, exposure to TLR agonists is not restricted to the alveolar compartment; hence, the use of freshly isolated human LMs mainly from the alveolar spaces, but perhaps also from the lung tissue, might usefully reflect the clinical response more closely.

Most of the lung tissue used in this study came from current smokers and ex-smokers because surgical lung resection was performed for cancer. The impact of smoking status and COPD on TLR4-induced (but also TLR2-induced) cytokine release by LMs varies markedly from one study to another, and as a function of the cytokines measured and the TLR-agonists used. Some researchers have reported that LPS-stimulated cytokine production from AMs is higher in COPD patients and smokers than in healthy nonsmokers [45]. However, there were no significant differences in cytokine secretion between the current smokers with COPD and nonsmokers with COPD. In contrast, other studies have shown that (i) smoking reduces cytokine production by AMs upon stimulation with TLR2 and TLR4 agonists but not with a TLR3 agonist [46] or (ii) current smoking status had no effect, since the dose-response curves for the LPS-stimulated cytokines were similar in current smokers and ex-smokers [47–49].

We studied all the TLR agonists in the same series of paired experiments, and so differences in cytokine production are therefore related to the TLR agonists' effects and not to differences in the characteristics of the patients from which the LMs were derived.

In conclusion, we described the spectrum and time course of chemokine and cytokine production by human LMs in response to stimulation by subtype-selective TLR agonists. Although LPS is considered the archetypal li-

gand for the induction of M1 macrophage polarization, our results suggest that almost all of the other TLR subtype agonists can induce M1 polarization in human LMs. Our results further characterized the M1 phenotype in human LMs and validated the experimental use of TLR agonists in general (rather than just LPS) as M1-polarizing agents.

Acknowledgments

The authors thank Dr. David Fraser (Biotech Communication, Ploudalmezeau, France) for copy-editing the manuscript.

Statement of Ethics

The use of resected lung tissue was approved by the regional investigational review board (Comité de Protection des Personnes Ile de France VIII, Boulogne-Billancourt, France), and the patients undergoing surgical lung resection gave their informed consent.

Disclosure Statement

The authors declare no conflict of interest.

References

1 Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, Taylor PR. Tissue-resident macrophages. Nat Immunol. 2013 Oct;14(10):986–95.
2 Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. Cell. 2006 Feb;124(4):783–801.
3 Bauer RN, Diaz-Sanchez D, Jaspers I. Effects of air pollutants on innate immunity: the role of Toll-like receptors and nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors. J Allergy Clin Immunol. 2012 Jan;129(1):14–24.
4 Maris NA, Dessing MC, de Vos AF, Bresser P, van der Zee JS, Jansen HM, et al. Toll-like receptor mRNA levels in alveolar macrophages after inhalation of endotoxin. Eur Respir J. 2006 Sep;28(3):622–6.
5 Hoppstädter J, Diesel B, Zarbock R, Breinig T, Monz D, Koch M, et al. Differential cell reaction upon Toll-like receptor 4 and 9 activation in human alveolar and lung interstitial macrophages. Respir Res. 2010 Sep;11(1):124.
6 Juarez E, Nuñez C, Sada E, Ellner JJ, Schwander SK, Torres M. Differential expression of Toll-like receptors on human alveolar macrophages and autologous peripheral monocytes. Respir Res. 2010 Jan;11(1):2.
7 Hoogerwerf JJ, de Vos AF, van't Veer C, Bresser P, de Boer A, Tanck MW, et al. Priming of alveolar macrophages upon instillation of lipopolysaccharide in the human lung. Am J Respir Cell Mol Biol. 2010 Mar;42(3):349–56.
8 Strieter RM, Belperio JA, Keane MP. Host innate defenses in the lung: the role of cytokines. Curr Opin Infect Dis. 2003 Jun;16(3):193–8.
9 Bafadhel M, McKenna S, Terry S, Mistry V, Reid C, Haldar P, et al. Acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: identification of biologic clusters and their biomarkers. Am J Respir Crit Care Med. 2011 Sep;184(6):662–71.
10 Busse WW, Lemanske RF Jr, Gern JE. Role of viral respiratory infections in asthma and asthma exacerbations. Lancet. 2010 Sep;376(9743):826–34.
11 Eder W, Klimecki W, Yu L, von Mutius E, Riedler J, Braun-Fahrländer C, et al.; ALEX Study Team. Toll-like receptor 2 as a major gene for asthma in children of European farmers. J Allergy Clin Immunol. 2004 Mar;113(3):482–8.
12 Kormann MS, Depner M, Hartl D, Klopp N, Illig T, Adamski J, et al. Toll-like receptor heterodimer variants protect from childhood asthma. J Allergy Clin Immunol. 2008;122:86–92.
13 Sarir H, Mortaz E, Karimi K, Kraneveld AD, Rahman I, Caldenhoven E, et al. Cigarette smoke regulates the expression of TLR4 and IL-8 production by human macrophages. J Inflamm (Lond). 2009 May;6(1):12.
14 Karimi K, Sarir H, Mortaz E, Smit JJ, Hosseini H, De Kimpe SJ, et al. Toll-like receptor-4 mediates cigarette smoke-induced cytokine production by human macrophages. Respir Res. 2006 Apr;7(1):66.
15 Koarai A, Yanagisawa S, Sugiura H, Ichikawa T, Akamatsu K, Hirano T, et al. Cigarette smoke augments the expression and responses of toll-like receptor 3 in human macrophages. Respirology. 2012 Aug;17(6):1018–25.
16 Hansel TT, Barnes PJ. New drugs for exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. Lancet. 2009 Aug;374(9691):744–55.
17 Paul-Clark MJ, George PM, Gatheral T, Parzych K, Wright WR, Crawford D, et al. Pharmacology and therapeutic potential of pattern recognition receptors. Pharmacol Ther. 2012 Aug;135(2):200–15.
18 Zeyer F, Mothes B, Will C, Carevic M, Rottenberger J, Nürnberg B, et al. mRNA-mediated gene supplementation of Toll-like receptors as treatment strategy for asthma in vivo. PLoS One. 2016 Apr;11(4):e0154001.
19 Robinson E, MacDonald KD, Slaughter K, McKinney M, Patel S, Sun C, et al. Lipid nanoparticle-delivered chemically modified mRNA restores chloride secretion in cystic fibrosis. Mol Ther. 2018 Aug;26(8):2034–46.
20 Antony JS, Dewerth A, Haque A, Handgretinger R, Kormann MS. Modified mRNA as a new therapeutic option for pediatric respiratory diseases and hemoglobinopathies. Mol Cell Pediatr. 2015 Dec;2(1):11.
21 Jackson S, Candia AF, Delaney S, Floettmann S, Wong C, Campbell JD, et al. First-in-human study with the inhaled TLR9 oligonucleotide agonist AZD1419 results in interferon responses in the lung, and is safe and well-tolerated. Clin Pharmacol Ther. 2018 Aug;104(2):335–45.
22 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 Dec;25(12):677–86.
23 Byers DE, Holtzman MJ. Alternatively activated macrophages and airway disease. Chest. 2011 Sep;140(3):768–74.
24 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):478–88.
25 Baral P, Batra S, Zemans RL, Downey GP, Jeyaseelan S. Divergent functions of Toll-like receptors during bacterial lung infections. Am J Respir Crit Care Med. 2014 Oct;190(7):722–32.
26 Buenestado A, Grassin Delyle S, Arnould I, Besnard F, Naline E, Blouquit-Laye S, et al. The role of adenosine receptors in regulating production of tumour necrosis factor-alpha and chemokines by human lung macrophages. Br J Pharmacol. 2010 Mar;159(6):1304–11.
27 Buenestado A, Grassin-Delyle S, Guitard F, Naline E, Faisy C, Israël-Biet D, et al. Roflumilast inhibits the release of chemokines and TNF-α from human lung macrophages stimulated with lipopolysaccharide. Br J Pharmacol. 2012 Mar;165(6):1877–90.
28 Victoni T, Salvator H, Abrial C, Brollo M, Porto LC, Lagente V, et al. Human lung and monocyte-derived macrophages differ with regard to the effects of β2-adrenoceptor agonists on cytokine release. Respir Res. 2017 Jun;18(1):126.

29 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001 Dec;25(4):402–8.
30 Abrial C, Grassin-Delyle S, Salvator H, Brollo M, Naline E, Devillier P. 15-Lipoxygenases regulate the production of chemokines in human lung macrophages. Br J Pharmacol. 2015 Sep;172(17):4319–30.
31 Lopez-Castejon G, Brough D. Understanding the mechanism of IL-1β secretion. Cytokine Growth Factor Rev. 2011 Aug;22(4):189–95.
32 Suzuki K, Suda T, Naito T, Ide K, Chida K, Nakamura H. Impaired toll-like receptor 9 expression in alveolar macrophages with no sensitivity to CpG DNA. Am J Respir Crit Care Med. 2005 Apr;171(7):707–13.
33 Schnerch J, Prasse A, Vlachakis D, Schuchardt KL, Pechkovsky DV, Goldmann T, et al. Functional Toll-like receptor 9 expression and CXCR3 ligand release in pulmonary sarcoidosis. Am J Respir Cell Mol Biol. 2016 Nov;55(5):749–57.
34 Naessens T, Vander Beken S, Bogaert P, Van Rooijen N, Lienenklaus S, Weiss S, et al. Innate imprinting of murine resident alveolar macrophages by allergic bronchial inflammation causes a switch from hypoinflammatory to hyperinflammatory reactivity. Am J Pathol. 2012 Jul;181(1):174–84.
35 Rupani H, Martinez-Nunez RT, Dennison P, Lau LC, Jayasekera N, Havelock T, et al. Toll-like receptor 7 is reduced in severe asthma and linked to an altered microRNA profile. Am J Respir Crit Care Med. 2016 Jul;194(1):26–37.
36 Barnes PJ. The cytokine network in chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Cell Mol Biol. 2009 Dec;41(6):631–8.
37 Capelli A, Di Stefano A, Gnemmi I, Balbo P, Cerutti CG, Balbi B, et al. Increased MCP-1 and MIP-1beta in bronchoalveolar lavage fluid of chronic bronchitics. Eur Respir J. 1999 Jul;14(1):160–5.
38 Costa C, Rufino R, Traves SL, Lapa E Silva JR, Barnes PJ, Donnelly LE. CXCR3 and CCR5 chemokines in induced sputum from patients with COPD. Chest. 2008 Jan;133(1):26–33.
39 Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. Am J Respir Crit Care Med. 1996 Feb;153(2):530–4.
40 Traves SL, Culpitt SV, Russell RE, Barnes PJ, Donnelly LE. Increased levels of the chemokines GROalpha and MCP-1 in sputum samples from patients with COPD. Thorax. 2002 Jul;57(7):590–5.
41 Kim EY, Battaile JT, Patel AC, You Y, Agapov E, Grayson MH, et al. Persistent activation of an innate immune response translates respiratory viral infection into chronic lung disease. Nat Med. 2008 Jun;14(6):633–40.
42 Stout RD, Suttles J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. J Leukoc Biol. 2004 Sep;76(3):509–13.
43 Maisonnasse P, Bordet E, Bouguyon E, Bertho N. Broncho alveolar dendritic cells and macrophages are highly similar to their interstitial counterparts. PLoS One. 2016 Dec;11(12):e0167315.
44 Schyns J, Bureau F, Marichal T. Lung interstitial macrophages: past, present, and future. J Immunol Res. 2018 Apr;2018:5160794.
45 Hodge S, Matthews G, Mukaro V, Ahern J, Shivam A, Hodge G, et al. Cigarette smoke-induced changes to alveolar macrophage phenotype and function are improved by treatment with procysteine. Am J Respir Cell Mol Biol. 2011 May;44(5):673–81.
46 Chen H, Cowan MJ, Hasday JD, Vogel SN, Medvedev AE. Tobacco smoking inhibits expression of proinflammatory cytokines and activation of IL-1R-associated kinase, p38, and NF-kappaB in alveolar macrophages stimulated with TLR2 and TLR4 agonists. J Immunol. 2007 Nov;179(9):6097–106.
47 Armstrong J, Harbron C, Lea S, Booth G, Cadden P, Wreggett KA, et al. Synergistic effects of p38 mitogen-activated protein kinase inhibition with a corticosteroid in alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. J Pharmacol Exp Ther. 2011 Sep;338(3):732–40.
48 Armstrong J, Sargent C, Singh D. Glucocorticoid sensitivity of lipopolysaccharide-stimulated chronic obstructive pulmonary disease alveolar macrophages. Clin Exp Immunol. 2009 Oct;158(1):74–83.
49 Higham A, Booth G, Lea S, Southworth T, Plumb J, Singh D. The effects of corticosteroids on COPD lung macrophages: a pooled analysis. Respir Res. 2015 Aug;16(1):98.

- **Annexe 5 = Article n° 7**

Bitter taste receptors (TAS2Rs) in human lung macrophages: receptor expression and inhibitory effects of TAS2R agonists.

Stanislas GRASSIN-DELYLE[1,2], Hélène SALVATOR[1,3], Nikola MANTOV[3], Charlotte ABRIAL[3], Marion BROLLO[3], Christophe FAISY[3], Emmanuel NALINE[1,3] Louis-Jean COUDERC[1,3], and Philippe DEVILLIER[1,3]

Soumis à Pharmacological Research, Octobre 2018

Résumé:

Les récepteurs du goût amer (TAS2R) interviennent dans la relaxation des voies respiratoires mais sont également exprimés dans les leucocytes du sang humain. Nous avons étudié l'expression de TAS2R et les effets des agonistes de TAS2R sur la libération de cytokines induite par le lipopolysaccharides (LPS) dans les macrophages du poumon humain (LM).

Des macrophages pulmonaires ont été isolés chez des patients opérés d'un carcinome. Nous avons mesuré en RT-qPCR les transcriptions de 16 TAS2R (TAS2R 3/4/5/7/8/9/10/14/19/20/31/38/43/45/45 et 46) dans des macrophages pulmonaires non stimulés et stimulés par du LPS (10 $ng.mL^{-1}$). Les macrophages ont également été incubés avec des agonistes de TAS2R pendant 24 h. Les concentrations des cytokines TNF-α, CCL3, CXCL8 et IL-10 ont été mesurées dans les surnageants par ELISA.

Les expressions des 16 sous-types de TAS2R ont été détectées dans les macrophages pulmonaires. L'ajout de LPS a entraîné une augmentation de l'expression de la plupart des TAS2R, principalement significatif pour TAS2R7 et 38. La quinine et le dénatonium, deux agonistes non sélectifs des TAS2Rs, ont inhibé la production de TNF-α, CCL3 et CXCL8 mais le diphénidol était inactif. Des agonistes partiellement sélectifs (dapsone, colchicine, strychnine et chloroquine) et des agonistes sélectifs (érythromycine (TAS2R10), phénanthroline (TAS2R5), ofloxacine (TAS2R9) et carisoprodol (TAS2R14)) ont également inhibé la sécrétion des cytokines induite par le LPS. En revanche, deux autres agonistes (le cromoglycate de sodium (TAS2R20) et la saccharine (TAS2R31 et 43)) étaient inactifs. Les

agonistes de TAS2R diminuaient de la même façon la production d'IL-10, ce qui suggère que cette cytokine anti-inflammatoire n'est pas impliquée dans l'inhibition de la production de cytokines.

En conclusion, les macrophages pulmonaires humains expriment les TAS2R. Des expériences avec des agonistes de TAS2R suggèrent l'implication des TAS2R 3, 4, 5, 9, 10, 14, 30, 39 et 40 dans l'inhibition de la production de cytokines. Les TAS2R pourraient constituer de nouvelles cibles médicamenteuses dans les maladies pulmonaires obstructives inflammatoires.

Bitter taste receptors (TAS2Rs) in human lung macrophages: receptor expression and inhibitory effects of TAS2R agonists.

Running title: bitter taste receptors in human lung macrophages

Stanislas GRASSIN-DELYLE[1,2], Hélène SALVATOR[1,3], Nikola MANTOV[3], Charlotte ABRIAL[3], Marion BROLLO[3], Christophe FAISY[3], Emmanuel NALINE[1,3] Louis-Jean COUDERC[1,3], and Philippe DEVILLIER[1,3]

[1] Department of Airway Diseases, Foch Hospital, Suresnes, France

[2] INSERM UMR1173, UFR Sciences de la Santé Simone Veil, Paris Saclay University, Montigny-le-Bretonneux, France.

[3] Laboratory of Research in Respiratory Pharmacology–UPRES EA 220, Foch Hospital, Paris-Saclay University, Suresnes, France.

E-mail addresses: SGD: s.grassindelyle@hopital-foch.org; HS: h.salvator@hopital-foch.com; NM: nikola.mantov@u-psud.fr; MB: marion.brollo@yahoo.fr; CA: abrial.charlotte@gmail.com; CF: christophe.faisy@wanadoo.fr; EN: upresea220@orange.fr; LJC: lj.couderc@hopital-foch.org; PD: p.devillier@hopital-foch.org.

Address correspondence to: Professor Philippe Devillier, Laboratory of Research in Respiratory Pharmacology–UPRES EA220, Foch Hospital, Paris-Saclay University, 11 rue Guillaume Lenoir, F-92150 Suresnes, France. Tel: +33-146-252-791, Fax: +33-140-999-657. E-mail: p.devillier@hopital-foch.org

Keywords: Bitter taste receptor; human lung macrophage, parenchyma explant.

Abstract ***(248 words)***

Background: Bitter-taste receptors (TAS2Rs) are involved in airway relaxation but are also expressed in human blood leukocytes. We studied TAS2R expression and the effects of TAS2R agonists on the lipopolysaccharide (LPS)-induced cytokine release in human lung macrophages (LMs).

Methods: Lung macrophages were isolated from patients undergoing surgery for carcinoma. We used RT-qPCR to measure transcripts of 16 TAS2Rs (TAS2Rs 3/4/5/7/8/9/10/14/19/20/31/38/39/43/45 and 46) in unstimulated and LPS-stimulated (10 $ng.mL^{-1}$) LMs. The macrophages were also incubated with TAS2R agonists for 24 h. Supernatant levels of the cytokines TNF-α, CCL3, CXCL8 and IL-10 were measured using ELISAs.

Results: The transcripts of all 16 TAS2Rs were detected in macrophages. The addition of LPS led to an increase in the expression of most TAS2Rs, which was significant for TAS2R7 and 38. Although the promiscuous TAS2R agonists, quinine and denatonium, inhibited the LPS-induced release of TNF-α, CCL3 and CXCL8, diphenidol was inactive. Partially selective agonists (dapsone, colchicine, strychnine, and chloroquine) and selective agonists (erythromycin (TAS2R10), phenanthroline (TAS2R5), ofloxacin (TAS2R9), and carisoprodol (TAS2R14)) also suppressed the LPS-induced cytokine release. In contrast, two other agonists (sodium cromoglycate (TAS2R20) and saccharin (TAS2R31 and 43)) were inactive. TAS2R agonists suppressed IL-10 production - suggesting that this anti-inflammatory cytokine is not involved in the inhibition of cytokine production.

Conclusions: Human LMs expressed TAS2Rs. Experiments with TAS2R agonists' suggested the involvement of TAS2Rs 3, 4, 5, 9, 10, 14, 30, 39 and 40 in the inhibition of cytokine production. TAS2Rs may constitute new drug targets in inflammatory obstructive lung disease.

BACKGROUND

Inflammatory lung diseases such as asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) are characterized by airway obstruction and airflow limitation. The bitter taste receptors (TAS2Rs) constitute a family of around 25 G-protein coupled receptors initially thought to be located exclusively on the tongue, where their activation enables our perception of a bitter taste. However, TAS2Rs are now known to be expressed in the human bronchus [1, 2], airway epithelial cells [3, 4], mast cells [5] and blood leukocytes [6, 7].

In human airway smooth muscle, TAS2R stimulation induces relaxation [1, 2]; inhaled bitter tastants also decreased airway obstruction in a mouse model of asthma [1]. The motile cilia of human airway epithelial cells express TAS2Rs, and bitter compounds increase the ciliary beat frequency as part of an airway defence mechanism [4]. In sinonasal epithelial cells, activation of TAS2R38 stimulates an increase in nitric oxide production, which in turn increases mucociliary clearance and directly kills bacteria [8, 9]. The polymorphisms that underlie TAS2R38's functionality appear to be involved in susceptibility to upper respiratory bacterial infections [8, 9]. In IgE-receptor–activated primary human mast cells, agonists known to bind to the expressed TAS2Rs were found to inhibit the release of histamine and prostaglandin D2 [5]. Furthermore, blood leukocytes from children with severe asthma display elevated TAS2R expression levels and two TAS2R agonists inhibited the release of several pro-inflammatory cytokines and eicosanoids in whole blood from adults [7]. In general, TAS2R agonists may have both anti-inflammatory properties and bronchodilatory activities.

Lung macrophages are involved in the pathophysiology of pulmonary diseases like asthma or COPD, where the cells orchestrate inflammatory reactions via the release of cytokines and chemokines [10-12]. The expression of TAS2Rs in lung macrophages (LMs) has not previously been assessed. There are few old reports on the effect of certain bitter tastants (such as chloroquine, colchicine, erythromycin or ofloxacin) on cytokine release from mouse

peritoneal macrophages [13], monocyte/macrophage cell lines [14-17], human blood monocytes and monocyte-derived macrophages/dendritic cells [15, 17-19]. However, human blood monocytes or monocyte-derived macrophages are surrogate cell models that do not adequately recapitulate the biology of primary LMs [20-24].

The objectives of the present study were to (i) characterize TAS2R expression in human LMs, (ii) describe the inhibitory effects of various TAS2R agonists on lipopolysaccharide (LPS)-induced cytokine production, (iii) infer the subtypes of TAS2R involved, and (iv) determine whether IL-10 acts as a potential mediator of TAS2R inhibitory activities on LPS-induced cytokine production.

MATERIALS AND METHODS

Drugs and chemicals.

The TAS2R agonists chloroquine diphosphate, quinine hydrochloride dihydrate, saccharin sodium hydrate, denatonium benzoate, 1,10-phenanthroline hydrochloride monohydrate, ofloxacin, strychnine hemisulphate, erythromycin, dapsone, carisoprodol, and sodium cromoglycate were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) and diphenidol hydrochloride was provided by TCI Europe (Zwijndrecht, Belgium). All products were solubilized and diluted in sterile water, with the exception of erythromycin, dapsone, and carisoprodol, which were solubilized in DMSO and then diluted in water. The maximum final concentrations of DMSO in the organ bath had no effect on cell viability.

Antibiotics, DMSO, L-glutamine, trypan blue dye, heat-inactivated foetal calf serum and LPS (from *E. coli* serotype 0111:B4) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). RPMI medium was from Eurobio Biotechnology (Les Ulis, France).

Preparations of human lung macrophages and explants.

Experiments on human tissue were approved by the regional independent ethics committee board (*Comité de Protection des Personnes Île de France VIII*, Boulogne-Billancourt, France). Lung tissue samples were obtained from 28 patients (18 males and 10 females; smoker/ex-smoker/nonsmoker: 11/16/1; mean ± standard error (SD) age: 65.4 ± 8.1 years; FEV1 = 80.2 ± 20.9 %; pack-years: 41 ± 21; FEV1/FVC ratio: 0.77 ± 0.1; 7 COPD (FEV1/FVC < 0.7); none had severe COPD) undergoing surgical resection for lung carcinoma and who had not received prior chemotherapy. The LMs were isolated from macroscopically normal lung parenchyma (obtained from sites distant from the tumour), dissected free of pleura, visible airways and blood vessels, and then chopped into 3-5 mm^3 fragments, as previously described [21, 25-28].

Briefly, the fluid collected from several washings of the minced peripheral lung tissues was centrifuged (2000 rpm for, 10 min). The cell pellet was resuspended in RPMI supplemented with 10% heat-inactivated foetal calf serum, 2 mM L-glutamine, and antibiotics. Resuspended viable cells (10^6 per mL) were then aliquoted into either a 12-well plate (for transcriptional assays) or a 24-well plate (for cytokine assays). Following incubation for at least 2 hours at 37°C (in a 5% CO_2 humidified atmosphere), non-adherent cells were removed by gentle washing. The remaining cells were maintained at 37°C and 5% CO_2 overnight. It has been shown that the adherence step does not significantly influence overall transcriptional changes in alveolar macrophages, relative to flow-cytometry-based cell-sorting [29]. The adherent cells (about 2 x 10^5 cells per well, for a 24-well plate) were >95% pure macrophages, as determined by May-Grünwald-Giemsa staining and CD68 immunocytochemistry. Cell viability exceeded 90%, as assessed in a trypan blue dye exclusion assay. Culture plates with adherent macrophages were washed with warm medium. One mL of fresh medium supplemented with 1% foetal calf serum was added per well, and the culture plates were incubated overnight at 37°C in a 5% CO_2 humidified atmosphere.

Treatment of lung macrophages

On the day after isolation, macrophages or explants were washed twice, and 1 mL of RPMI was added per well. The LMs were exposed for 24 h to LPS (10 $ng \cdot mL^{-1}$). The latter LPS concentration was selected as being submaximal on the basis of previous data from time-response and concentration-response curves [27]. TAS2R agonists were added to the culture medium one hour before exposure to LPS. After a 24 h incubation in RPMI at 37°C (in a 5% CO2 humidified atmosphere), culture supernatants from the LMs and the explants were collected and stored at -80°C for subsequent cytokine assays. Although more than 100 molecules have been described as TAS2R agonists, some TAS2Rs are still orphan receptors that lack a cognate agonist [30, 31]. In an initial series of experiments, the preparations were exposed to a maximal concentration (1 mM) of promiscuous TAS2R agonists acting on at least 8 different TAS2Rs (diphenidol, quinine and denatonium) (Table 1) [30, 31]. In a second series of experiments, the preparations were exposed to a range of concentrations of more selective TAS2R agonists (chloroquine, dapsone, strychnine, sodium cromoglycate, ofloxacin, phenanthroline, erythromycin, and carisoprodol) to infer the TAS2R subtype.

Cytokine assays.

The cytokine concentrations in the supernatant (TNF-α, IL-10, CCL3 and CXCL8) were measured with an ELISA (R&D Systems), according to the manufacturer's instructions. The assays' limits of detection were 4 $pg.mL^{-1}$ for CCL3, 8 $pg.mL^{-1}$ for TNF-α, 30 $pg.mL^{-1}$ for IL-10, and 32 $pg.mL^{-1}$ for CXCL8. The supernatants were diluted with RPMI as appropriate, and the optical density was determined at 450 nm using a microplate reader (MRX II, Dynex Technologies, Saint-Cloud, France). Cytokine concentrations were expressed in $pg.10^{-6}$ LMs, unless otherwise stated. Cytotoxicity was determined by measuring the lactate dehydrogenase

(LDH) activity in LM supernatants (LDH assay, Cayman Chemical, Montigny le Bretonneux, France).

Reverse transcriptase – quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) analysis.

RT-qPCR experiments were performed as previously described, with some modifications [2]. Lung macrophages were stimulated (or not) for 24 h with LPS, and total RNA was prepared using TRIzol® reagent (Life Technologies, Saint Aubin, France). The amount of RNA extracted was estimated by spectrophotometry at 260 nm (Biowave DNA; Biochrom, Cambridge, UK) and its quality was assessed in a microfluidic electrophoresis system (RNA Standard Sensitivity kits for Experion®, BioRad, Marnes-la-Coquette, France). After treatment with DNase I (Life Technologies, Saint Aubin, France), 1 µg of total RNA was subjected to reverse transcription (SuperScript® III First-Strand SuperMix kit, Life Technologies). The resulting cDNA was then used for quantitative real-time PCR experiments with TaqMan® chemistry (Life Technologies). The amplification was carried out using 20 ng cDNA (Gene Expression Master Mix, Life Technologies) in a StepOnePlus thermocycler (Life Technologies). The conditions were as follows: initial denaturation at 95°C for 10 min, and then 40 cycles of annealing/extension (95°C for 15 s and then 60°C for 1 min). Fluorescence was measured at each cycle, and the real-time PCR's threshold cycle (Ct) was defined as the point at which a fluorescence signal corresponding to the amplification of a PCR product was detected. The reaction volume was set to 10 µL. The expression of transcripts of the 16 TAS2R-encoding genes (*TAS2R3, TAS2R4, TAS2R5, TAS2R7, TAS2R8, TAS2R9, TAS2R10, TAS2R14, TAS2R19, TAS2R20, TAS2R31, TAS2R38, TAS2R39, TAS2R43 TAS2R45,* and *TAS2R46*) in the LMs was analysed using a specific TaqMan® array with predesigned reagents (Assay-on-Demand®, Life Technologies). In order to confirm the extraction of intact cellular mRNA and standardize the quantitative data, the reference gene coding for hypoxanthine phosphoribosyltransferase (*HPRT1*) was amplified as the same time.

Statistical analysis.

Values in the text and figures are expressed as the mean ±

standard error of the mean (SEM) unless otherwise stated from experiments with *n* independent donors. The quantitative data obtained from RT-qPCR experiments was expressed as the relative expression ($2^{-\Delta Ct}$), where ΔC_t is the difference between the target gene C_t and the mean C_t of the reference gene.

Data were evaluated by using either non-parametric paired tests (Wilcoxon's signed rank test or Friedman's test, followed by Dunn's test for multiple comparisons, as appropriate) or a paired Student's t-test. The threshold for statistically significant was set to $p<0.05$.

RESULTS

Expression of bitter taste receptor gene transcripts in lung macrophages.

We analysed the expression patterns of 16 of the 25 known TAS2Rs in humans, based on our previous results in human bronchi [2] and other literature data in human airway smooth muscle [1], airway epithelial cells [3, 4] and blood leukocytes [6, 7]. Transcripts of genes coding for 15 bitter taste receptors were identified in all the preparations (n=5 to 12), whereas *TAS2R43* transcripts were found in LMs from 4 of 6 patients only. Exposure to LPS was generally associated with an increase in TAS2R receptor expression; the increase was statistically significant for *TAS2R7* and *TAS2R38* (Figure 1).

Effects of TAS2R agonists on cytokine production by human lung macrophages.

Lipopolysaccharide induced a ~300-fold increase in TNF-α release (from 209 ± 56 pg.10^{-6} LMs in the absence of LPS to 63151 ± 12561 pg.10^{-6} LMs in the presence of LPS; n=6 paired preparations). In the same preparations, the LPS-induced increases in chemokine release were

lower: an ~80-fold increase for CCL3 (from 3467 ± 1009 pg.10^{-6} LMs in the absence of LPS to 276235 ± 71937 pg.10^{-6} LMs in the presence of LPS) and a 34-fold increase for CXCL8 (from 37 ± 9 pg.10^{-6} LMs in the absence of LPS to 1279 ± 347 pg.10^{-6} LMs in the presence of LPS); these findings are in agreement with our previous results [25, 27, 28].

The first set of experiments was carried out with three promiscuous TAS2R agonists (diphenidol, quinine, and denatonium) at a concentration of 1 mM (in order to cover the widest possible range of receptors; Table 1). Quinine almost completely abrogated the LMs' LPS-induced production of TNF-α, CCL3 and CXCL8 (inhibition ≥ 98%), and denatonium significantly inhibited the production of TNF-α and CCL3 (but not of CXCL8) to a much lesser degree (28% and 43%, respectively). Diphenidol was inactive (Figure 2). Quinine is known to activate all of its nine cognate TAS2Rs in the same relatively low concentration range (~10 μM; Table 1) [31]. In marked contrast, the activation ranges for denatonium and diphenidol spanned five and three orders of magnitude, respectively (Table 1) [31]. Given the panels of TAS2R activated by each of these three agonists and the respective activation concentrations, this first set of experiments suggested that the inhibitory effects of quinine and denatonium are almost certainly not mediated by TAS2Rs 1, 7, 13, and 31, and probably not mediated by TAS2Rs 14, 16, 20, 30, 38, 43, and 46.

To further determine the TAS2R subtypes involved in the modulation of cytokine release by LMs, relatively selective agonists (Table 1) were used at concentrations ranging from 1 μM to 1 mM. The significant inhibitory activity of dapsone at 0.3 mM (increasing up to 1 mM) suggests the involvement of TAS2Rs 4, 10, and 40 (Figure 3). The involvement of TAS2R4 is also indicated by the inhibitory effects of colchicine. Moreover, the observation that partial inhibition (38-57%) by strychnine was observed at a much higher concentration (1 mM) than its EC_{50} value for TAS2R46 expressed by transfected HEK-293T cells (Table 1) suggests that the latter receptor is not involved but does not rule out the involvement of TAS2R10.

Chloroquine was fully active at a concentration of 10^{-4} M, suggesting the involvement of TAS2R3 and (to a lesser degree) TAS2R39.

Erythromycin, phenanthroline, ofloxacin, and carisoprodol are considered to be selective for a single (different) subtype of TAS2R. Erythromycin is a relatively weak agonist at 1 mM (activation threshold concentration: 0.3 mM) at TAS2R10, although off-target activities could also explained the compound's inhibitory activity; solid evidence of the involvement of this subtype is hard to obtain. Phenanthroline is a selective TAS2R5 agonist; indeed, it is the only TAS2R5 agonist to have been described to date [31]. The compound's potent inhibitory effect in the present study suggests the involvement of this TAS2R subtype. Ofloxacin is highly selective for TAS2R9, and was associated with significant inhibition of LPS-induced CCL3 and CXCL8 release, which also suggests the involvement of this TAS2R subtype. Carisoprodol is reportedly selective for TAS2R14, with an activation threshold concentration of 0.1 mM. Its significant inhibition of LPS-induced release of the three cytokines suggests the involvement of the TAS2R14, and is consistent with quinine's inhibitory profile here (Figure 4).

Lastly, sodium cromoglycate (a selective TAS2R20 agonist, at an active concentration of 1 mM) and saccharin (an active agonist of both TAS2R31 and 43 at 1 mM) were devoid of activity (data not shown; n=7 and 8, respectively); this finding rules out the involvement of these three TAS2R subtypes, as had already been indicated by our results with the promiscuous agonists. None of the TAS2R agonists caused a significant increase in LDH release, with the exception of chloroquine and colchicine at their highest concentrations (1 mM, and 0.1 mM, respectively) which induced a weak (~2-fold) increase in LDH release.

Overall, cross-tabulation of the effects on LPS-induced cytokine release suggests the highly probable involvement of TAS2Rs 3, 4, 5, 9, 10, 30, 39 and 40 and (with a degree of inconsistency) TAS2R14. The high level of TAS2R14 expression further supports the

involvement of this subtype. In contrast, the involvement of TAS2Rs 20, 31 and 43 can be ruled out. Lastly, the results obtained with the present set of agonists could not preclude the involvement of other TAS2Rs (particularly, the orphan receptors TAS2Rs 19, 42, and 50). It is noteworthy that the maximal level of inhibition (≥90%) observed with quinine, chloroquine, phenanthroline and erythromycin was similar to that seen for budesonide at 10^{-8} M (Table 2).

Effects of TAS2R agonists on IL-10 production by human lung macrophages.

Interleukin-10 is an immunomodulatory cytokine with potent anti-inflammatory activity; as such, it may be an essential mediator of the TAS2R agonists' ability to inhibit the LPS-induced production of pro-inflammatory cytokines [32, 33]. All the TAS2R agonists that inhibited the production of TNF-α, CCL3 and CXCL8 also inhibited (to much the same degree) the LPS-induced production of IL-10. The compounds that did not inhibit the LPS-induced production of TNF-α, CCL3 and CXCL8 did not alter IL-10 production either (Figure 5). Budesonide (10^{-8} M) also markedly reduced IL-10 production (by 95%; Table 2).

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

Our present results demonstrated that (i) TAS2Rs are indeed expressed in human LMs, and (ii) TAS2R agonists inhibit LPS-induced cytokine release by LMs – a process that is not mediated by the release of IL-10.

Eleven TAS2Rs (TAS2Rs 4, 5, 13, 14, 19, 20, 31, 45, 46, and 50) were expressed in blood leukocytes from children, and some were upregulated in blood leukocytes from patients with severe, treatment-resistant asthma. Overall, TAS2R expression levels are higher in T lymphocytes than in monocytes in blood from adult patients with asthma [7]. The relatively weak expression of TAS2Rs in monocytes versus lymphocytes (i.e. B, T and natural killer cells) has been confirmed in healthy adults [6]. The most abundant TAS2R transcripts in human monocytes differed in the two previously mentioned literature studies. Overall, the greatest expression levels were seen for TAS2Rs 14, 31, 41, 43, 45 and 46. Our study is the first to have demonstrated the expression of sixteen different TAS2Rs in human LMs. The most abundant transcripts in unstimulated LMs were TAS2Rs 8, 14, 19, 39 and 46, and TAS2Rs 31, 38 and 45 after exposure to LPS – highlighting differences in expression patterns between human monocytes and LMs.

There are very few specific antagonists for use as chemical probes of TAS2R function. It has been reported that one antagonist (GIV3727) fully suppressed the activation of six TAS2Rs. GIV3727 resembles bitter agonists in that it acts on several receptors [34]. Some 6-methoxyflavanones have been described as reversible, insurmountable antagonists of TAS2R39 [35]. However, this TAS2R subtype is unlikely to be involved in inhibition of the LPS-induced production of cytokines by LMs. Given the current lack of appropriate specific TAS2R antagonists, we sought to infer the receptor subtypes involved in the inhibitory effect of the bitter taste compounds by cross-tabulation of the results for the effect of various

TAS2R agonists on LPS-induced cytokine production. In Meyerhof *et al.*'s extensive work on HEK cells expressing the different hTAS2Rs, the researchers described the molecular receptive ranges of the 25 human TAS2Rs vs. 104 natural or synthetic bitter compounds [31]. The "threshold concentrations" (defined as the minimum concentrations that elicit a response) and the potencies (EC_{50}) determined for some compounds using calcium imaging analysis of transfected HEK cells may not be transposable to the LMs. However, Meyerhof *et al.*'s pioneering work was the basis for our choice of the different TAS2R agonists used in the present study (Table 1). In the human LM model, our cross-tabulation of the TAS2R agonists' effects on LPS-induced cytokine release suggests that TAS2Rs 3, 4, 5, 9, 10, 14, 30, 39 and 40 (but not 20, 31, and 43) were involved.

One of the strengths of the present study is its use of a broad panel of TAS2R agonists. One of the limitation relates to potential non-TAS2R-mediated (off-target) activities of some of the agonists, which might have interfered with our analysis and interpretation of the results. For example, the lysosomotropic compound chloroquine inhibits lysosomal functions and also reportedly causes a concentration-dependent suppression of the LPS-induced release of TNF-α, IL-1β, and IL-6 in human monocytes and in monocyte/macrophage cell lines (U937, THP-1, and RAW 264.7) [15, 17]. The decrease in TNF-α release has been attributed to chloroquine's ability to block the conversion of pro-TNF-α to mature TNF-α, whereas the decrease in IL-1β and IL-6 release has been attributed to destabilization the corresponding mRNAs [15, 17]. Furthermore, chloroquine reportedly degrades *in vitro* cell viability at concentrations above 100 μM [15-17]. However, the inhibition of LPS-induced cytokine production was significant at 100 μM in the previous studies [15-17] and was substantially complete in the present study - thus ruling out a cytotoxic effect. Macrolides have much the same cationic and lysosomal properties as chloroquine. In the murine monocyte/macrophage cell line J774, four macrolide antibiotics (including erythromycin and azithromycin) reduced

the LPS-stimulated production of TNF-α, IL-1β, and IL-6 in a concentration-dependent manner (up to 80 μM) [14]. The impairment of lysosomal functions by azithromycin and chloroquine deregulates TLR4 recycling/signalling and phospholipase activation - leading to an anti-inflammatory phenotype in LPS-stimulated J774 cells [36, 37]. In human monocytes, azithromycin (50 μM) precisely mirrored the effects of chloroquine on LPS-induced cytokine production, with lower levels of some cytokines (CCL22 and CXCL11), higher levels of others (CCL2 and CCL18), and no changes in TNF-α and IL-6 levels [18]. The effects of azithromycin and chloroquine may not be entirely due to impairments in lysosomal functions or in signalling pathways related to NF-κB activation, cellular accumulation and phospholipid binding [18]. To the best of our knowledge, only one study has shown that certain macrolides (clarithromycin and azithromycin, but not erythromycin) can inhibit cytokine production by human alveolar macrophages; clarithromycin was more effective than azithromycin at ~10 μM [38]. In the present study, erythromycin suppressed LPS-induced cytokine production (TNF-α, CCL3, and CXCL8) at a ~10-fold higher concentration in LMs than in J774 cells. This effect is probably related (at least in part) to activation of TAS2R10 [31].

In monocytes and macrophages, cytoskeletal microtubules are involved in a number of cell activities, including cytokine production. Relative to microtubules in monocytes, alveolar macrophage microtubules are longer, more numerous and much more stable, and LPS increases the number and stability of monocyte microtubules still further [39]. These differences might explain why treatment with 25 μM colchicine (a microtubule-depolymerizing drug) gave a relative increase in LPS-induced IL-1β release and a relative decrease in LPS-induced TNF-α release by human monocytes but had much weaker effects on human alveolar macrophages [40]. In the present study, however, colchicine was associated with concentration-dependent inhibition of the production of TNF-α and CCL3;

this inhibition was relatively weak at 10 μM but significant at 100 μM. These concentrations suggest that colchicine's effect is exerted (at least in part) through TAS2R receptor activation.

In human blood monocytes, murine monocyte cell lines, and bone marrow-derived dendritic cells stimulated with LPS, chloroquine and azithromycin significantly enhance IL-10 release [18, 41, 42]. Since IL-10 has broad anti-inflammatory properties [32, 33], we assessed the effects of TAS2R agonists on the production of this cytokine by LMs. TAS2R agonists that inhibited the production of TNF-α, CCL3, and CXCL8 also inhibited IL-10 production to a similar extent. Budesonide also markedly reduced the IL-10 production. Hence, in contrast to the situation in monocytes, IL-10 is not involved in the TAS2R agonists' inhibitory effects in LMs.

Taken as a whole, these results suggest that a battery of selective TAS2R agonists and antagonists will be needed to confirm our findings and then to establish the full list of receptors involved in the inhibition of LPS-induced cytokine release. With respect to drug efficacy, some of the active TAS2R agonists (quinine, chloroquine, phenanthroline, and erythromycin) led to the essentially complete inhibition of LPS-induced cytokine production by LMs (to much the same extent as an optimal concentration of budesonide), which illustrates the potent anti-inflammatory activity of these compounds and the potential therapeutic value of inhaled TAS2R agonists in obstructive pulmonary diseases. Interestingly, it has been reported that chloroquine has beneficial effects in asthma [43]. Given the potential TAS2R-mediated effects observed here, it is time to review the actions of chloroquine and related compounds in airway diseases.

Another potential study limitation relates to our use of LMs harvested from lung tissues resected from current smokers or ex-smokers. Isolation from minced lung tissue provides the large number of cells required to perform paired series of experiments, such as those described here. This work would be hardly possible with macrophages obtained from

bronchoalveolar lavages. It should be noted that our preparations might contain a small proportion of interstitial resident macrophages among the alveolar macrophages. However, exposure to bacterial products (including LPS) and inhaled TAS2R agonists is not restricted to the alveolar compartment, and the use of freshly isolated human LMs mainly from the alveolar spaces but perhaps also from the lung tissue might usefully reflect the clinical response more closely.

About a quarter of the lung tissue donors studied here had COPD and almost all were smokers or ex-smokers. The impact of smoking status and COPD on LPS-induced cytokine release by LMs varies markedly from one study to another and from one cytokine to another. Some researchers have reported that LPS-stimulated cytokine production by alveolar macrophages was higher in COPD patients and smokers than in healthy non-smokers [44]. However, there were no significant differences in cytokine secretion between current smokers with COPD and non-smokers with COPD [44]. In contrast, other studies have found that smoking reduces cytokine production by alveolar macrophages upon stimulation with LPS [45] or that current smoking status had no effect (i.e. the dose–response curve for any of the cytokines stimulated by LPS was similar in current smokers and ex-smokers) [45-47]. Furthermore, the inhibitory effect of corticosteroids on the LPS-induced release of cytokines from LMs or alveolar macrophages isolated from bronchoalveolar lavages was similar (i) in non-smokers, current smokers and COPD patients and (ii) after a short (1 h) vs. long (16 h) plate adherence step in the isolation procedure [46, 48-50]. Hence, smoking status and COPD impair LPS-induced cytokine release to a variable extent but do not influence the inhibitory effect of corticosteroids on LMs. Therefore, the inhibitory effects of TAS2R agonists observed in the present study are probably not restricted to LMs from ex-smokers or current smokers, and are likely to accurately reflect the *in vivo* responsiveness of human LMs.

In conclusion, we evidenced TAS2R transcript expression in human LMs and identified the TAS2R subtypes that are most likely to be involved in the inhibition of LPS-induced cytokine production. Furthermore, the potential value of TAS2Rs as drug targets for the treatment of chronic obstructive lung diseases is enhanced by the ability of TAS2R agonists to relax airway smooth muscle [1, 2], even when β_2-adrenergic receptors (the current cornerstone target of bronchodilators) are subject to tachyphylaxis [51].

COMPETING INTERESTS

The authors declare that they have no competing interests.

AUTHOR'S CONTRIBUTIONS

SGD and HS conceived the study, performed experiments, analyzed the data, and critically revised the manuscript. NM helped to draft the manuscript and critically revised it. CA, MB and EN performed experiments and analyzed the data. CF and LJC analyzed the data and critically revised the manuscript. PD managed the study, analyzed the data, performed the statistical analysis, and drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

The research was funded by the French Ministry of Higher Education (*Chancellerie des Universités de Paris, Legs Gaston Poix*). The authors wish to thank David Fraser PhD for editorial assistance.

REFERENCES

1. Deshpande DA, Wang WC, McIlmoyle EL, Robinett KS, Schillinger RM, An SS, Sham JS, Liggett SB: **Bitter taste receptors on airway smooth muscle bronchodilate by localized calcium signaling and reverse obstruction.** *Nat Med* 2010, **16:**1299-1304.
2. Grassin-Delyle S, Abrial C, Fayad-Kobeissi S, Brollo M, Faisy C, Alvarez JC, Naline E, Devillier P: **The expression and relaxant effect of bitter taste receptors in human bronchi.** *Respir Res* 2013, **14:**134.
3. Jaggupilli A, Singh N, Upadhyaya J, Sikarwar AS, Arakawa M, Dakshinamurti S, Bhullar RP, Duan K, Chelikani P: **Analysis of the expression of human bitter taste receptors in extraoral tissues.** *Mol Cell Biochem* 2017, **426:**137-147.
4. Shah AS, Ben-Shahar Y, Moninger TO, Kline JN, Welsh MJ: **Motile cilia of human airway epithelia are chemosensory.** *Science* 2009, **325:**1131-1134.
5. Ekoff M, Choi JH, James A, Dahlen B, Nilsson G, Dahlen SE: **Bitter taste receptor (TAS2R) agonists inhibit IgE-dependent mast cell activation.** *J Allergy Clin Immunol* 2014, **134:**475-478.
6. Malki A, Fiedler J, Fricke K, Ballweg I, Pfaffl MW, Krautwurst D: **Class I odorant receptors, TAS1R and TAS2R taste receptors, are markers for subpopulations of circulating leukocytes.** *J Leukoc Biol* 2015, **97:**533-545.
7. Orsmark-Pietras C, James A, Konradsen JR, Nordlund B, Soderhall C, Pulkkinen V, Pedroletti C, Daham K, Kupczyk M, Dahlen B, et al: **Transcriptome analysis reveals upregulation of bitter taste receptors in severe asthmatics.** *Eur Respir J* 2013, **42:**65-78.
8. Lee RJ, Xiong G, Kofonow JM, Chen B, Lysenko A, Jiang P, Abraham V, Doghramji L, Adappa ND, Palmer JN, et al: **T2R38 taste receptor polymorphisms underlie susceptibility to upper respiratory infection.** *J Clin Invest* 2012, **122:**4145-4159.
9. Cohen NA: **The genetics of the bitter taste receptor T2R38 in upper airway innate immunity and implications for chronic rhinosinusitis.** *Laryngoscope* 2017, **127:**44-51.
10. Balhara J, Gounni AS: **The alveolar macrophages in asthma: a double-edged sword.** *Mucosal Immunol* 2012, **5:**605-609.

11. Barnes PJ: **Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease.** *J Allergy Clin Immunol* 2016, **138:**16-27.
12. 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:**557-569.
13. Ogino H, Fujii M, Ono M, Maezawa K, Hori S, Kizu J: **In vivo and in vitro effects of fluoroquinolones on lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory cytokine production.** *J Infect Chemother* 2009, **15:**168-173.
14. Ianaro A, Ialenti A, Maffia P, Sautebin L, Rombola L, Carnuccio R, Iuvone T, D'Acquisto F, Di Rosa M: **Anti-inflammatory activity of macrolide antibiotics.** *J Pharmacol Exp Ther* 2000, **292:**156-163.
15. Jang CH, Choi JH, Byun MS, Jue DM: **Chloroquine inhibits production of TNF-alpha, IL-1beta and IL-6 from lipopolysaccharide-stimulated human monocytes/macrophages by different modes.** *Rheumatology (Oxford)* 2006, **45:**703-710.
16. Jeong JY, Jue DM: **Chloroquine inhibits processing of tumor necrosis factor in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages.** *J Immunol* 1997, **158:**4901-4907.
17. Schierbeck H, Wahamaa H, Andersson U, Harris HE: **Immunomodulatory drugs regulate HMGB1 release from activated human monocytes.** *Mol Med* 2010, **16:**343-351.
18. Vrancic M, Banjanac M, Nujic K, Bosnar M, Murati T, Munic V, Stupin Polancec D, Belamaric D, Parnham MJ, Erakovic Haber V: **Azithromycin distinctively modulates classical activation of human monocytes in vitro.** *Br J Pharmacol* 2012, **165:**1348-1360.
19. Yasutomi M, Ohshima Y, Omata N, Yamada A, Iwasaki H, Urasaki Y, Mayumi M: **Erythromycin differentially inhibits lipopolysaccharide- or poly(I:C)-induced but not peptidoglycan-induced activation of human monocyte-derived dendritic cells.** *J Immunol* 2005, **175:**8069-8076.
20. Groot-Kormelink PJ, Fawcett L, Wright PD, Gosling M, Kent TC: **Quantitative GPCR and ion channel transcriptomics in primary alveolar macrophages and macrophage surrogates.** *BMC Immunol* 2012, **13:**57.
21. Jeyaseelan S, Manzer R, Young SK, Yamamoto M, Akira S, Mason RJ, Worthen GS: **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* 2005, **175:**7484-7495.

22. Jin M, Opalek JM, Marsh CB, Wu HM: **Proteome comparison of alveolar macrophages with monocytes reveals distinct protein characteristics.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004, **31:**322-329.
23. 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:**328-335.
24. Tomechko SE, Lundberg KC, Jarvela J, Bebek G, Chesnokov NG, Schlatzer D, Ewing RM, Boom WH, Chance MR, Silver RF: **Proteomic and bioinformatics profile of paired human alveolar macrophages and peripheral blood monocytes.** *Proteomics* 2015, **15:**3797-3805.
25. Abrial C, Grassin-Delyle S, Salvator H, Brollo M, Naline E, Devillier P: **15-Lipoxygenases regulate the production of chemokines in human lung macrophages.** *Br J Pharmacol* 2015, **172:**4319-4330.
26. 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.** *Br J Pharmacol* 2010, **159:**1304-1311.
27. 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.** *Br J Pharmacol* 2012, **165:**1877-1890.
28. Victoni T, Salvator H, Abrial C, Brollo M, Porto LCS, Lagente V, Naline E, Grassin-Delyle S, Devillier P: **Human lung and monocyte-derived macrophages differ with regard to the effects of beta2-adrenoceptor agonists on cytokine release.** *Respir Res* 2017, **18:**126.
29. 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:**2867-2883.
30. Di Pizio A, Niv MY: **Promiscuity and selectivity of bitter molecules and their receptors.** *Bioorg Med Chem* 2015.

31. Meyerhof W, Batram C, Kuhn C, Brockhoff A, Chudoba E, Bufe B, Appendino G, Behrens M: **The molecular receptive ranges of human TAS2R bitter taste receptors.** *Chem Senses* 2010, **35:**157-170.
32. Armstrong L, Jordan N, Millar A: **Interleukin 10 (IL-10) regulation of tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) from human alveolar macrophages and peripheral blood monocytes.** *Thorax* 1996, **51:**143-149.
33. Berkman N, John M, Roesems G, Jose PJ, Barnes PJ, Chung KF: **Inhibition of macrophage inflammatory protein-1 alpha expression by IL-10. Differential sensitivities in human blood monocytes and alveolar macrophages.** *J Immunol* 1995, **155:**4412-4418.
34. Behrens M, Meyerhof W: **Bitter taste receptor research comes of age: from characterization to modulation of TAS2Rs.** *Semin Cell Dev Biol* 2013, **24:**215-221.
35. Roland WS, Gouka RJ, Gruppen H, Driesse M, van Buren L, Smit G, Vincken JP: **6-methoxyflavanones as bitter taste receptor blockers for hTAS2R39.** *PLoS One* 2014, **9:**e94451.
36. Munic V, Banjanac M, Kostrun S, Nujic K, Bosnar M, Marjanovic N, Ralic J, Matijasic M, Hlevnjak M, Erakovic Haber V: **Intensity of macrolide anti-inflammatory activity in J774A.1 cells positively correlates with cellular accumulation and phospholipidosis.** *Pharmacol Res* 2011, **64:**298-307.
37. Nujic K, Banjanac M, Munic V, Polancec D, Erakovic Haber V: **Impairment of lysosomal functions by azithromycin and chloroquine contributes to anti-inflammatory phenotype.** *Cell Immunol* 2012, **279:**78-86.
38. Cai M, Bonella F, Dai H, Sarria R, Guzman J, Costabel U: **Macrolides inhibit cytokine production by alveolar macrophages in bronchiolitis obliterans organizing pneumonia.** *Immunobiology* 2013, **218:**930-937.
39. Allen JN, Moore SA, Liao Z, Wewers MD: **Changes in mononuclear phagocyte microtubules after endotoxin stimulation. I. Changes in microtubule stability.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997, **16:**119-126.
40. Allen JN, Herzyk DJ, Wewers MD: **Colchicine has opposite effects on interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha production.** *Am J Physiol* 1991, **261:**L315-321.
41. Murphy BS, Sundareshan V, Cory TJ, Hayes D, Jr., Anstead MI, Feola DJ: **Azithromycin alters macrophage phenotype.** *J Antimicrob Chemother* 2008, **61:**554-560.

42. Sugiyama K, Shirai R, Mukae H, Ishimoto H, Nagata T, Sakamoto N, Ishii H, Nakayama S, Yanagihara K, Mizuta Y, Kohno S: **Differing effects of clarithromycin and azithromycin on cytokine production by murine dendritic cells.** *Clin Exp Immunol* 2007, **147:**540-546.
43. Charous BL, Halpern EF, Steven GC: **Hydroxychloroquine improves airflow and lowers circulating IgE levels in subjects with moderate symptomatic asthma.** *J Allergy Clin Immunol* 1998, **102:**198-203.
44. Hodge S, Matthews G, Mukaro V, Ahern J, Shivam A, Hodge G, Holmes M, Jersmann H, Reynolds PN: **Cigarette smoke-induced changes to alveolar macrophage phenotype and function are improved by treatment with procysteine.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011, **44:**673-681.
45. Chen H, Cowan MJ, Hasday JD, Vogel SN, Medvedev AE: **Tobacco smoking inhibits expression of proinflammatory cytokines and activation of IL-1R-associated kinase, p38, and NF-kappaB in alveolar macrophages stimulated with TLR2 and TLR4 agonists.** *J Immunol* 2007, **179:**6097-6106.
46. Armstrong J, Harbron C, Lea S, Booth G, Cadden P, Wreggett KA, Singh D: **Synergistic effects of p38 mitogen-activated protein kinase inhibition with a corticosteroid in alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease.** *J Pharmacol Exp Ther* 2011, **338:**732-740.
47. Armstrong J, Sargent C, Singh D: **Glucocorticoid sensitivity of lipopolysaccharide-stimulated chronic obstructive pulmonary disease alveolar macrophages.** *Clin Exp Immunol* 2009, **158:**74-83.
48. Higham A, Booth G, Lea S, Southworth T, Plumb J, Singh D: **The effects of corticosteroids on COPD lung macrophages: a pooled analysis.** *Respir Res* 2015, **16:**98.
49. Higham A, Lea S, Ray D, Singh D: **Corticosteroid effects on COPD alveolar macrophages: dependency on cell culture methodology.** *J Immunol Methods* 2014, **405:**144-153.
50. Plumb J, Robinson L, Lea S, Banyard A, Blaikley J, Ray D, Bizzi A, Volpi G, Facchinetti F, Singh D: **Evaluation of glucocorticoid receptor function in COPD lung macrophages using beclomethasone-17-monopropionate.** *PLoS One* 2013, **8:**e64257.
51. An SS, Wang WC, Koziol-White CJ, Ahn K, Lee DY, Kurten RC, Panettieri RA, Jr., Liggett SB: **TAS2R activation promotes airway smooth muscle relaxation despite**

beta(2)-adrenergic receptor tachyphylaxis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012, **303:**L304-311.

52. Alexander SPH, Mathie A, Peters JA: **G Protein-Coupled Receptors.** *Br J Pharmacol* 2011, **164:**5-113.
53. Andres-Barquin PJ, Conte C: **Molecular basis of bitter taste: the T2R family of G protein-coupled receptors.** *Cell Biochem Biophys* 2004, **41:**99-112.
54. Dotson CD, Zhang L, Xu H, Shin YK, Vigues S, Ott SH, Elson AE, Choi HJ, Shaw H, Egan JM, et al: **Bitter taste receptors influence glucose homeostasis.** *PLoS One* 2008, **3:**e3974.
55. Sainz E, Cavenagh MM, Gutierrez J, Battey JF, Northup JK, Sullivan SL: **Functional characterization of human bitter taste receptors.** *Biochem J* 2007, **403:**537-543.
56. Soares S, Kohl S, Thalmann S, Mateus N, Meyerhof W, De Freitas V: **Different phenolic compounds activate distinct human bitter taste receptors.** *J Agric Food Chem* 2013, **61:**1525-1533.

1.

hTAS2R	1	3	4	5	7	8	9	10	13	14	16	19	20	30	31	38	39	40	41	42	43	45	46	50	60
Promiscuous agonists:																									
Diphenidol	100		100		10			30	30	10	100		100	100	3	100	100	30			30		30		
Quinine			10		10			10		10					10		10	10			10		10		
Denatonium			300			1000		3 and 120±56	30					0.03 and 0.27±0.06			100				300		30 and 240±192		
Partly selective agonists:																									
Colchicine			100 and 1025±1219														3000						300 1580±170		
Chloroquine		10 and 172±29			+			10000									100								
Dapsone			100					100										30							
Strychnine					+			3 and 21.8±7.5															0.1 and 0.43±0.02		
Saccharin						+									170±10 and 1700±20						80±60 and 1100±10				
Sodium cromoglycate					3000 and 4500±1600								10 and 45±25								3000				
Selective agonists:																									
Ofloxacin							EC_{50} ≈200																		
Phenanthroline				100																					
Erythromycin								300																	
Carisoprodol										100															

Table 1. Compounds selected for functional studies with regard to their ability to act as agonists (or not) of the 25 TAS2R receptors identified in humans to date. The most recent nomenclature was adopted [31, 52-56]. Unless otherwise stated, single values (i.e. lacking ± SEM) represent the threshold concentration (i.e. the lowest concentration (μM) to have elicited a calcium response in transfected HEK-293T cells), whereas values presented as the mean ± SEM represent the EC_{50} (μM) [31]. When both a threshold concentration and the EC_{50} were available, both values were reported (in that order). When no quantitative indicators were available, the symbol "+" indicates agonism. The TAS2R numbers in bold type and those underlined correspond to the TAS2Rs found to be expressed in human LMs. The TAS2R numbers in italics correspond those not expressed in human LMs. The TAS2R numbers in standard type correspond to the receptors not assessed in RT-qPCR assays.

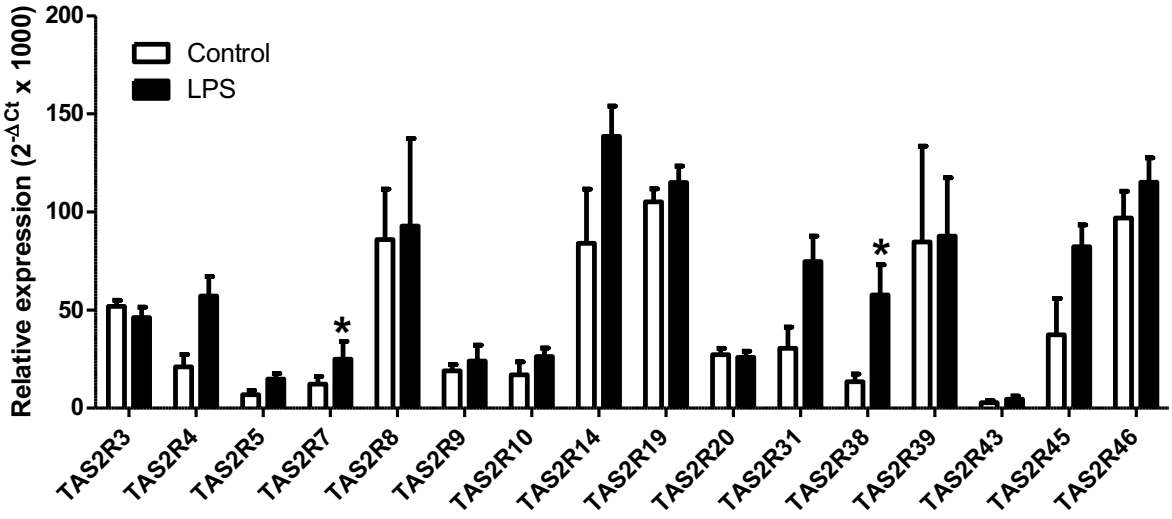
Table 2: Inhibitory effect of budesonide on the LPS-induced production of cytokines

Cytokine (ng/10^6 LMs)	*LPS*	*LPS + Bud 10 nM*	*Inhibition (%)*
TNF-α n=5	64.8 ± 9.4	8.2 ± 2.3 **	88.2 ± 3.0
CCL3 n=5	277.3 ± 29.1	22.1 ± 5.9 ***	92.2 ± 2.1
CXCL8 n=5	1851.7± 209.2	78.3 ± 13.1 ***	95.8 ± 1.2
IL-10 n=5	3.2 ± 2.0	0.16 ± 0.06 ***	95.2 ± 1.0

Human LMs were incubated for 1 hr in the presence of budesonide (10 nM) or vehicle before being stimulated with LPS (10 ng.mL^{-1}) for 24 hrs. The concentrations of the cytokines in the culture supernatant were measured using ELISAs. The data are reported as the mean ± SEM of five independent paired experiments. * indicates a significant difference relative to LPS alone (**$p < 0.01$;***$p < 0.001$).

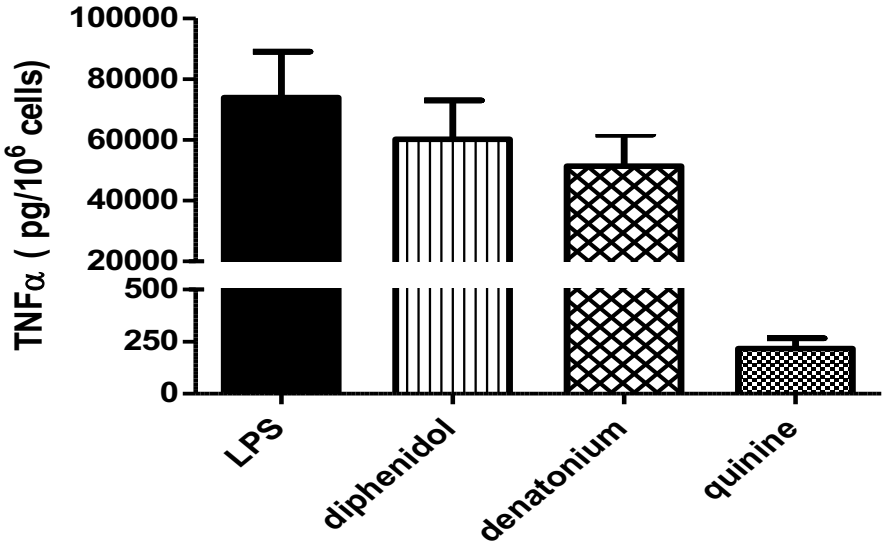
FIGURES

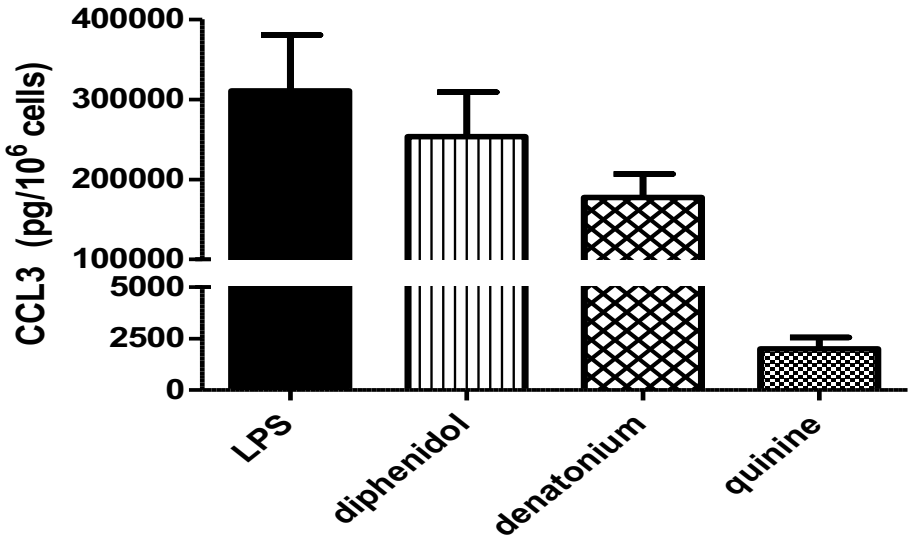
Figure 1. Relative expression ($2^{-\Delta Ct}$ x 1000) of *TAS2R3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 14, 19, 20, 31, 38, 39, 43, 45* and *46* gene transcripts in human LMs (*n*=6-12). All transcripts were found to be expressed in all patients, with the exception of *TAS2R43* (found in LMs from 4 out of 6 patients only).



*
*

Figure 2. Inhibitory effects of the three promiscuous TAS2R agonists on the LPS-induced production of pro-inflammatory cytokines (TNF-α, CCL3, and CXCL8). Lung macrophages from 6 to 7 patients were stimulated with LPS (10 ng.mL^{-1}) in the absence or presence of the TAS2R agonists. *: p <0.05, **: p<0.01 compared with LPS alone.





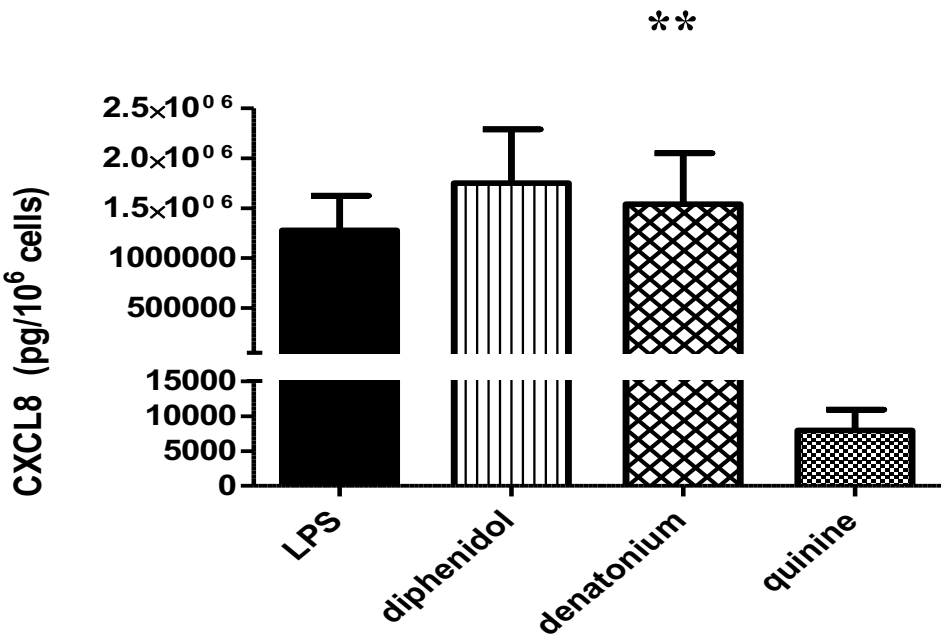

**
CXCL8 (pg/10^6 cells)
2.5×10^0 6
2.0×10^0 6
1.5×10^0 6
1000000
500000
15000
10000
5000
0
LPS
diphenidol
denatonium
quinine

Figure 3. Concentration-response curves for relatively selective TAS2R agonists (colchicine, chloroquine, strychnine, and dapsone) with regard to the LPS-induced production of pro-inflammatory cytokines (TNF-α (●) CCL3 (■), and CXCL8 (▲)). Lung macrophages from 5 to 9 patients were stimulated with LPS (10 ng.mL^{-1}) in the absence or presence of TAS2R agonists. *: p <0.05, **: p<0.01 compared with LPS alone.

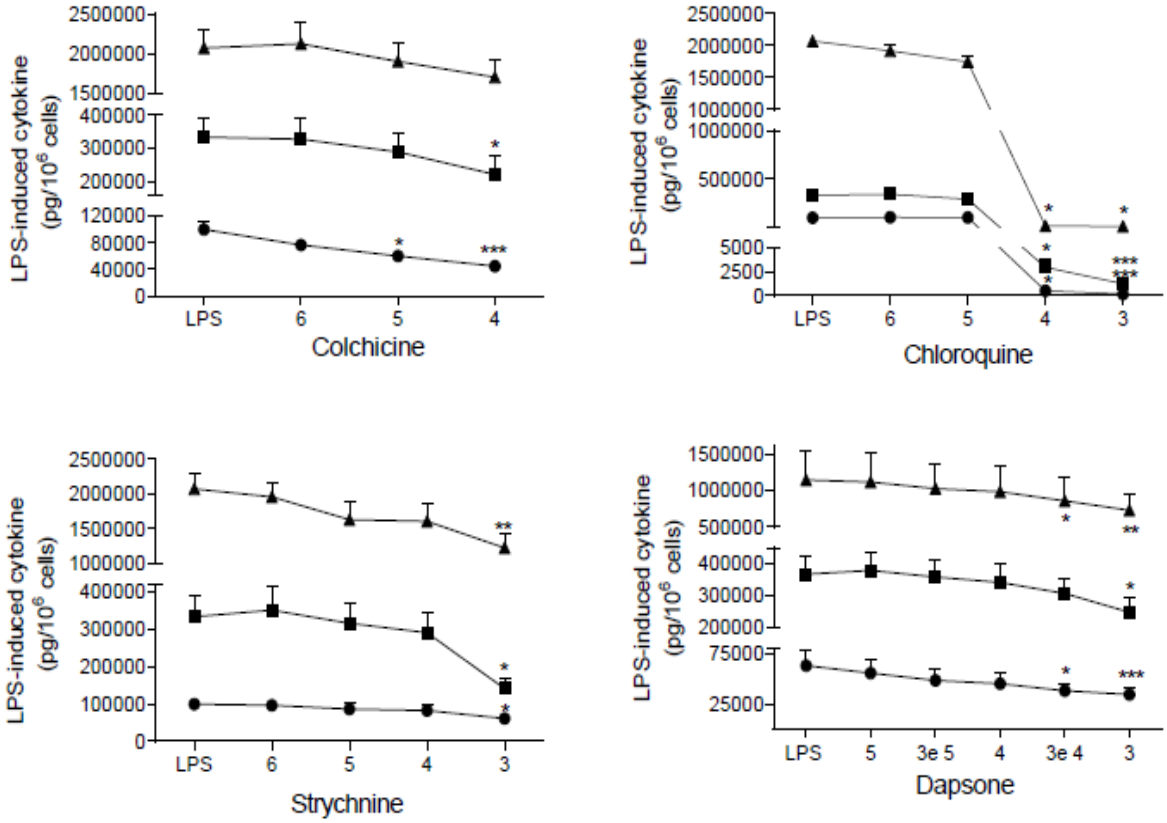


Figure 4. Concentration-response curves of selective TAS2R agonists (erythromycin (TAS2R10), phenanthroline (TAS2R5), ofloxacin (TAS2R9), and carisoprodol (TAS2R14)) on the LPS-induced production of pro-inflammatory cytokines (TNF-α (●) CCL3 (■), and CXCL8 (▲)). Lung macrophages from 5 to 8 patients were stimulated with LPS (10 ng.mL-1), in the absence or presence of TAS2R agonists. *: p <0.05, **: p<0.01 compared with LPS alone.

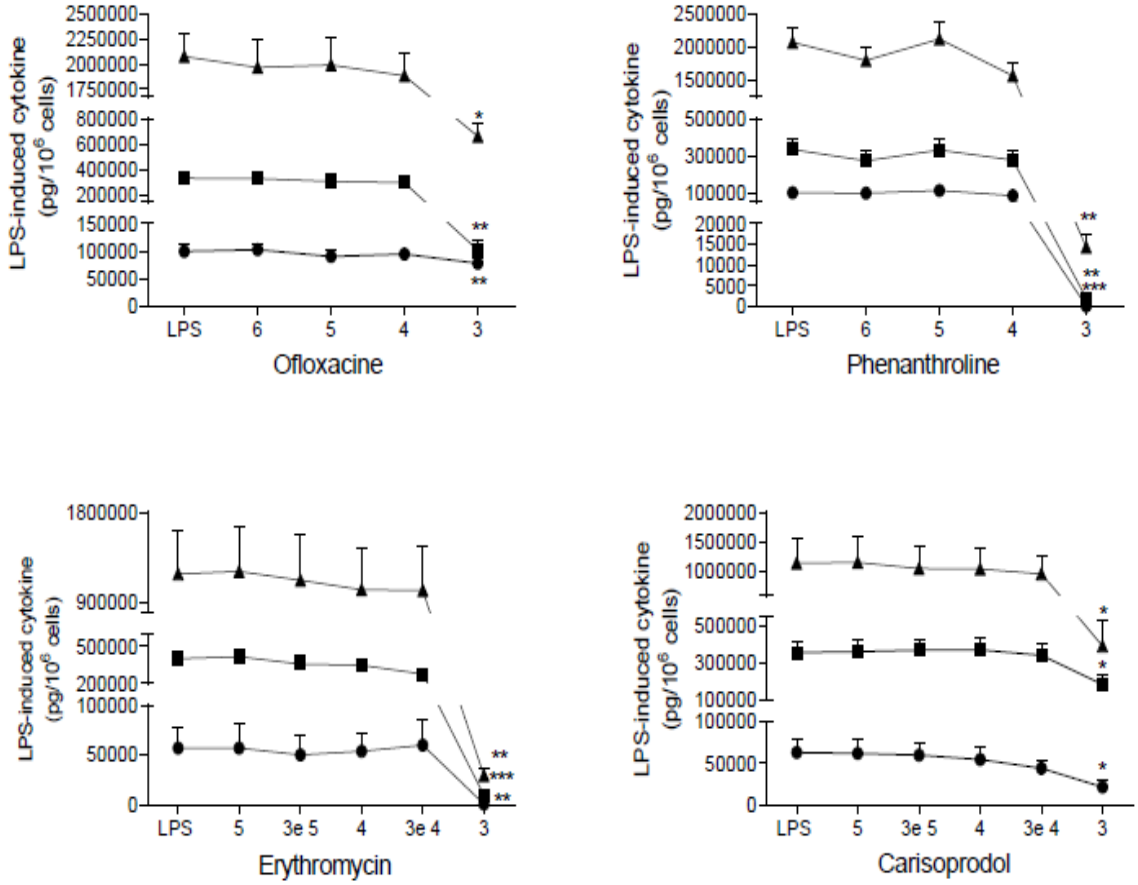
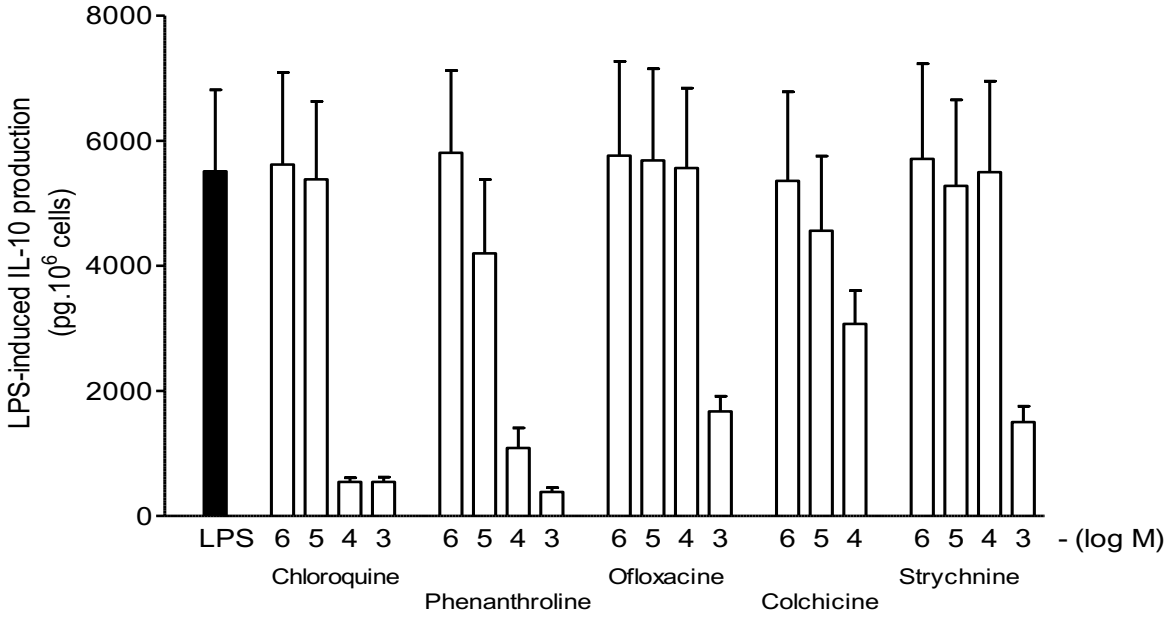
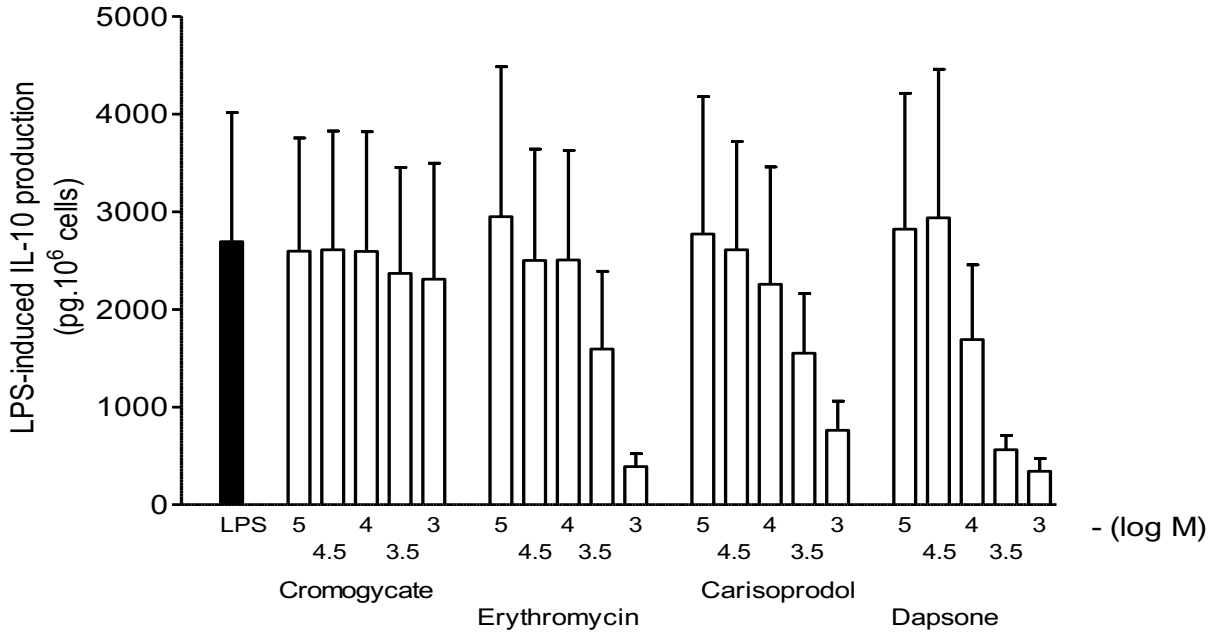
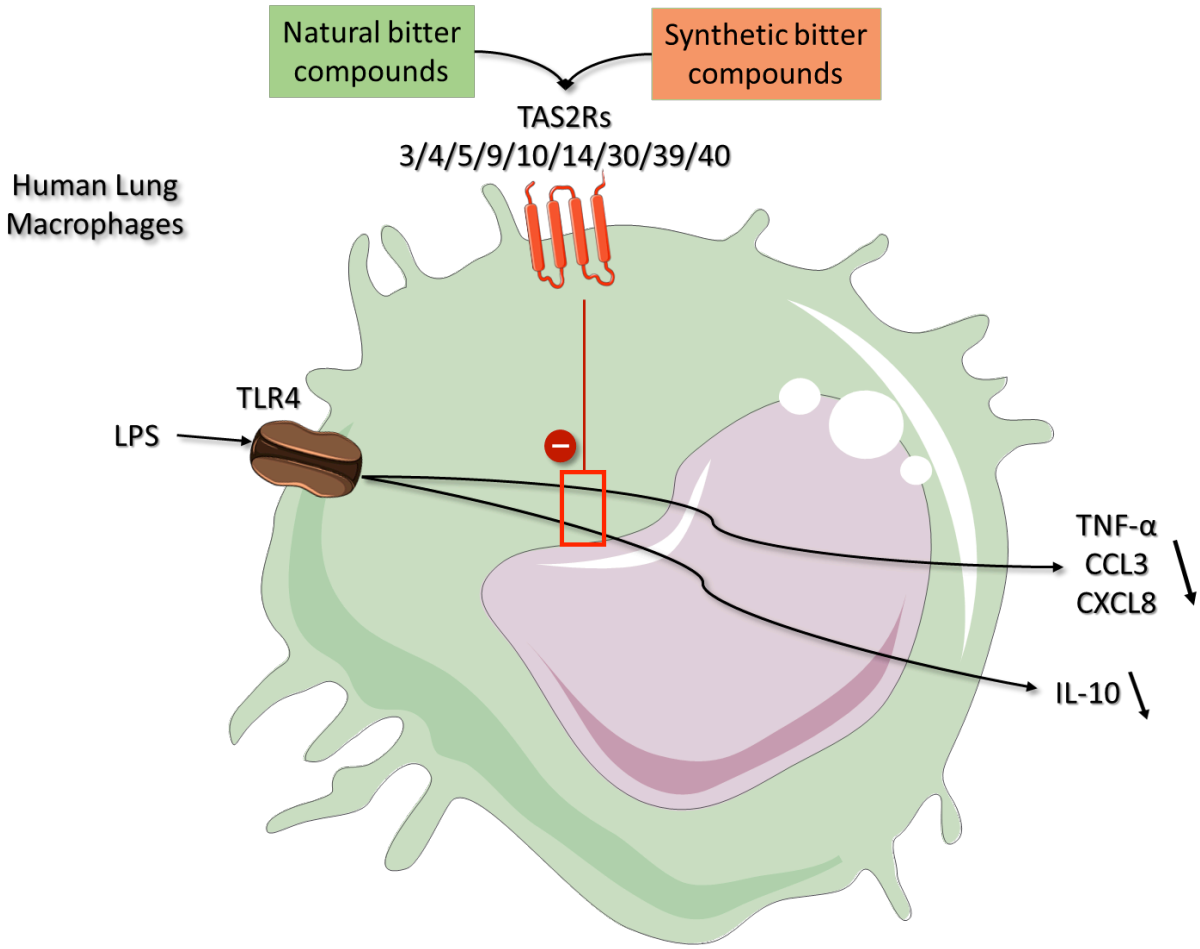


Figure 5. Concentration-response of selective TAS2R agonists on the LPS-induced production of IL-10. Lung macrophages from 4 patients were stimulated with LPS (10 ng.mL-1) in the absence or presence of TAS2R agonists.







Graphical abstract

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. OMS | 10 faits sur l'obésité [Internet]. WHO. Disponible sur: http://www.who.int/features/factfiles/obesity/fr/

2. Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. Lancet Lond Engl. 2014;384(9945):766‑81.

3. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128·9 million children, adolescents, and adults. Lancet Lond Engl. 2017;390(10113):2627‑42.

4. Ogden CL, Carroll MD, Kit BK, Flegal KM. Prevalence of childhood and adult obesity in the United States, 2011-2012. JAMA. 2014;311(8):806‑14.

5. obepi_2012.pdf [Internet]. Disponible sur: http://www.roche.fr/content/dam/roche_france/fr_FR/doc/obepi_2012.pdf

6. 9242592226_fre.pdf [Internet]. Disponible sur: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43036/9242592226_fre.pdf

7. Promouvoir une alimentation saine et l'activité physique: une dimension européenne pour la prévention des surcharges pondérales, de l'obésité et des maladies chroniques. Disponible sur http://ec.europa.eu/health/ph_determinants/life_style/nutrition/green_paper/nutritiongp_co123_en.pdf

8. Emery C, Dinet J, Lafuma A, Sermet C, Khoshnood B, Fagnani F. [Cost of obesity in France]. Presse Medicale Paris Fr 1983. 2007;36(6 Pt 1):832‑40.

9. i1131.pdf [Internet]. Disponible sur: http://www.assemblee-nationale.fr/13/pdf/rap-info/i1131.pdf

10. Plan_Obesite_2010_2013.pdf [Internet]. Disponible sur: https://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/Plan_Obesite_2010_2013.pdf

11. Arrêté du 18 janvier 2017 relatif à l'interdiction de la mise à disposition de boissons à volonté, gratuites ou pour un prix forfaitaire, avec ajout de sucres ou d'édulcorants de synthèse. Disponible sur https://www.legifrance.gouv.fr/eli/arrete/2017/1/18/AFSP1631228A/jo

12. Zheng Y, Manson JE, Yuan C, Liang MH, Grodstein F, Stampfer MJ, et al. Associations of Weight Gain From Early to Middle Adulthood With Major Health Outcomes Later in Life. JAMA. 2017;318(3):255‑69.

13. Hillier TA, Pedula KL. Characteristics of an adult population with newly diagnosed type 2 diabetes: the relation of obesity and age of onset. Diabetes Care. 2001;24(9):1522‑7.

14. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Bautista L, Franzosi MG, Commerford P, et al. Obesity and the risk of myocardial infarction in 27,000 participants from 52 countries: a case-control study. Lancet Lond Engl. 2005;366(9497):1640‑9.

15. Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Castiglione A, Crocè LS, Tiribelli C, et al. Incidence and natural course of fatty liver in the general population: the Dionysos study. Hepatol Baltim Md. 2007;46(5):1387‑91.

16. Bellentani S. The epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. Liver Int Off J Int Assoc Study Liver. 2017;37 Suppl 1:81‑4.

17. Kanda T, Matsuoka S, Yamazaki M, Shibata T, Nirei K, Takahashi H, et al. Apoptosis and non-alcoholic fatty liver diseases. World J Gastroenterol. 2018;24(25):2661‑72.

18. Piché M-E, Poirier P, Lemieux I, Després J-P. Overview of Epidemiology and Contribution of Obesity and Body Fat Distribution to Cardiovascular Disease: An Update. Prog Cardiovasc Dis [Internet]. Disponible sur: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0033062018301221

19. Liu J, Fox CS, Hickson DA, May WD, Hairston KG, Carr JJ, et al. Impact of abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue on cardiometabolic risk factors: the Jackson Heart Study. J Clin Endocrinol Metab. 2010;95(12):5419‑26.

20. Kwok CS, Pradhan A, Khan MA, Anderson SG, Keavney BD, Myint PK, et al. Bariatric surgery and its impact on cardiovascular disease and mortality: a systematic review and meta-analysis. Int J Cardiol. 2014;173(1):20‑8.

21. Wilson PWF, D'Agostino RB, Sullivan L, Parise H, Kannel WB. Overweight and obesity as determinants of cardiovascular risk: the Framingham experience. Arch Intern Med. 2002;162(16):1867‑72.

22. Manson JE, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, Rosner B, Monson RR, et al. A prospective study of obesity and risk of coronary heart disease in women. N Engl J Med. 1990;322(13):882‑9.

23. Rabkin SW, Mathewson FA, Hsu PH. Relation of body weight to development of ischemic heart disease in a cohort of young North American men after a 26 year observation period: the Manitoba Study. Am J Cardiol. 1977;39(3):452‑8.

24. Kortelainen ML, Särkioja T. Visceral fat and coronary pathology in male adolescents. Int J Obes Relat Metab Disord J Int Assoc Study Obes. 2001;25(2):228‑32.

25. McGill HC, McMahan CA, Herderick EE, Zieske AW, Malcom GT, Tracy RE, et al. Obesity accelerates the progression of coronary atherosclerosis in young men. Circulation. 2002;105(23):2712‑8.

26. He J, Ogden LG, Bazzano LA, Vupputuri S, Loria C, Whelton PK. Risk factors for congestive heart failure in US men and women: NHANES I epidemiologic follow-up study. Arch Intern Med. 2001;161(7):996‑1002.

27. Kenchaiah S, Evans JC, Levy D, Wilson PWF, Benjamin EJ, Larson MG, et al. Obesity and the risk of heart failure. N Engl J Med. 2002;347(5):305‑13.

28. Zhang J, Begley A, Jackson R, Harrison M, Pellicori P, Clark AL, et al. Body mass index and all-cause mortality in heart failure patients with normal and reduced ventricular ejection fraction: a dose-response meta-analysis. Clin Res Cardiol 2018. doi: 10.1007/s00392-018-1302-7. [Epub ahead of print]

29. Sin DD, Jones RL, Man SFP. Obesity is a risk factor for dyspnea but not for airflow obstruction. Arch Intern Med. 2002;162(13):1477‑81.

30. Sahebjami H. Dyspnea in obese healthy men. Chest. nov 1998;114(5):1373‑7.

31. Biring MS, Lewis MI, Liu JT, Mohsenifar Z. Pulmonary physiologic changes of morbid obesity. Am J Med Sci. 1999;318(5):293‑7.

32. Babb TG. Mechanical ventilatory constraints in aging, lung disease, and obesity: perspectives and brief review. Med Sci Sports Exerc. janv 1999;31(1 Suppl):S12-22.

33. DeLorey DS, Wyrick BL, Babb TG. Mild-to-moderate obesity: implications for respiratory mechanics at rest and during exercise in young men. Int J Obes 2005. 2005;29(9):1039‑47.

34. Babb TG, Ranasinghe KG, Comeau LA, Semon TL, Schwartz B. Dyspnea on exertion in obese women: association with an increased oxygen cost of breathing. Am J Respir Crit Care Med. 2008;178(2):116‑23.

35. Sutherland ER. Linking obesity and asthma. Ann N Y Acad Sci. 2014;1311:31‑41.

36. Peters U, Dixon AE, Forno E. Obesity and asthma. J Allergy Clin Immunol. 2018;141(4):1169‑79.

37. Beuther DA, Sutherland ER. Overweight, obesity, and incident asthma: a meta-analysis of prospective epidemiologic studies. Am J Respir Crit Care Med. 2007;175(7):661‑6.

38. Huovinen E, Kaprio J, Koskenvuo M. Factors associated to lifestyle and risk of adult onset asthma. Respir Med. 2003;97(3):273‑80.

39. Brumpton B, Langhammer A, Romundstad P, Chen Y, Mai X-M. General and abdominal obesity and incident asthma in adults: the HUNT study. Eur Respir J. 2013;41(2):323‑9.

40. Taylor B, Mannino D, Brown C, Crocker D, Twum-Baah N, Holguin F. Body mass index and asthma severity in the National Asthma Survey. Thorax. 2008;63(1):14‑20.

41. Peters JI, McKinney JM, Smith B, Wood P, Forkner E, Galbreath AD. Impact of obesity in asthma: evidence from a large prospective disease management study. Ann Allergy Asthma Immunol Off Publ Am Coll Allergy Asthma Immunol. 2011;106(1):30‑5.

42. Haldar P, Pavord ID, Shaw DE, Berry MA, Thomas M, Brightling CE, et al. Cluster analysis and clinical asthma phenotypes. Am J Respir Crit Care Med. 2008;178(3):218‑24.

43. Moore WC, Meyers DA, Wenzel SE, Teague WG, Li H, Li X, et al. Identification of asthma phenotypes using cluster analysis in the Severe Asthma Research Program. Am J Respir Crit Care Med. 2010;181(4):315‑23.

44. Sukhan VS. Cluster analysis of the phenotype of asthma and obesity. Wiadomosci Lek Wars Pol 1960. 2018;71(2 pt 1):319‑21.

45. Guerra S, Sherrill DL, Bobadilla A, Martinez FD, Barbee RA. The relation of body mass index to asthma, chronic bronchitis, and emphysema. Chest. 2002;122(4):1256‑63.

46. Steuten LMG, Creutzberg EC, Vrijhoef HJM, Wouters EF. COPD as a multicomponent disease: inventory of dyspnoea, underweight, obesity and fat free mass depletion in primary care. Prim Care Respir J J Gen Pract Airw Group. 2006;15(2):84‑91.

47. Cao C, Wang R, Wang J, Bunjhoo H, Xu Y, Xiong W. Body mass index and mortality in chronic obstructive pulmonary disease: a meta-analysis. PloS One. 2012;7(8):e43892.

48. Franssen FME, O'Donnell DE, Goossens GH, Blaak EE, Schols AMWJ. Obesity and the lung: 5. Obesity and COPD. Thorax. 2008;63(12):1110‑7.

49. Crummy F, Piper AJ, Naughton MT. Obesity and the lung: 2. Obesity and sleep-disordered breathing. Thorax. 2008;63(8):738‑46.

50. Peppard PE, Young T, Palta M, Dempsey J, Skatrud J. Longitudinal study of moderate weight change and sleep-disordered breathing. JAMA. 2000;284(23):3015‑21.

51. Laaban J-P, Chailleux E. Daytime hypercapnia in adult patients with obstructive sleep apnea syndrome in France, before initiating nocturnal nasal continuous positive airway pressure therapy. Chest. 2005;127(3):710‑5.

52. Nowbar S, Burkart KM, Gonzales R, Fedorowicz A, Gozansky WS, Gaudio JC, et al. Obesity-associated hypoventilation in hospitalized patients: prevalence, effects, and outcome. Am J Med. 2004;116(1):1‑7.

53. Huttunen R, Syrjänen J. Obesity and the risk and outcome of infection. Int J Obes 2013;37(3):333‑40.

54. Baik I, Curhan GC, Rimm EB, Bendich A, Willett WC, Fawzi WW. A prospective study of age and lifestyle factors in relation to community-acquired pneumonia in US men and women. Arch Intern Med. 2000;160(20):3082‑8.

55. Jedrychowski W, Maugeri U, Flak E, Mroz E, Bianchi I. Cohort study on low physical activity level and recurrent acute respiratory infections in schoolchildren. Cent Eur J Public Health. 2001;9(3):126‑9.

56. Fezeu L, Julia C, Henegar A, Bitu J, Hu FB, Grobbee DE, et al. Obesity is associated with higher risk of intensive care unit admission and death in influenza A (H1N1) patients: a systematic review and meta-analysis. Obes Rev Off J Int Assoc Study Obes. 2011;12(8):653‑9.

57. Domínguez-Cherit G, Lapinsky SE, Macias AE, Pinto R, Espinosa-Perez L, de la Torre A, et al. Critically Ill patients with 2009 influenza A(H1N1) in Mexico. JAMA. 2009;302(17):1880‑7.

58. Lee EH, Wu C, Lee EU, Stoute A, Hanson H, Cook HA, et al. Fatalities associated with the 2009 H1N1 influenza A virus in New York city. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2010;50(11):1498‑504.

59. van ’t Klooster TM, Wielders CC, Donker T, Isken L, Meijer A, van den Wijngaard CC, et al. Surveillance of hospitalisations for 2009 pandemic influenza A(H1N1) in the Netherlands, 5 June - 31 December 2009. Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull. 2010;15(2).

60. Fuhrman C, Bonmarin I, Paty AC, Duport N, Chiron E, Lucas E, et al. Severe hospitalised 2009 pandemic influenza A(H1N1) cases in France, 1 July-15 November 2009. Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull. 2010;15(2).

61. hcspa20120216_grippesaisonfemencobes.pdf [Internet]. [cité 24 juill 2018]. Disponible sur: https://www.hcsp.fr/docspdf/avisrapports/hcspa20120216_grippesaisonfemencobes.pdf

62. Fang X, Wei J, He X, Lian J, Han D, An P, et al. Quantitative association between body mass index and the risk of cancer: A global Meta-analysis of prospective cohort studies. Int J Cancer. 2018; doi: 10.1002/ijc.31553. [Epub ahead of print]

63. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. N Engl J Med. 2003;348(17):1625‑38.

64. Sjöström L, Narbro K, Sjöström CD, Karason K, Larsson B, Wedel H, et al. Effects of bariatric surgery on mortality in Swedish obese subjects. N Engl J Med. 2007;357(8):741‑52.

65. Berger NA. Obesity and cancer pathogenesis. Ann N Y Acad Sci. 2014;1311:57‑76.

66. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. Nat Rev Immunol. 2011;11(2):85‑97.

67. Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, et al. Dynamics of fat cell turnover in humans. Nature. 2008;453(7196):783‑7.

68. Gavin KM, Gutman JA, Kohrt WM, Wei Q, Shea KL, Miller HL, et al. De novo generation of adipocytes from circulating progenitor cells in mouse and human adipose tissue. FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol. 2016;30(3):1096‑108.

69. Rodeheffer MS, Birsoy K, Friedman JM. Identification of white adipocyte progenitor cells in vivo. Cell. 17 2008;135(2):240‑9.

70. Kras KM, Hausman DB, Hausman GJ, Martin RJ. Adipocyte development is dependent upon stem cell recruitment and proliferation of preadipocytes. Obes Res. 1999;7(5):491‑7.

71. Rosen ED, MacDougald OA. Adipocyte differentiation from the inside out. Nat Rev Mol Cell Biol. 2006;7(12):885‑96.

72. Lefterova MI, Haakonsson AK, Lazar MA, Mandrup S. PPARγ and the global map of adipogenesis and beyond. Trends Endocrinol Metab TEM. 2014;25(6):293‑302.

73. Gray SL, Dalla Nora E, Vidal-Puig AJ. Mouse models of PPAR-gamma deficiency: dissecting PPAR-gamma's role in metabolic homoeostasis. Biochem Soc Trans. 2005;33(Pt 5):1053‑8.

74. Hegele RA, Cao H, Frankowski C, Mathews ST, Leff T. PPARG F388L, a transactivation-deficient mutant, in familial partial lipodystrophy. Diabetes. 2002;51(12):3586‑90.

75. Rosen ED, Hsu C-H, Wang X, Sakai S, Freeman MW, Gonzalez FJ, et al. C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. Genes Dev. 2002;16(1):22‑6.

76. Trayhurn P, Wang B, Wood IS. Hypoxia in adipose tissue: a basis for the dysregulation of tissue function in obesity? Br J Nutr. 2008;100(2):227‑35.

77. Pasarica M, Sereda OR, Redman LM, Albarado DC, Hymel DT, Roan LE, et al. Reduced adipose tissue oxygenation in human obesity: evidence for rarefaction, macrophage chemotaxis, and inflammation without an angiogenic response. Diabetes. 2009;58(3):718‑25.

78. Ye J, Gao Z, Yin J, He Q. Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2007;293(4):E1118-1128.

79. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. J Clin Invest. 2003;112(12):1796‑808.

80. Curat CA, Wegner V, Sengenès C, Miranville A, Tonus C, Busse R, et al. Macrophages in human visceral adipose tissue: increased accumulation in obesity and a source of resistin and visfatin. Diabetologia. 2006;49(4):744‑7.

81. Cancello R, Henegar C, Viguerie N, Taleb S, Poitou C, Rouault C, et al. Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. Diabetes. 2005;54(8):2277‑86.

82. Boulenouar S, Michelet X, Duquette D, Alvarez D, Hogan AE, Dold C, et al. Adipose Type One Innate Lymphoid Cells Regulate Macrophage Homeostasis through Targeted Cytotoxicity. Immunity. 2017;46(2):273‑86.

83. Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. J Lipid Res. 2005;46(11):2347‑55.

84. Kim C-S, Park H-S, Kawada T, Kim J-H, Lim D, Hubbard NE, et al. Circulating levels of MCP-1 and IL-8 are elevated in human obese subjects and associated with obesity-related parameters. Int J Obes 2005. 2006;30(9):1347‑55.

85. Kahn SE, Zinman B, Haffner SM, O'Neill MC, Kravitz BG, Yu D, et al. Obesity is a major determinant of the association of C-reactive protein levels and the metabolic syndrome in type 2 diabetes. Diabetes. 2006;55(8):2357‑64.

86. Herder C, Haastert B, Müller-Scholze S, Koenig W, Thorand B, Holle R, et al. Association of systemic chemokine concentrations with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes: results from the Cooperative Health Research in the Region of Augsburg Survey S4 (KORA S4). Diabetes. 2005;54 Suppl 2:S11-17.

87. Matsuzawa Y. Therapy Insight: adipocytokines in metabolic syndrome and related cardiovascular disease. Nat Clin Pract Cardiovasc Med. 2006;3(1):35‑42.

88. Park J, Morley TS, Kim M, Clegg DJ, Scherer PE. Obesity and cancer--mechanisms underlying tumour progression and recurrence. Nat Rev Endocrinol. 2014;10(8):455‑65.

89. Cook KS, Min HY, Johnson D, Chaplinsky RJ, Flier JS, Hunt CR, et al. Adipsin: a circulating serine protease homolog secreted by adipose tissue and sciatic nerve. Science. 1987;237(4813):402‑5.

90. Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. Br J Nutr. 2004;92(3):347‑55.

91. Ahima RS, Flier JS. Leptin. Annu Rev Physiol. 2000;62(1):413‑37.

92. Allison MB, Myers MG. 20 years of leptin: connecting leptin signaling to biological function. J Endocrinol. 2014;223(1):T25-35.

93. Villanueva EC, Myers MG. Leptin receptor signaling and the regulation of mammalian physiology. Int J Obes. 2008;32 Suppl 7:S8-12.

94. Wada N, Hirako S, Takenoya F, Kageyama H, Okabe M, Shioda S. Leptin and its receptors. J Chem Neuroanat. 2014;61‑62:191‑9.

95. Bendinelli P, Maroni P, Pecori Giraldi F, Piccoletti R. Leptin activates Stat3, Stat1 and AP-1 in mouse adipose tissue. Mol Cell Endocrinol. 2000;168(1‑2):11‑20.

96. Gurzov EN, Stanley WJ, Pappas EG, Thomas HE, Gough DJ. The JAK/STAT pathway in obesity and diabetes. FEBS J. 2016;283(16):3002‑15.

97. Kloek C, Haq AK, Dunn SL, Lavery HJ, Banks AS, Myers MG. Regulation of Jak kinases by intracellular leptin receptor sequences. J Biol Chem. 2002;277(44):41547‑55.

98. Bjørbaek C, Uotani S, da Silva B, Flier JS. Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. J Biol Chem. 1997;272(51):32686‑95.

99. Niswender KD, Schwartz MW. Insulin and leptin revisited: adiposity signals with overlapping physiological and intracellular signaling capabilities. Front Neuroendocrinol. 2003;24(1):1‑10.

100. Dunn SL, Björnholm M, Bates SH, Chen Z, Seifert M, Myers MG. Feedback inhibition of leptin receptor/Jak2 signaling via Tyr1138 of the leptin receptor and suppressor of cytokine signaling 3. Mol Endocrinol Baltim Md. 2005;19(4):925‑38.

101. Howard JK, Cave BJ, Oksanen LJ, Tzameli I, Bjørbaek C, Flier JS. Enhanced leptin sensitivity and attenuation of diet-induced obesity in mice with haploinsufficiency of Socs3. Nat Med. 2004;10(7):734‑8.

102. Sahu A. Leptin signaling in the hypothalamus: emphasis on energy homeostasis and leptin resistance. Front Neuroendocrinol. 2003;24(4):225‑53.

103. Niswender KD, Morton GJ, Stearns WH, Rhodes CJ, Myers MG, Schwartz MW. Intracellular signalling. Key enzyme in leptin-induced anorexia. Nature. 2001;413(6858):794‑5.

104. Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, et al. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. Science. 1995;269(5223):540‑3.

105. Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, et al. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. Nature. 1997;387(6636):903‑8.

106. Sáinz N, Barrenetxe J, Moreno-Aliaga MJ, Martínez JA. Leptin resistance and diet-induced obesity: central and peripheral actions of leptin. Metabolism. 2015;64(1):35‑46.

107. Caro JF, Kolaczynski JW, Nyce MR, Ohannesian JP, Opentanova I, Goldman WH, et al. Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. Lancet Lond Engl. 1996;348(9021):159‑61.

108. Martin RL, Perez E, He YJ, Dawson R, Millard WJ. Leptin resistance is associated with hypothalamic leptin receptor mRNA and protein downregulation. Metabolism. 2000;49(11):1479‑84.

109. Leon-Cabrera S, Solís-Lozano L, Suárez-Álvarez K, González-Chávez A, Béjar YL, Robles-Díaz G, et al. Hyperleptinemia is associated with parameters of low-grade systemic

inflammation and metabolic dysfunction in obese human beings. Front Integr Neurosci. 2013;7:62.

110. Hsuchou H, Kastin AJ, Mishra PK, Pan W. C-reactive protein increases BBB permeability: implications for obesity and neuroinflammation. Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol. 2012;30(5):1109‑19.

111. Olofsson LE, Unger EK, Cheung CC, Xu AW. Modulation of AgRP-neuronal function by SOCS3 as an initiating event in diet-induced hypothalamic leptin resistance. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110(8):E697-706.

112. Schéle E, Grahnemo L, Anesten F, Hallén A, Bäckhed F, Jansson J-O. The gut microbiota reduces leptin sensitivity and the expression of the obesity-suppressing neuropeptides proglucagon (Gcg) and brain-derived neurotrophic factor (Bdnf) in the central nervous system. Endocrinology. 2013;154(10):3643‑51.

113. Buettner C, Muse ED, Cheng A, Chen L, Scherer T, Pocai A, et al. Leptin controls adipose tissue lipogenesis via central, STAT3-independent mechanisms. Nat Med. 2008;14(6):667‑75.

114. Minokoshi Y, Kim Y-B, Peroni OD, Fryer LGD, Müller C, Carling D, et al. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. Nature. 2002;415(6869):339‑43.

115. Tanaka T, Hidaka S, Masuzaki H, Yasue S, Minokoshi Y, Ebihara K, et al. Skeletal muscle AMP-activated protein kinase phosphorylation parallels metabolic phenotype in leptin transgenic mice under dietary modification. Diabetes. 2005;54(8):2365‑74.

116. Sáinz N, Rodríguez A, Catalán V, Becerril S, Ramírez B, Lancha A, et al. Leptin reduces the expression and increases the phosphorylation of the negative regulators of GLUT4 traffic TBC1D1 and TBC1D4 in muscle of ob/ob mice. PloS One. 2012;7(1):e29389.

117. Roman EAFR, Reis D, Romanatto T, Maimoni D, Ferreira EA, Santos GA, et al. Central leptin action improves skeletal muscle AKT, AMPK, and PGC1 alpha activation by hypothalamic PI3K-dependent mechanism. Mol Cell Endocrinol. 15 janv 2010;314(1):62‑9.

118. La Cava A, Matarese G. The weight of leptin in immunity. Nat Rev Immunol. 2004;4(5):371‑9.

119. Francisco V, Pino J, Campos-Cabaleiro V, Ruiz-Fernández C, Mera A, Gonzalez-Gay MA, et al. Obesity, Fat Mass and Immune System: Role for Leptin. Front Physiol. 2018;9:640.

120. Hsu A, Aronoff DM, Phipps J, Goel D, Mancuso P. Leptin improves pulmonary bacterial clearance and survival in ob/ob mice during pneumococcal pneumonia. Clin Exp Immunol. 2007;150(2):332‑9.

121. Mancuso P, Gottschalk A, Phare SM, Peters-Golden M, Lukacs NW, Huffnagle GB. Leptin-deficient mice exhibit impaired host defense in Gram-negative pneumonia. J Immunol Baltim Md 1950. 2002;168(8):4018‑24.

122. Tsiotra PC, Pappa V, Raptis SA, Tsigos C. Expression of the long and short leptin receptor isoforms in peripheral blood mononuclear cells: implications for leptin's actions. Metabolism. 2000;49(12):1537‑41.

123. Bruno A, Conus S, Schmid I, Simon H-U. Apoptotic pathways are inhibited by leptin receptor activation in neutrophils. J Immunol Baltim Md 1950. 2005;174(12):8090‑6.

124. Conus S, Bruno A, Simon H-U. Leptin is an eosinophil survival factor. J Allergy Clin Immunol. 2005;116(6):1228‑34.

125. Lam QLK, Liu S, Cao X, Lu L. Involvement of leptin signaling in the survival and maturation of bone marrow-derived dendritic cells. Eur J Immunol. 2006;36(12):3118‑30.

126. Amarilyo G, Iikuni N, Liu A, Matarese G, La Cava A. Leptin enhances availability of apoptotic cell-derived self-antigen in systemic lupus erythematosus. PloS One. 2014;9(11):e112826.

127. Sánchez-Pozo C, Rodriguez-Baño J, Domínguez-Castellano A, Muniain MA, Goberna R, Sánchez-Margalet V. Leptin stimulates the oxidative burst in control monocytes but attenuates the oxidative burst in monocytes from HIV-infected patients. Clin Exp Immunol. 2003;134(3):464‑9.

128. Maingrette F, Renier G. Leptin increases lipoprotein lipase secretion by macrophages: involvement of oxidative stress and protein kinase C. Diabetes. 2003;52(8):2121‑8.

129. Mancuso P, Canetti C, Gottschalk A, Tithof PK, Peters-Golden M. Leptin augments alveolar macrophage leukotriene synthesis by increasing phospholipase activity and enhancing group IVC iPLA2 (cPLA2gamma) protein expression. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2004;287(3):L497-502.

130. Martín-Romero C, Sánchez-Margalet V. Human leptin activates PI3K and MAPK pathways in human peripheral blood mononuclear cells: possible role of Sam68. Cell Immunol. 2001;212(2):83‑91.

131. Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, Lechler RI. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. Nature. 1998;394(6696):897‑901.

132. Fujita Y, Murakami M, Ogawa Y, Masuzaki H, Tanaka M, Ozaki S, et al. Leptin inhibits stress-induced apoptosis of T lymphocytes. Clin Exp Immunol. 2002;128(1):21‑6.

133. Scotece M, Conde J, López V, Lago F, Pino J, Gómez-Reino JJ, et al. Adiponectin and leptin: new targets in inflammation. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2014;114(1):97‑102.

134. Vázquez MJ, Romero-Ruiz A, Tena-Sempere M. Roles of leptin in reproduction, pregnancy and polycystic ovary syndrome: consensus knowledge and recent developments. Metabolism. 2015;64(1):79‑91.

135. Adya R, Tan BK, Randeva HS. Differential effects of leptin and adiponectin in endothelial angiogenesis. J Diabetes Res. 2015;2015:648239.

136. Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. J Biol Chem. 1995;270(45):26746‑9.

137. Nakano Y, Tobe T, Choi-Miura NH, Mazda T, Tomita M. Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. J Biochem (Tokyo). 1996;120(4):803‑12.

138. Takahashi M, Arita Y, Yamagata K, Matsukawa Y, Okutomi K, Horie M, et al. Genomic structure and mutations in adipose-specific gene, adiponectin. Int J Obes Relat Metab Disord J Int Assoc Study Obes. 2000;24(7):861‑8.

139. Frizzell N, Rajesh M, Jepson MJ, Nagai R, Carson JA, Thorpe SR, et al. Succination of thiol groups in adipose tissue proteins in diabetes: succination inhibits polymerization and secretion of adiponectin. J Biol Chem. 2009;284(38):25772‑81.

140. Fang H, Judd RL. Adiponectin Regulation and Function. Compr Physiol. 2018;8(3):1031‑63.

141. Pajvani UB, Du X, Combs TP, Berg AH, Rajala MW, Schulthess T, et al. Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications fpr metabolic regulation and bioactivity. J Biol Chem. 2003;278(11):9073‑85.

142. Gavrila A, Peng C-K, Chan JL, Mietus JE, Goldberger AL, Mantzoros CS. Diurnal and ultradian dynamics of serum adiponectin in healthy men: comparison with leptin, circulating soluble leptin receptor, and cortisol patterns. J Clin Endocrinol Metab. 2003;88(6):2838‑43.

143. Hu E, Liang P, Spiegelman BM. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. J Biol Chem. 1996;271(18):10697‑703.

144. Arita Y. Reprint of “Paradoxical Decrease of an Adipose-Specific Protein, Adiponectin, in Obesity”. Biochem Biophys Res Commun. 2012;425(3):560‑4.

145. Swarbrick MM, Havel PJ. Physiological, pharmacological, and nutritional regulation of circulating adiponectin concentrations in humans. Metab Syndr Relat Disord. 2008;6(2):87‑102.

146. Bruun JM, Lihn AS, Verdich C, Pedersen SB, Toubro S, Astrup A, et al. Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2003;285(3):E527-533.

147. Wang Y, Lam KSL, Yau M, Xu A. Post-translational modifications of adiponectin: mechanisms and functional implications. Biochem J. 2008;409(3):623‑33.

148. Xie L, Boyle D, Sanford D, Scherer PE, Pessin JE, Mora S. Intracellular trafficking and secretion of adiponectin is dependent on GGA-coated vesicles. J Biol Chem. 2006;281(11):7253‑9.

149. Wang Y, Lam KSL, Chan L, Chan KW, Lam JBB, Lam MC, et al. Post-translational modifications of the four conserved lysine residues within the collagenous domain of adiponectin are required for the formation of its high molecular weight oligomeric complex. J Biol Chem. 2006;281(24):16391‑400.

150. Liu M, Liu F. Transcriptional and post-translational regulation of adiponectin. Biochem J. 2009;425(1):41‑52.

151. Wang ZV, Scherer PE. DsbA-L is a versatile player in adiponectin secretion. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105(47):18077‑8.

152. Liu M, Zhou L, Xu A, Lam KSL, Wetzel MD, Xiang R, et al. A disulfide-bond A oxidoreductase-like protein (DsbA-L) regulates adiponectin multimerization. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105(47):18302‑7.

153. Zhou L, Liu F. Autophagy: roles in obesity-induced ER stress and adiponectin downregulation in adipocytes. Autophagy. 2010;6(8):1196‑7.

154. Tsao T-S, Murrey HE, Hug C, Lee DH, Lodish HF. Oligomerization state-dependent activation of NF-kappa B signaling pathway by adipocyte complement-related protein of 30 kDa (Acrp30). J Biol Chem. 2002;277(33):29359‑62.

155. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, et al. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. Nature. 2003;423(6941):762‑9.

156. Tanabe H, Fujii Y, Okada-Iwabu M, Iwabu M, Nakamura Y, Hosaka T, et al. Crystal structures of the human adiponectin receptors. Nature. 2015;520(7547):312‑6.

157. Hug C, Wang J, Ahmad NS, Bogan JS, Tsao T-S, Lodish HF. T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(28):10308‑13.

158. Parker-Duffen JL, Nakamura K, Silver M, Kikuchi R, Tigges U, Yoshida S, et al. T-cadherin is essential for adiponectin-mediated revascularization. J Biol Chem. 2013;288(34):24886‑97.

159. Mao X, Kikani CK, Riojas RA, Langlais P, Wang L, Ramos FJ, et al. APPL1 binds to adiponectin receptors and mediates adiponectin signalling and function. Nat Cell Biol. 2006;8(5):516‑23.

160. Deepa SS, Zhou L, Ryu J, Wang C, Mao X, Li C, et al. APPL1 mediates adiponectin-induced LKB1 cytosolic localization through the PP2A-PKCzeta signaling pathway. Mol Endocrinol Baltim Md. 2011;25(10):1773‑85.

161. Ryu J, Galan AK, Xin X, Dong F, Abdul-Ghani MA, Zhou L, et al. APPL1 potentiates insulin sensitivity by facilitating the binding of IRS1/2 to the insulin receptor. Cell Rep. 2014;7(4):1227‑38.

162. Zhou L, Deepa SS, Etzler JC, Ryu J, Mao X, Fang Q, et al. Adiponectin activates AMP-activated protein kinase in muscle cells via APPL1/LKB1-dependent and phospholipase C/Ca2+/Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase kinase-dependent pathways. J Biol Chem. 2009;284(33):22426‑35.

163. Vasiliauskaité-Brooks I, Sounier R, Rochaix P, Bellot G, Fortier M, Hoh F, et al. Structural insights into adiponectin receptors suggest ceramidase activity. Nature. 2017;544(7648):120‑3.

164. Holland WL, Summers SA. Sphingolipids, insulin resistance, and metabolic disease: new insights from in vivo manipulation of sphingolipid metabolism. Endocr Rev. 2008;29(4):381‑402.

165. Holland WL, Miller RA, Wang ZV, Sun K, Barth BM, Bui HH, et al. Receptor-mediated activation of ceramidase activity initiates the pleiotropic actions of adiponectin. Nat Med. 2011;17(1):55‑63.

166. Ryo M, Nakamura T, Kihara S, Kumada M, Shibazaki S, Takahashi M, et al. Adiponectin as a biomarker of the metabolic syndrome. Circ J Off J Jpn Circ Soc. 2004;68(11):975‑81.

167. Li S, Shin HJ, Ding EL, van Dam RM. Adiponectin levels and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. JAMA. 2009;302(2):179‑88.

168. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. Nat Med. 2001;7(8):941‑6.

169. Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, Yen FT, et al. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98(4):2005‑10.

170. Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. Nat Med. 2001;7(8):947‑53.

171. Combs TP, Berg AH, Obici S, Scherer PE, Rossetti L. Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. J Clin Invest. 2001;108(12):1875‑81.

172. Combs TP, Berg AH, Obici S, Scherer PE, Rossetti L. Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. J Clin Invest. 2001;108(12):1875‑81.

173. Wang C, Mao X, Wang L, Liu M, Wetzel MD, Guan K-L, et al. Adiponectin sensitizes insulin signaling by reducing p70 S6 kinase-mediated serine phosphorylation of IRS-1. J Biol Chem. 2007;282(11):7991‑6.

174. Cheng KKY, Lam KSL, Wu D, Wang Y, Sweeney G, Hoo RLC, et al. APPL1 potentiates insulin secretion in pancreatic β cells by enhancing protein kinase Akt-dependent expression of SNARE proteins in mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109(23):8919‑24.

175. Ferré P. The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity. Diabetes. 2004;53 Suppl 1:S43-50.

176. Kobayashi H, Ouchi N, Kihara S, Walsh K, Kumada M, Abe Y, et al. Selective suppression of endothelial cell apoptosis by the high molecular weight form of adiponectin. Circ Res. 2004;94(4):e27-31.

177. Chen H, Montagnani M, Funahashi T, Shimomura I, Quon MJ. Adiponectin stimulates production of nitric oxide in vascular endothelial cells. J Biol Chem. 2003;278(45):45021‑6.

178. Ouchi N, Kobayashi H, Kihara S, Kumada M, Sato K, Inoue T, et al. Adiponectin stimulates angiogenesis by promoting cross-talk between AMP-activated protein kinase and Akt signaling in endothelial cells. J Biol Chem. 2004;279(2):1304‑9.

179. Chinetti G, Zawadski C, Fruchart JC, Staels B. Expression of adiponectin receptors in human macrophages and regulation by agonists of the nuclear receptors PPARalpha, PPARgamma, and LXR. Biochem Biophys Res Commun. 2004;314(1):151‑8.

180. Okada-Iwabu M, Yamauchi T, Iwabu M, Honma T, Hamagami K, Matsuda K, et al. A small-molecule AdipoR agonist for type 2 diabetes and short life in obesity. Nature. 2013;503(7477):493‑9.

181. Okada-Iwabu M, Iwabu M, Ueki K, Yamauchi T, Kadowaki T. Perspective of Small-Molecule AdipoR Agonist for Type 2 Diabetes and Short Life in Obesity. Diabetes Metab J. 2015;39(5):363‑72.

182. Esfahani M, Shabab N, Saidijam M. AdipoRon may be benefit for atherosclerosis prevention. Iran J Basic Med Sci. 2017;20(2):107‑9.

183. Choi SR, Lim JH, Kim MY, Kim EN, Kim Y, Choi BS, et al. Adiponectin receptor agonist AdipoRon decreased ceramide, and lipotoxicity, and ameliorated diabetic nephropathy. Metabolism. 2018;85:348‑60.

184. Zhang Y, Zhao J, Li R, Lau WB, Yuan Y-X, Liang B, et al. AdipoRon, the first orally active adiponectin receptor activator, attenuates postischemic myocardial apoptosis through both AMPK-mediated and AMPK-independent signalings. Am J Physiol Endocrinol Metab. 1 2015;309(3):E275-282.

185. Wang Y, Wan Y, Ye G, Wang P, Xue X, Wu G, et al. Hepatoprotective effects of AdipoRon against d-galactosamine-induced liver injury in mice. Eur J Pharm Sci Off J Eur Fed Pharm Sci. 2016;93:123‑31.

186. Garten A, Schuster S, Penke M, Gorski T, de Giorgis T, Kiess W. Physiological and pathophysiological roles of NAMPT and NAD metabolism. Nat Rev Endocrinol. 2015;11(9):535‑46.

187. Burgos ES, Vetticatt MJ, Schramm VL. Recycling nicotinamide. The transition-state structure of human nicotinamide phosphoribosyltransferase. J Am Chem Soc. 2013;135(9):3485‑93.

188. Samal B, Sun Y, Stearns G, Xie C, Suggs S, McNiece I. Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor. Mol Cell Biol. 1994;14(2):1431‑7.

189. Yoon MJ, Yoshida M, Johnson S, Takikawa A, Usui I, Tobe K, et al. SIRT1-Mediated eNAMPT Secretion from Adipose Tissue Regulates Hypothalamic NAD+ and Function in Mice. Cell Metab. 2015;21(5):706‑17.

190. Haider DG, Schindler K, Schaller G, Prager G, Wolzt M, Ludvik B. Increased plasma visfatin concentrations in morbidly obese subjects are reduced after gastric banding. J Clin Endocrinol Metab. 2006;91(4):1578‑81.

191. El-Mesallamy HO, Kassem DH, El-Demerdash E, Amin AI. Vaspin and visfatin/Nampt are interesting interrelated adipokines playing a role in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. Metabolism. 2011;60(1):63‑70.

192. Chang Y-H, Chang D-M, Lin K-C, Shin S-J, Lee Y-J. Visfatin in overweight/obesity, type 2 diabetes mellitus, insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular diseases: a meta-analysis and systemic review. Diabetes Metab Res Rev. 2011;27(6):515‑27.

193. Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, Segawa K, Tanaka M, Kishimoto K, et al. Retraction. Science. 2007;318(5850):565.

194. Camp SM, Ceco E, Evenoski CL, Danilov SM, Zhou T, Chiang ET, et al. Unique Toll-Like Receptor 4 Activation by NAMPT/PBEF Induces NFκB Signaling and Inflammatory Lung Injury. Sci Rep. 2015;5:13135.

195. Van den Bergh R, Morin S, Sass HJ, Grzesiek S, Vekemans M, Florence E, et al. Monocytes contribute to differential immune pressure on R5 versus X4 HIV through the adipocytokine visfatin/NAMPT. PloS One. 2012;7(4):e35074.

196. Revollo JR, Körner A, Mills KF, Satoh A, Wang T, Garten A, et al. Nampt/PBEF/Visfatin regulates insulin secretion in beta cells as a systemic NAD biosynthetic enzyme. Cell Metab. 2007;6(5):363‑75.

197. Haider DG, Schaller G, Kapiotis S, Maier C, Luger A, Wolzt M. The release of the adipocytokine visfatin is regulated by glucose and insulin. Diabetologia. 2006;49(8):1909‑14.

198. Chen Y, Chen M, Wu Z, Zhao S. Ox-LDL induces ER stress and promotes the adipokines secretion in 3T3-L1 adipocytes. PloS One. 2013;8(10):e81379.

199. Kralisch S, Klein J, Lossner U, Bluher M, Paschke R, Stumvoll M, et al. Hormonal regulation of the novel adipocytokine visfatin in 3T3-L1 adipocytes. J Endocrinol. 2005;185(3):R1-8.

200. Kim H-S, Han S-Y, Sung H-Y, Park S-H, Kang M-K, Han S-J, et al. Blockade of visfatin induction by oleanolic acid via disturbing IL-6-TRAF6-NF-κB signaling of adipocytes. Exp Biol Med Maywood NJ. 2014;239(3):284‑92.

201. Kim S-R, Bae S-K, Choi K-S, Park S-Y, Jun HO, Lee J-Y, et al. Visfatin promotes angiogenesis by activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2. Biochem Biophys Res Commun. 2007;357(1):150‑6.

202. Moschen AR, Gerner RR, Tilg H. Pre-B cell colony enhancing factor/NAMPT/visfatin in inflammation and obesity-related disorders. Curr Pharm Des. 2010;16(17):1913‑20.

203. Romacho T, Azcutia V, Vázquez-Bella M, Matesanz N, Cercas E, Nevado J, et al. Extracellular PBEF/NAMPT/visfatin activates pro-inflammatory signalling in human vascular smooth muscle cells through nicotinamide phosphoribosyltransferase activity. Diabetologia. 2009;52(11):2455‑63.

204. Sommer G, Kralisch S, Kloting N, Kamprad M, Schrock K, Kratzsch J, et al. Visfatin is a positive regulator of MCP-1 in human adipocytes in vitro and in mice in vivo. Obes Silver Spring Md. 2010;18(8):1486‑92.

205. Chiarugi A, Dölle C, Felici R, Ziegler M. The NAD metabolome--a key determinant of cancer cell biology. Nat Rev Cancer. nov 2012;12(11):741‑52.

206. Galli U, Travelli C, Massarotti A, Fakhfouri G, Rahimian R, Tron GC, et al. Medicinal chemistry of nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) inhibitors. J Med Chem. 2013;56(16):6279‑96.

207. Wang T, Gross C, Desai AA, Zemskov E, Wu X, Garcia AN, et al. Endothelial cell signaling and ventilator-induced lung injury: molecular mechanisms, genomic analyses, and therapeutic targets. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2017;312(4):L452‑76.

208. Sun X, Elangovan VR, Mapes B, Camp SM, Sammani S, Saadat L, et al. The NAMPT promoter is regulated by mechanical stress, signal transducer and activator of transcription 5, and acute respiratory distress syndrome-associated genetic variants. Am J Respir Cell Mol Biol. 2014;51(5):660‑7.

209. Ye SQ, Simon BA, Maloney JP, Zambelli-Weiner A, Gao L, Grant A, et al. Pre-B-cell colony-enhancing factor as a potential novel biomarker in acute lung injury. Am J Respir Crit Care Med. 2005;171(4):361‑70.

210. Li H, Liu P, Cepeda J, Fang D, Easley RB, Simon BA, et al. Augmentation of Pulmonary Epithelial Cell IL-8 Expression and Permeability by Pre-B-cell Colony Enhancing Factor. J Inflamm Lond Engl. 2008 ;5:15. doi: 10.1186/1476-9255-5-15

211. Liu P, Li H, Cepeda J, Zhang LQ, Cui X, Garcia JGN, et al. Critical role of PBEF expression in pulmonary cell inflammation and permeability. Cell Biol Int. 2009;33(1):19‑30.

212. Travelli C, Colombo G, Mola S, Genazzani AA, Porta C. NAMPT: A pleiotropic modulator of monocytes and macrophages. Pharmacol Res. 2018;135:25‑36.

213. Wittamer V, Franssen J-D, Vulcano M, Mirjolet J-F, Le Poul E, Migeotte I, et al. Specific recruitment of antigen-presenting cells by chemerin, a novel processed ligand from human inflammatory fluids. J Exp Med. 2003;198(7):977‑85.

214. Stejskal D, Karpisek M, Hanulova Z, Svestak M. Chemerin is an independent marker of the metabolic syndrome in a Caucasian population--a pilot study. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czechoslov. 2008;152(2):217‑21.

215. Zabel BA, Allen SJ, Kulig P, Allen JA, Cichy J, Handel TM, et al. Chemerin activation by serine proteases of the coagulation, fibrinolytic, and inflammatory cascades. J Biol Chem. 2005;280(41):34661‑6.

216. Parlee SD, Ernst MC, Muruganandan S, Sinal CJ, Goralski KB. Serum chemerin levels vary with time of day and are modified by obesity and tumor necrosis factor-{alpha}. Endocrinology. 2010;151(6):2590‑602.

217. Ha Y-J, Kang E-J, Song J-S, Park Y-B, Lee S-K, Choi ST. Plasma chemerin levels in rheumatoid arthritis are correlated with disease activity rather than obesity. Jt Bone Spine Rev Rhum. 2014;81(2):189‑90.

218. Weigert J, Neumeier M, Wanninger J, Filarsky M, Bauer S, Wiest R, et al. Systemic chemerin is related to inflammation rather than obesity in type 2 diabetes. Clin Endocrinol (Oxf). 2010;72(3):342‑8.

219. Bozaoglu K, Bolton K, McMillan J, Zimmet P, Jowett J, Collier G, et al. Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome. Endocrinology. 2007;148(10):4687‑94.

220. Ernst MC, Sinal CJ. Chemerin: at the crossroads of inflammation and obesity. Trends Endocrinol Metab TEM. 2010;21(11):660‑7.

221. Mattern A, Zellmann T, Beck-Sickinger AG. Processing, signaling, and physiological function of chemerin. IUBMB Life. 2014;66(1):19‑26.

222. Goralski KB, McCarthy TC, Hanniman EA, Zabel BA, Butcher EC, Parlee SD, et al. Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism. J Biol Chem. 2007;282(38):28175‑88.

223. Sell H, Laurencikiene J, Taube A, Eckardt K, Cramer A, Horrighs A, et al. Chemerin is a novel adipocyte-derived factor inducing insulin resistance in primary human skeletal muscle cells. Diabetes. 2009;58(12):2731‑40.

224. Kaur J, Adya R, Tan BK, Chen J, Randeva HS. Identification of chemerin receptor (ChemR23) in human endothelial cells: chemerin-induced endothelial angiogenesis. Biochem Biophys Res Commun. 2010;391(4):1762‑8.

225. Shimizu N, Soda Y, Kanbe K, Liu HY, Jinno A, Kitamura T, et al. An orphan G protein-coupled receptor, GPR1, acts as a coreceptor to allow replication of human immunodeficiency virus types 1 and 2 in brain-derived cells. J Virol. 1999;73(6):5231‑9.

226. Monnier J, Lewén S, O'Hara E, Huang K, Tu H, Butcher EC, et al. Expression, regulation, and function of atypical chemerin receptor CCRL2 on endothelial cells. J Immunol Baltim Md 1950. 15 juill 2012;189(2):956‑67.

227. Ernst MC, Haidl ID, Zúñiga LA, Dranse HJ, Rourke JL, Zabel BA, et al. Disruption of the chemokine-like receptor-1 (CMKLR1) gene is associated with reduced adiposity and glucose intolerance. Endocrinology. 2012;153(2):672‑82.

228. Muruganandan S, Parlee SD, Rourke JL, Ernst MC, Goralski KB, Sinal CJ. Chemerin, a novel peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) target gene that promotes mesenchymal stem cell adipogenesis. J Biol Chem. 2011;286(27):23982‑95.

229. Muruganandan S, Roman AA, Sinal CJ. Role of chemerin/CMKLR1 signaling in adipogenesis and osteoblastogenesis of bone marrow stem cells. J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res. févr 2010;25(2):222‑34.

230. Vernooy JHJ, Drummen NEA, van Suylen RJ, Cloots RHE, Möller GM, Bracke KR, et al. Enhanced pulmonary leptin expression in patients with severe COPD and asymptomatic smokers. Thorax. 2009;64(1):26‑32.

231. Holguin F, Rojas M, Brown LA, Fitzpatrick AM. Airway and plasma leptin and adiponectin in lean and obese asthmatics and controls. J Asthma Off J Assoc Care Asthma. 2011;48(3):217‑23.

232. Torday JS, Sun H, Wang L, Torres E, Sunday ME, Rubin LP. Leptin mediates the parathyroid hormone-related protein paracrine stimulation of fetal lung maturation. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2002;282(3):L405-410.

233. Bergen HT, Cherlet TC, Manuel P, Scott JE. Identification of leptin receptors in lung and isolated fetal type II cells. Am J Respir Cell Mol Biol. 2002;27(1):71‑7.

234. Huang K, Rabold R, Abston E, Schofield B, Misra V, Galdzicka E, et al. Effects of leptin deficiency on postnatal lung development in mice. J Appl Physiol Bethesda Md 1985. 2008;105(1):249‑59.

235. Chen H, Zhang J-P, Huang H, Wang Z-H, Cheng R, Cai W-B. Leptin promotes fetal lung maturity and upregulates SP-A expression in pulmonary alveoli type-II epithelial cells involving TTF-1 activation. PloS One. 2013;8(7):e69297.

236. Bruno A, Alessi M, Soresi S, Bonanno A, Riccobono L, Montalbano AM, et al. Increased leptin/leptin receptor pathway affects systemic and airway inflammation in COPD former smokers. J Inflamm Res. 2011;4:51‑9.

237. Bruno A, Chanez P, Chiappara G, Siena L, Giammanco S, Gjomarkaj M, et al. Does leptin play a cytokine-like role within the airways of COPD patients? Eur Respir J. 2005;26(3):398‑405.

238. Shore SA, Schwartzman IN, Mellema MS, Flynt L, Imrich A, Johnston RA. Effect of leptin on allergic airway responses in mice. J Allergy Clin Immunol. 2005;115(1):103‑9.

239. Shore SA, Rivera-Sanchez YM, Schwartzman IN, Johnston RA. Responses to ozone are increased in obese mice. J Appl Physiol Bethesda Md 1985. 2003;95(3):938‑45.

240. Zhang L, Yin Y, Zhang H, Zhong W, Zhang J. Association of asthma diagnosis with leptin and adiponectin: a systematic review and meta-analysis. J Investig Med Off Publ Am Fed Clin Res. 2017;65(1):57‑64.

241. Sood A, Ford ES, Camargo CA. Association between leptin and asthma in adults. Thorax. 2006;61(4):300‑5.

242. Bruno A, Pace E, Chanez P, Gras D, Vachier I, Chiappara G, et al. Leptin and leptin receptor expression in asthma. J Allergy Clin Immunol. août 2009;124(2):230‑7, 237.e1-4.

243. Kordonowy LL, Burg E, Lenox CC, Gauthier LM, Petty JM, Antkowiak M, et al. Obesity is associated with neutrophil dysfunction and attenuation of murine acute lung injury. Am J Respir Cell Mol Biol. 2012;47(1):120‑7.

244. Miller M, Cho JY, Pham A, Ramsdell J, Broide DH. Adiponectin and functional adiponectin receptor 1 are expressed by airway epithelial cells in chronic obstructive pulmonary disease. J Immunol Baltim Md 1950. 2009;182(1):684‑91.

245. Sideleva O, Suratt BT, Black KE, Tharp WG, Pratley RE, Forgione P, et al. Obesity and asthma: an inflammatory disease of adipose tissue not the airway. Am J Respir Crit Care Med. 2012;186(7):598‑605.

246. Miller M, Cho JY, Pham A, Ramsdell J, Broide DH. Adiponectin and functional adiponectin receptor 1 are expressed by airway epithelial cells in chronic obstructive pulmonary disease. J Immunol Baltim Md 1950. 2009;182(1):684‑91.

247. Shin JH, Kim JH, Lee WY, Shim JY. The expression of adiponectin receptors and the effects of adiponectin and leptin on airway smooth muscle cells. Yonsei Med J. 2008;49(5):804‑10.

248. Nakanishi K, Takeda Y, Tetsumoto S, Iwasaki T, Tsujino K, Kuhara H, et al. Involvement of endothelial apoptosis underlying chronic obstructive pulmonary disease-like phenotype in adiponectin-null mice: implications for therapy. Am J Respir Crit Care Med. 2011;183(9):1164‑75.

249. Summer R, Little FF, Ouchi N, Takemura Y, Aprahamian T, Dwyer D, et al. Alveolar macrophage activation and an emphysema-like phenotype in adiponectin-deficient mice. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2008;294(6):L1035-1042.

250. Summer R, Fiack CA, Ikeda Y, Sato K, Dwyer D, Ouchi N, et al. Adiponectin deficiency: a model of pulmonary hypertension associated with pulmonary vascular disease. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2009;297(3):L432-438.

251. Miller M, Pham A, Cho JY, Rosenthal P, Broide DH. Adiponectin-deficient mice are protected against tobacco-induced inflammation and increased emphysema. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2010;299(6):L834-842.

252. Sood A, Shore SA. Adiponectin, Leptin, and Resistin in Asthma: Basic Mechanisms through Population Studies. J Allergy. 2013;2013:785835.

253. Shore SA, Terry RD, Flynt L, Xu A, Hug C. Adiponectin attenuates allergen-induced airway inflammation and hyperresponsiveness in mice. J Allergy Clin Immunol. 2006;118(2):389‑95.

254. Walkey AJ, Rice TW, Konter J, Ouchi N, Shibata R, Walsh K, et al. Plasma adiponectin and mortality in critically ill subjects with acute respiratory failure. Crit Care Med. 2010;38(12):2329‑34.

255. Zhu M, Hug C, Kasahara DI, Johnston RA, Williams AS, Verbout NG, et al. Impact of adiponectin deficiency on pulmonary responses to acute ozone exposure in mice. Am J Respir Cell Mol Biol. 2010;43(4):487‑97.

256. Holguin F, Rojas M, Brown LA, Fitzpatrick AM. Airway and plasma leptin and adiponectin in lean and obese asthmatics and controls. J Asthma Off J Assoc Care Asthma. 2011;48(3):217‑23.

257. Tauber AI. Metchnikoff and the phagocytosis theory. Nat Rev Mol Cell Biol. 2003;4(11):897‑901.

258. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. Nat Rev Immunol. 2011;11(11):723‑37.

259. Kaufmann A, Salentin R, Gemsa D, Sprenger H. Increase of CCR1 and CCR5 expression and enhanced functional response to MIP-1 alpha during differentiation of human monocytes to macrophages. J Leukoc Biol. 2001;69(2):248‑52.

260. Gautier EL, Shay T, Miller J, Greter M, Jakubzick C, Ivanov S, et al. Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. Nat Immunol. 2012;13(11):1118‑28.

261. Hashimoto D, Chow A, Noizat C, Teo P, Beasley MB, Leboeuf M, et al. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. Immunity. 2013;38(4):792‑804.

262. Yona S, Kim K-W, Wolf Y, Mildner A, Varol D, Breker M, et al. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. Immunity. 2013;38(1):79‑91.

263. Sieweke MH, Allen JE. Beyond stem cells: self-renewal of differentiated macrophages. Science. 2013;342(6161):1242974.

264. Aziz A, Soucie E, Sarrazin S, Sieweke MH. MafB/c-Maf deficiency enables self-renewal of differentiated functional macrophages. Science. 6 nov 2009;326(5954):867‑71.

265. Davies LC, Taylor PR. Tissue-resident macrophages: then and now. Immunology. 2015;144(4):541‑8.

266. Gordon S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. Cell. 2002;111(7):927‑30.

267. Strober W, Murray PJ, Kitani A, Watanabe T. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. Nat Rev Immunol. 2006;6(1):9‑20.

268. Shaw MH, Reimer T, Kim Y-G, Nuñez G. NOD-like receptors (NLRs): bona fide intracellular microbial sensors. Curr Opin Immunol. 2008;20(4):377‑82.

269. Gordon S, Plüddemann A. Macrophage Clearance of Apoptotic Cells: A Critical Assessment. Front Immunol. 2018;9:127.

270. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. Nat Rev Immunol. 2011;11(11):723‑37.

271. Jakubzick C, Gautier EL, Gibbings SL, Sojka DK, Schlitzer A, Johnson TE, et al. Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes. Immunity. 2013;39(3):599‑610.

272. Jakubzick CV, Randolph GJ, Henson PM. Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. Nat Rev Immunol. juin 2017;17(6):349‑62.

273. Rada B, Leto TL. Oxidative innate immune defenses by Nox/Duox family NADPH oxidases. Contrib Microbiol. 2008;15:164‑87.

274. Meissner F, Seger RA, Moshous D, Fischer A, Reichenbach J, Zychlinsky A. Inflammasome activation in NADPH oxidase defective mononuclear phagocytes from patients with chronic granulomatous disease. Blood. 2010;116(9):1570‑3.

275. Fernandez-Boyanapalli R, Frasch SC, Riches DWH, Vandivier RW, Henson PM, Bratton DL. PPARγ activation normalizes resolution of acute sterile inflammation in murine chronic granulomatous disease. Blood. 2010;116(22):4512‑22.

276. Landsman L, Jung S. Lung macrophages serve as obligatory intermediate between blood monocytes and alveolar macrophages. J Immunol Baltim Md 1950. 2007;179(6):3488‑94.

277. Bitterman PB, Saltzman LE, Adelberg S, Ferrans VJ, Crystal RG. Alveolar macrophage replication. One mechanism for the expansion of the mononuclear phagocyte population in the chronically inflamed lung. J Clin Invest. 1984;74(2):460‑9.

278. Lohmann-Matthes ML, Steinmüller C, Franke-Ullmann G. Pulmonary macrophages. Eur Respir J. s1994;7(9):1678‑89.

279. Kobzik L, Godleski JJ, Barry BE, Brain JD. Isolation and antigenic identification of hamster lung interstitial macrophages. Am Rev Respir Dis. 1988;138(4):908‑14.

280. Evans MJ, Shami SG, Martinez LA. Enhanced proliferation of pulmonary alveolar macrophages after carbon instillation in mice depleted of blood monocytes by strontium-89. Lab Investig J Tech Methods Pathol. 1986;54(2):154‑9.

281. Tan SYS, Krasnow MA. Developmental origin of lung macrophage diversity. Dev Camb Engl. 1 2016;143(8):1318‑27.

282. Guilliams M, De Kleer I, Henri S, Post S, Vanhoutte L, De Prijck S, et al. Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. J Exp Med. 2013;210(10):1977‑92.

283. Hashimoto D, Chow A, Noizat C, Teo P, Beasley MB, Leboeuf M, et al. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. Immunity. 2013;38(4):792‑804.

284. Schyns J, Bureau F, Marichal T. Lung Interstitial Macrophages: Past, Present, and Future. J Immunol Res. 2018;2018:5160794.

285. Garbi N, Lambrecht BN. Location, function, and ontogeny of pulmonary macrophages during the steady state. Pflugers Arch. 2017;469(3‑4):561‑72.

286. Bedoret D, Wallemacq H, Marichal T, Desmet C, Quesada Calvo F, Henry E, et al. Lung interstitial macrophages alter dendritic cell functions to prevent airway allergy in mice. J Clin Invest. 2009;119(12):3723‑38.

287. Mesnil C, Raulier S, Paulissen G, Xiao X, Birrell MA, Pirottin D, et al. Lung-resident eosinophils represent a distinct regulatory eosinophil subset. J Clin Invest. 2016;126(9):3279‑95.

288. Gong JL, McCarthy KM, Rogers RA, Schneeberger EE. Interstitial lung macrophages interact with dendritic cells to present antigenic peptides derived from particulate antigens to T cells. Immunology. 1994;81(3):343‑51.

289. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J Immunol Baltim Md 1950. 1986;136(7):2348‑57.

290. Wierenga EA, Snoek M, de Groot C, Chrétien I, Bos JD, Jansen HM, et al. Evidence for compartmentalization of functional subsets of CD2+ T lymphocytes in atopic patients. J Immunol Baltim Md 1950. 1990;144(12):4651‑6.

291. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annu Rev Immunol. 1989;7:145‑73.

292. Liew FY. T(H)1 and T(H)2 cells: a historical perspective. Nat Rev Immunol. 2002;2(1):55‑60.

293. Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. J Exp Med. 1992;176(1):287‑92.

294. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. Pillars Article: M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. J. Immunol. 2000. 164: 6166-6173. J Immunol Baltim Md 1950. 2017;199(7):2194‑201.

295. Mosser DM. The many faces of macrophage activation. J Leukoc Biol. 2003;73(2):209‑12.

296. 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):677‑86.

297. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. Front Biosci J Virtual Libr. 2008;13:453‑61.

298. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. F1000prime Rep. 2014;6:13.

299. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdt S, et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. Immunity. 2014;41(1):14‑20.

300. Benoit M., Desnues B, Mege JL. Macrophage polarization in bacterial infections. J Immunol. 2008 15;181(6):3733-9

301. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. Nat Rev Immunol. 2008;8(12):958‑69.

302. Tugal D, Liao X, Jain MK. Transcriptional control of macrophage polarization. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2013;33(6):1135‑44.

303. Liu Y, Stewart KN, Bishop E, Marek CJ, Kluth DC, Rees AJ, et al. Unique expression of suppressor of cytokine signaling 3 is essential for classical macrophage activation in rodents in vitro and in vivo. J Immunol Baltim Md 1950. 2008;180(9):6270‑8.

304. Krausgruber T, Blazek K, Smallie T, Alzabin S, Lockstone H, Sahgal N, et al. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. Nat Immunol. 2011;12(3):231‑8.

305. Fenton MJ, Vermeulen MW, Kim S, Burdick M, Strieter RM, Kornfeld H. Induction of gamma interferon production in human alveolar macrophages by Mycobacterium tuberculosis. Infect Immun. 1997;65(12):5149‑56.

306. Young HA, Hardy KJ. Role of interferon-gamma in immune cell regulation. J Leukoc Biol. 1995;58(4):373‑81.

307. Platanias LC. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. Nat Rev Immunol. 2005;5(5):375‑86.

308. Schroder K, Sweet MJ, Hume DA. Signal integration between IFNgamma and TLR signalling pathways in macrophages. Immunobiology. 2006;211(6‑8):511‑24.

309. Sweet MJ, Stacey KJ, Kakuda DK, Markovich D, Hume DA. IFN-gamma primes macrophage responses to bacterial DNA. J Interferon Cytokine Res Off J Int Soc Interferon Cytokine Res. 1998;18(4):263‑71.

310. Van Dyken SJ, Locksley RM. Interleukin-4- and interleukin-13-mediated alternatively activated macrophages: roles in homeostasis and disease. Annu Rev Immunol. 2013;31:317‑43.

311. McCormick SM, Heller NM. Commentary: IL-4 and IL-13 receptors and signaling. Cytokine. 2015;75(1):38‑50.

312. 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 Radic Biol Med. 2013;54:1‑16.

313. Martinez FO, Helming L, Milde R, Varin A, Melgert BN, Draijer C, 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.

314. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. J Clin Invest. 2012;122(3):787‑95.

315. Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Goforth MH, Morel CR, Subramanian V, Mukundan L, et al. Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance. Nature. 2007;447(7148):1116‑20.

316. Fernandez S, Jose P, Avdiushko MG, Kaplan AM, Cohen DA. Inhibition of IL-10 receptor function in alveolar macrophages by Toll-like receptor agonists. J Immunol Baltim Md 1950. 2004;172(4):2613‑20.

317. Lang R, Patel D, Morris JJ, Rutschman RL, Murray PJ. Shaping gene expression in activated and resting primary macrophages by IL-10. J Immunol Baltim Md 1950. 2002;169(5):2253‑63.

318. Curtale G, Mirolo M, Renzi TA, Rossato M, Bazzoni F, Locati M. Negative regulation of Toll-like receptor 4 signaling by IL-10-dependent microRNA-146b. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110(28):11499‑504.

319. Flavell RA, Sanjabi S, Wrzesinski SH, Licona-Limón P. The polarization of immune cells in the tumour environment by TGFbeta. Nat Rev Immunol. 010;10(8):554‑67.

320. 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 Baltim Md 1950. 2006;177(10):7303‑11.

321. Xue J, Schmidt SV, Sander J, Draffehn A, Krebs W, Quester I, et al. Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. Immunity. 2014;40(2):274‑88.

322. Italiani P, Mazza EMC, Lucchesi D, Cifola I, Gemelli C, Grande A, et al. Transcriptomic profiling of the development of the inflammatory response in human monocytes in vitro. PloS One. 2014;9(2):e87680.

323. Li J, Pritchard DK, Wang X, Park DR, Bumgarner RE, Schwartz SM, et al. 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):328‑35.

324. Victoni T, Salvator H, Abrial C, Brollo M, Porto LCS, Lagente V, et al. Human lung and monocyte-derived macrophages differ with regard to the effects of β2-adrenoceptor agonists on cytokine release. Respir Res. 21 2017;18(1):126.

325. Gundra UM, Girgis NM, Ruckerl D, Jenkins S, Ward LN, Kurtz ZD, et al. Alternatively activated macrophages derived from monocytes and tissue macrophages are phenotypically and functionally distinct. Blood. 2014;123(20):e110-122.

326. Benoit M, Desnues B, Mege J-L. Macrophage polarization in bacterial infections. J Immunol Baltim Md 1950. 2008;181(6):3733‑9.

327. Sironi M, Martinez FO, D'Ambrosio D, Gattorno M, Polentarutti N, Locati M, et al. 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. 2006;80(2):342‑9.

328. Jaguin M, Houlbert N, Fardel O, Lecureur 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.

329. Novak ML, Koh TJ. Macrophage phenotypes during tissue repair. J Leukoc Biol. 2013;93(6):875‑81.

330. Gerber JS, Mosser DM. Reversing lipopolysaccharide toxicity by ligating the macrophage Fc gamma receptors. J Immunol Baltim Md 1950. 2001;166(11):6861‑8.

331. Bogdan C, Paik J, Vodovotz Y, Nathan C. Contrasting mechanisms for suppression of macrophage cytokine release by transforming growth factor-beta and interleukin-10. J Biol Chem. 1992;267(32):23301‑8.

332. Peiser L, Mukhopadhyay S, Gordon S. Scavenger receptors in innate immunity. Curr Opin Immunol. 2002;14(1):123‑8.

333. Ambarus CA, Krausz S, van Eijk M, Hamann J, Radstake TRDJ, Reedquist KA, et al. Systematic validation of specific phenotypic markers for in vitro polarized human macrophages. J Immunol Methods. 2012;375(1‑2):196‑206.

334. Huang SC-C, Everts B, Ivanova Y, O'Sullivan D, Nascimento M, Smith AM, et al. Cell-intrinsic lysosomal lipolysis is essential for alternative activation of macrophages. Nat Immunol. 2014;15(9):846‑55.

335. Koning N, van Eijk M, Pouwels W, Brouwer MSM, Voehringer D, Huitinga I, et al. Expression of the inhibitory CD200 receptor is associated with alternative macrophage activation. J Innate Immun. 2010;2(2):195‑200.

336. Endo T, Ogushi F, Kawano T, Sone S. 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. 1998;19(2):300‑7.

337. Buenestado A, Grassin-Delyle S, Guitard F, Naline E, Faisy C, Israël-Biet D, et al. Roflumilast inhibits the release of chemokines and TNF-α from human lung macrophages stimulated with lipopolysaccharide. Br J Pharmacol. 2012;165(6):1877‑90.

338. Takayama K, García-Cardena G, Sukhova GK, Comander J, Gimbrone MA, Libby P. Prostaglandin E2 suppresses chemokine production in human macrophages through the EP4 receptor. J Biol Chem. 2002;277(46):44147‑54.

339. Serezani CH, Chung J, Ballinger MN, Moore BB, Aronoff DM, Peters-Golden M. Prostaglandin E2 suppresses bacterial killing in alveolar macrophages by inhibiting NADPH oxidase. Am J Respir Cell Mol Biol. 2007;37(5):562‑70.

340. Dalli J, Serhan CN. Specific lipid mediator signatures of human phagocytes: microparticles stimulate macrophage efferocytosis and pro-resolving mediators. Blood. t 2012;120(15):e60-72.

341. Abrial C, Grassin-Delyle S, Salvator H, Brollo M, Naline E, Devillier P. 15-Lipoxygenases regulate the production of chemokines in human lung macrophages. Br J Pharmacol. 2015;172(17):4319‑30.

342. Levy BD, Clish CB, Schmidt B, Gronert K, Serhan CN. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. Nat Immunol. 2001;2(7):612‑9.

343. Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. J Pathol. 2013;229(2):176‑85.

344. Das A, Sinha M, Datta S, Abas M, Chaffee S, Sen CK, et al. Monocyte and macrophage plasticity in tissue repair and regeneration. Am J Pathol. 2015;185(10):2596‑606.

345. Porcheray F, Viaud S, Rimaniol A-C, Léone C, Samah B, Dereuddre-Bosquet N, et al. Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. Clin Exp Immunol. 2005;142(3):481‑9.

346. Xu W, Zhao X, Daha MR, van Kooten C. Reversible differentiation of pro- and anti-inflammatory macrophages. Mol Immunol. 2013;53(3):179‑86.

347. Das A, Ganesh K, Khanna S, Sen CK, Roy S. Engulfment of apoptotic cells by macrophages: a role of microRNA-21 in the resolution of wound inflammation. J Immunol Baltim Md 1950. 2014;192(3):1120‑9.

348. Khanna S, Biswas S, Shang Y, Collard E, Azad A, Kauh C, et al. Macrophage dysfunction impairs resolution of inflammation in the wounds of diabetic mice. PloS One. 2010;5(3):e9539.

349. Mège J-L, Mehraj V, Capo C. Macrophage polarization and bacterial infections. Curr Opin Infect Dis. 2011;24(3):230‑4.

350. Patel U, Rajasingh S, Samanta S, Cao T, Dawn B, Rajasingh J. Macrophage polarization in response to epigenetic modifiers during infection and inflammation. Drug Discov Today. 2017;22(1):186‑93.

351. Marino S, Cilfone NA, Mattila JT, Linderman JJ, Flynn JL, Kirschner DE. Macrophage polarization drives granuloma outcome during Mycobacterium tuberculosis infection. Infect Immun. 2015;83(1):324‑38.

352. Huang Z, Luo Q, Guo Y, Chen J, Xiong G, Peng Y, et al. Mycobacterium tuberculosis-Induced Polarization of Human Macrophage Orchestrates the Formation and Development of Tuberculous Granulomas In Vitro. PloS One. 2015;10(6):e0129744.

353. Burdo TH, Walker J, Williams KC. Macrophage Polarization in AIDS: Dynamic Interface between Anti-Viral and Anti-Inflammatory Macrophages during Acute and Chronic Infection. J Clin Cell Immunol. 2015;6(3).

354. Cassol E, Cassetta L, Alfano M, Poli G. Macrophage polarization and HIV-1 infection. J Leukoc Biol. avr 2010;87(4):599‑608.

355. Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. Annu Rev Immunol. 2009;27:451‑83.

356. Nair MG, Herbert DR. Immune polarization by hookworms: taking cues from T helper type 2, type 2 innate lymphoid cells and alternatively activated macrophages. Immunology. 2016;148(2):115‑24.

357. Moore KJ, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. Cell. 2011;145(3):341‑55.

358. Kadl A, Meher AK, Sharma PR, Lee MY, Doran AC, Johnstone SR, et al. Identification of a novel macrophage phenotype that develops in response to atherogenic phospholipids via Nrf2. Circ Res. 2010;107(6):737‑46.

359. Tabas I, Bornfeldt KE. Macrophage Phenotype and Function in Different Stages of Atherosclerosis. Circ Res. 2016;118(4):653‑67.

360. Chinetti-Gbaguidi G, Colin S, Staels B. Macrophage subsets in atherosclerosis. Nat Rev Cardiol. 2015;12(1):10‑7.

361. Belgiovine C, D'Incalci M, Allavena P, Frapolli R. Tumor-associated macrophages and anti-tumor therapies: complex links. Cell Mol Life Sci CMLS. 2016;73(13):2411‑24.

362. Chittezhath M, Dhillon MK, Lim JY, Laoui D, Shalova IN, Teo YL, et al. Molecular profiling reveals a tumor-promoting phenotype of monocytes and macrophages in human cancer progression. Immunity. 2014;41(5):815‑29.

363. Ruffell B, Affara NI, Coussens LM. Differential macrophage programming in the tumor microenvironment. Trends Immunol. 2012;33(3):119‑26.

364. Wenes M, Shang M, Di Matteo M, Goveia J, Martín-Pérez R, Serneels J, et al. Macrophage Metabolism Controls Tumor Blood Vessel Morphogenesis and Metastasis. Cell Metab. 2016;24(5):701‑15.

365. Chen P, Bonaldo P. Role of macrophage polarization in tumor angiogenesis and vessel normalization: implications for new anticancer therapies. Int Rev Cell Mol Biol. 2013;301:1‑35.

366. Squadrito ML, De Palma M. Macrophage regulation of tumor angiogenesis: implications for cancer therapy. Mol Aspects Med. 2011;32(2):123‑45.

367. Giroux Leprieur E, Dumenil C, Julie C, Giraud V, Dumoulin J, Labrune S, et al. Immunotherapy revolutionises non-small-cell lung cancer therapy: Results, perspectives and new challenges. Eur J Cancer Oxf Engl 1990. 2017;78:16‑23.

368. Mitchem JB, Brennan DJ, Knolhoff BL, Belt BA, Zhu Y, Sanford DE, et al. Targeting tumor-infiltrating macrophages decreases tumor-initiating cells, relieves immunosuppression, and improves chemotherapeutic responses. Cancer Res. 2013;73(3):1128‑41.

369. Panni RZ, Linehan DC, DeNardo DG. Targeting tumor-infiltrating macrophages to combat cancer. Immunotherapy. 2013;5(10):1075‑87.

370. Lumeng CN, DelProposto JB, Westcott DJ, Saltiel AR. Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes. Diabetes. 2008;57(12):3239‑46.

371. Bouhlel MA, Derudas B, Rigamonti E, Dièvart R, Brozek J, Haulon S, et al. PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. Cell Metab. 2007;6(2):137‑43.

372. Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, Naaz A, Wong J, Nayer A, et al. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. Nat Med. 2009;15(8):930‑9.

373. Wu D, Molofsky AB, Liang H-E, Ricardo-Gonzalez RR, Jouihan HA, Bando JK, et al. Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. Science. 2011;332(6026):243‑7.

374. Molofsky AB, Nussbaum JC, Liang H-E, Van Dyken SJ, Cheng LE, Mohapatra A, et al. Innate lymphoid type 2 cells sustain visceral adipose tissue eosinophils and alternatively activated macrophages. J Exp Med. 2013;210(3):535‑49.

375. Vasanthakumar A, Moro K, Xin A, Liao Y, Gloury R, Kawamoto S, et al. The transcriptional regulators IRF4, BATF and IL-33 orchestrate development and maintenance of adipose tissue-resident regulatory T cells. Nat Immunol. 2015;16(3):276‑85.

376. Miller AM, Asquith DL, Hueber AJ, Anderson LA, Holmes WM, McKenzie AN, et al. Interleukin-33 induces protective effects in adipose tissue inflammation during obesity in mice. Circ Res. 2010;107(5):650‑8.

377. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. J Clin Invest. 2003;112(12):1796‑808.

378. Nguyen MTA, Favelyukis S, Nguyen A-K, Reichart D, Scott PA, Jenn A, et al. A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. J Biol Chem. 2007;282(48):35279‑92.

379. Zeyda M, Gollinger K, Kriehuber E, Kiefer FW, Neuhofer A, Stulnig TM. Newly identified adipose tissue macrophage populations in obesity with distinct chemokine and chemokine receptor expression. Int J Obes 2005. 2010;34(12):1684‑94.

380. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. J Clin Invest. 2003;112(12):1821‑30.

381. Morris DL, Singer K, Lumeng CN. Adipose tissue macrophages: phenotypic plasticity and diversity in lean and obese states. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2011;14(4):341‑6.

382. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. J Clin Invest. 2007;117(1):175‑84.

383. Clément K, Viguerie N, Poitou C, Carette C, Pelloux V, Curat CA, et al. Weight loss regulates inflammation-related genes in white adipose tissue of obese subjects. FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol. 2004;18(14):1657‑69.

384. Viguerie N, Poitou C, Cancello R, Stich V, Clément K, Langin D. Transcriptomics applied to obesity and caloric restriction. Biochimie. 2005;87(1):117‑23.

385. Bastard JP, Jardel C, Delattre J, Hainque B, Bruckert E, Oberlin F. Evidence for a link between adipose tissue interleukin-6 content and serum C-reactive protein concentrations in obese subjects. Circulation. 1999;99(16):2221‑2.

386. Choi J, Joseph L, Pilote L. Obesity and C-reactive protein in various populations: a systematic review and meta-analysis. Obes Rev Off J Int Assoc Study Obes. 2013;14(3):232‑44.

387. Park HS, Park JY, Yu R. Relationship of obesity and visceral adiposity with serum concentrations of CRP, TNF-alpha and IL-6. Diabetes Res Clin Pract. juill 2005;69(1):29‑35.

388. Han JM, Levings MK. Immune regulation in obesity-associated adipose inflammation. J Immunol Baltim Md 1950. 2013;191(2):527‑32.

389. Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. J Clin Invest. 2006;116(11):3015‑25.

390. Lee JY, Zhao L, Youn HS, Weatherill AR, Tapping R, Feng L, et al. Saturated fatty acid activates but polyunsaturated fatty acid inhibits Toll-like receptor 2 dimerized with Toll-like receptor 6 or 1. J Biol Chem. 2004;279(17):16971‑9.

391. Wen H, Gris D, Lei Y, Jha S, Zhang L, Huang MT-H, et al. Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. Nat Immunol. 2011;12(5):408‑15.

392. Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. J Lipid Res. 2005;46(11):2347‑55.

393. Lee YS, Kim J, Osborne O, Oh DY, Sasik R, Schenk S, et al. Increased adipocyte O2 consumption triggers HIF-1α, causing inflammation and insulin resistance in obesity. Cell. 2014;157(6):1339‑52.

394. Sun K, Kusminski CM, Scherer PE. Adipose tissue remodeling and obesity. J Clin Invest. 2011;121(6):2094‑101.

395. Cho KW, Morris DL, DelProposto JL, Geletka L, Zamarron B, Martinez-Santibanez G, et al. An MHC II-dependent activation loop between adipose tissue macrophages and CD4+ T cells controls obesity-induced inflammation. Cell Rep. 2014;9(2):605‑17.

396. Morris DL, Cho KW, Delproposto JL, Oatmen KE, Geletka LM, Martinez-Santibanez G, et al. Adipose tissue macrophages function as antigen-presenting cells and regulate adipose tissue CD4+ T cells in mice. Diabetes. 2013;62(8):2762‑72.

397. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. Diabetes. 2007;56(7):1761‑72.

398. Ghanim H, Abuaysheh S, Sia CL, Korzeniewski K, Chaudhuri A, Fernandez-Real JM, et al. Increase in plasma endotoxin concentrations and the expression of Toll-like receptors and suppressor of cytokine signaling-3 in mononuclear cells after a high-fat, high-carbohydrate meal: implications for insulin resistance. Diabetes Care. 2009;32(12):2281–7.

399. Amar J, Chabo C, Waget A, Klopp P, Vachoux C, Bermúdez-Humarán LG, et al. Intestinal mucosal adherence and translocation of commensal bacteria at the early onset of type 2 diabetes: molecular mechanisms and probiotic treatment. EMBO Mol Med. 2011;3(9):559–72.

400. Parks BW, Nam E, Org E, Kostem E, Norheim F, Hui ST, et al. Genetic control of obesity and gut microbiota composition in response to high-fat, high-sucrose diet in mice. Cell Metab. 2013;17(1):141–52.

401. Maynard CL, Elson CO, Hatton RD, Weaver CT. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. Nature. 2012;489(7415):231–41.

402. Kiguchi N, Maeda T, Kobayashi Y, Fukazawa Y, Kishioka S. Leptin enhances CC-chemokine ligand expression in cultured murine macrophage. Biochem Biophys Res Commun. 2009;384(3):311–5.

403. Raso GM, Pacilio M, Esposito E, Coppola A, Di Carlo R, Meli R. Leptin potentiates IFN-gamma-induced expression of nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase-2 in murine macrophage J774A.1. Br J Pharmacol. 2002;137(6):799–804.

404. Zarkesh-Esfahani H, Pockley G, Metcalfe RA, Bidlingmaier M, Wu Z, Ajami A, et al. High-dose leptin activates human leukocytes via receptor expression on monocytes. J Immunol Baltim Md 1950. 2001;167(8):4593–9.

405. Vaughan T, Li L. Molecular mechanism underlying the inflammatory complication of leptin in macrophages. Mol Immunol. 2010;47(15):2515–8.

406. Acedo SC, Gambero S, Cunha FGP, Lorand-Metze I, Gambero A. Participation of leptin in the determination of the macrophage phenotype: an additional role in adipocyte and macrophage crosstalk. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2013;49(6):473–8.

407. Ohashi K, Parker JL, Ouchi N, Higuchi A, Vita JA, Gokce N, et al. Adiponectin promotes macrophage polarization toward an anti-inflammatory phenotype. J Biol Chem. 2010;285(9):6153–60.

408. Wulster-Radcliffe MC, Ajuwon KM, Wang J, Christian JA, Spurlock ME. Adiponectin differentially regulates cytokines in porcine macrophages. Biochem Biophys Res Commun. 2004;316(3):924‑9.

409. Lovren F, Pan Y, Quan A, Szmitko PE, Singh KK, Shukla PC, et al. Adiponectin primes human monocytes into alternative anti-inflammatory M2 macrophages. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2010;299(3):H656-663.

410. Yokota T, Oritani K, Takahashi I, Ishikawa J, Matsuyama A, Ouchi N, et al. Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. Blood. 2000;96(5):1723‑32.

411. Okamoto Y, Folco EJ, Minami M, Wara AK, Feinberg MW, Sukhova GK, et al. Adiponectin inhibits the production of CXC receptor 3 chemokine ligands in macrophages and reduces T-lymphocyte recruitment in atherogenesis. Circ Res. 2008;102(2):218‑25.

412. Cheng X, Folco EJ, Shimizu K, Libby P. Adiponectin induces pro-inflammatory programs in human macrophages and CD4+ T cells. J Biol Chem. 2012;287(44):36896‑904.

413. van Stijn CMW, Kim J, Lusis AJ, Barish GD, Tangirala RK. Macrophage polarization phenotype regulates adiponectin receptor expression and adiponectin anti-inflammatory response. FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol. 2015;29(2):636‑49.

414. Moschen AR, Kaser A, Enrich B, Mosheimer B, Theurl M, Niederegger H, et al. Visfatin, an adipocytokine with proinflammatory and immunomodulating properties. J Immunol Baltim Md 1950. 2007;178(3):1748‑58.

415. Audrito V, Serra S, Brusa D, Mazzola F, Arruga F, Vaisitti T, et al. Extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) promotes M2 macrophage polarization in chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2015;125(1):111‑23.

416. Wu X-T, Yang Z, Ansari AR, Xiao K, Pang X-X, Luo Y, et al. Visfatin regulates the production of lipopolysaccharide-induced inflammatory cytokines through p38 signaling in murine macrophages. Microb Pathog. 2018;117:55‑9.

417. Cash JL, Hart R, Russ A, Dixon JPC, Colledge WH, Doran J, et al. Synthetic chemerin-derived peptides suppress inflammation through ChemR23. J Exp Med. 2008;205(4):767‑75.

418. Bondue B, Vosters O, de Nadai P, Glineur S, De Henau O, Luangsay S, et al. ChemR23 dampens lung inflammation and enhances anti-viral immunity in a mouse model of acute viral pneumonia. PLoS Pathog. 2011;7(11):e1002358.

419. Luangsay S, Wittamer V, Bondue B, De Henau O, Rouger L, Brait M, et al. Mouse ChemR23 is expressed in dendritic cell subsets and macrophages, and mediates an anti-inflammatory activity of chemerin in a lung disease model. J Immunol Baltim Md 1950. 2009;183(10):6489‑99.

420. Bondue B, De Henau O, Luangsay S, Devosse T, de Nadaï P, Springael J-Y, et al. The chemerin/ChemR23 system does not affect the pro-inflammatory response of mouse and human macrophages ex vivo. PloS One. 2012;7(6):e40043.

421. Buenestado A, Chaumais M-C, Grassin-Delyle S, Risse P-A, Naline E, Longchampt E, et al. Roflumilast inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-α and chemokine production by human lung parenchyma. PloS One. 2013;8(9):e74640.

422. Jeyaseelan S, Manzer R, Young SK, Yamamoto M, Akira S, Mason RJ, et al. 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 Baltim Md 1950. 2005;175(11):7484‑95.

423. Buenestado A, Grassin-Delyle S, Guitard F, Naline E, Faisy C, Israël-Biet D, et al. Roflumilast inhibits the release of chemokines and TNF-α from human lung macrophages stimulated with lipopolysaccharide. Br J Pharmacol. 2012;165(6):1877‑90.

424. Buenestado A, Grassin Delyle S, Arnould I, Besnard F, Naline E, Blouquit-Laye S, et al. The role of adenosine receptors in regulating production of tumour necrosis factor-alpha and chemokines by human lung macrophages. Br J Pharmacol. mars 2010;159(6):1304‑11.

425. Kwong JC, Campitelli MA, Rosella LC. Obesity and respiratory hospitalizations during influenza seasons in Ontario, Canada: a cohort study. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2011;53(5):413‑21.

426. Morgan OW, Bramley A, Fowlkes A, Freedman DS, Taylor TH, Gargiullo P, et al. Morbid obesity as a risk factor for hospitalization and death due to 2009 pandemic influenza A(H1N1) disease. PloS One. 2010;5(3):e9694.

427. Martín V, Castilla J, Godoy P, Delgado-Rodríguez M, Soldevila N, Fernández-Villa T, et al. High Body Mass Index as a Risk Factor for Hospitalization Due to Influenza: A Case-Control Study. Arch Bronconeumol. 2016;52(6):299‑307.

428. Sun Y, Wang Q, Yang G, Lin C, Zhang Y, Yang P. Weight and prognosis for influenza A(H1N1)pdm09 infection during the pandemic period between 2009 and 2011: a systematic review of observational studies with meta-analysis. Infect Dis Lond Engl. 2016;48(11‑12):813‑22.

429. Braun ES, Crawford FW, Desai MM, Meek J, Kirley PD, Miller L, et al. Obesity not associated with severity among hospitalized adults with seasonal influenza virus infection. Infection. 2015;43(5):569‑75.

430. Segaloff HE, Evans R, Arshad S, Zervos MJ, Archer C, Kaye KS, et al. The impact of obesity and timely antiviral administration on severe influenza outcomes among hospitalized adults. J Med Virol. 2018;90(2):212‑8.

431. Vaccination antigrippale chez les femmes enceintes et les personnes très obèses : pas systématique [Internet]. [cité 2 oct 2018]. Disponible sur: http://www.prescrire.org/fr/3/31/48114/0/NewsDetails.aspx

432. Neidich SD, Green WD, Rebeles J, Karlsson EA, Schultz-Cherry S, Noah TL, et al. Increased risk of influenza among vaccinated adults who are obese. Int J Obes 2005. 2017;41(9):1324‑30.

433. Karlsson EA, Hertz T, Johnson C, Mehle A, Krammer F, Schultz-Cherry S. Obesity Outweighs Protection Conferred by Adjuvanted Influenza Vaccination. mBio. 02 2016;7(4).

434. Green WD, Beck MA. Obesity Impairs the Adaptive Immune Response to Influenza Virus. Ann Am Thorac Soc. 2017;14(Supplement_5):S406‑9.

435. Frasca D, Ferracci F, Diaz A, Romero M, Lechner S, Blomberg BB. Obesity decreases B cell responses in young and elderly individuals. Obes Silver Spring Md. 2016;24(3):615‑25.

436. Luo Y, Liu M. Adiponectin: a versatile player of innate immunity. J Mol Cell Biol. 2016;8(2):120‑8.

437. Vangeti S, Yu M, Smed-Sörensen A. Respiratory Mononuclear Phagocytes in Human Influenza A Virus Infection: Their Role in Immune Protection and As Targets of the Virus. Front Immunol. 2018;9:1521.

438. Travanty E, Zhou B, Zhang H, Di YP, Alcorn JF, Wentworth DE, et al. Differential Susceptibilities of Human Lung Primary Cells to H1N1 Influenza Viruses. J Virol. 2015;89(23):11935‑44.

439. Maccioni L, Weber S, Elgizouli M, Stoehlker A-S, Geist I, Peter H-H, et al. Obesity and risk of respiratory tract infections: results of an infection-diary based cohort study. BMC Public Health. 2018;18(1):271.

440. Harpsøe MC, Nielsen NM, Friis-Møller N, Andersson M, Wohlfahrt J, Linneberg A, et al. Body Mass Index and Risk of Infections Among Women in the Danish National Birth Cohort. Am J Epidemiol. 2016;183(11):1008‑17.

441. Miller M, Cho JY, Pham A, Ramsdell J, Broide DH. Adiponectin and functional adiponectin receptor 1 are expressed by airway epithelial cells in chronic obstructive pulmonary disease. J Immunol Baltim Md 1950. 2009;182(1):684‑91.

442. Liu P, Li H, Cepeda J, Zhang LQ, Cui X, Garcia JGN, et al. Critical role of PBEF expression in pulmonary cell inflammation and permeability. Cell Biol Int. 2009;33(1):19‑30.

443. Nakanishi K, Takeda Y, Tetsumoto S, Iwasaki T, Tsujino K, Kuhara H, et al. Involvement of endothelial apoptosis underlying chronic obstructive pulmonary disease-like phenotype in adiponectin-null mice: implications for therapy. Am J Respir Crit Care Med. 2011;183(9):1164‑75.

444. Huang K, Rabold R, Abston E, Schofield B, Misra V, Galdzicka E, et al. Effects of leptin deficiency on postnatal lung development in mice. J Appl Physiol Bethesda Md 1985. 2008;105(1):249‑59.

445. van Stijn CMW, Kim J, Lusis AJ, Barish GD, Tangirala RK. Macrophage polarization phenotype regulates adiponectin receptor expression and adiponectin anti-inflammatory response. FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol. 2015;29(2):636‑49.

446. Peake PW, Kriketos AD, Campbell LV, Shen Y, Charlesworth JA. The metabolism of isoforms of human adiponectin: studies in human subjects and in experimental animals. Eur J Endocrinol. 2005;153(3):409‑17.

447. Pajvani UB, Du X, Combs TP, Berg AH, Rajala MW, Schulthess T, et al. Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications fpr metabolic regulation and bioactivity. J Biol Chem. 2003;278(11):9073‑85.

448. Waki H, Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Uchida S, Kita S, et al. Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin. J Biol Chem. 2003;278(41):40352‑63.

449. Hariri BM, Cohen NA. New insights into upper airway innate immunity. Am J Rhinol Allergy. 2016;30(5):319‑23.

450. Travis SM, Conway BA, Zabner J, Smith JJ, Anderson NN, Singh PK, et al. Activity of abundant antimicrobials of the human airway. Am J Respir Cell Mol Biol. 1999;20(5):872‑9.

451. Ritter M, Mennerich D, Weith A, Seither P. Characterization of Toll-like receptors in primary lung epithelial cells: strong impact of the TLR3 ligand poly(I:C) on the regulation of

Toll-like receptors, adaptor proteins and inflammatory response. J Inflamm Lond Engl. 2005;2:16.
452. Royer P-J, Henrio K, Pain M, Loy J, Roux A, Tissot A, et al. TLR3 promotes MMP-9 production in primary human airway epithelial cells through Wnt/β-catenin signaling. Respir Res.2017;18(1):208

Rôle des adipokines dans la régulation de l'activation des macrophages pulmonaires humains

Mots clés : Macrophages pulmonaires /Obésité /Adipokines / Adiponectine / Leptine

Résumé : L'obésité favorise l'apparition de maladies bronchiques chroniques (asthme, BPCO) et complique leur prise en charge, induit des troubles respiratoires du sommeil et augmente la susceptibilité aux infections respiratoires. Le tissu adipocytaire est source de production de médiateurs dont font partie les adipokines. Parmi celles-ci, l'adiponectine (APN) est une protéine de 30kDa qui peut s'associer en multimères de plus ou moins haut poids moléculaire. Ses taux circulants sont élevés mais sa concentration sérique diminue avec le gain de poids. L'adiponectine est impliquée dans les phénomènes d'immunorégulation et dans le développement pulmonaire. Mais le rôle pro ou anti-inflammatoire de l'APN est toujours un sujet à débat. L'association entre les taux sériques d'APN et la survenue de maladies bronchiques n'est pas clairement démontrée chez l'homme. Nous nous sommes intéressés au rôle des adipokines au sein du système respiratoire. Nous avons plus particulièrement étudié l'effet de l'APN sur la production de cytokines par des macrophages pulmonaires et cellules épithéliales bronchiques. Nous disposons de pièces opératoires pulmonaires de patients opérés pour un cancer bronchique, à partir desquelles nous réalisons des cultures primaires d'explants de parenchyme, de macrophages pulmonaires ou de cellules épithéliales bronchiques et nous préparons des anneaux bronchiques pour étude en cuves à organe isolé..

Nous avons montré qu'il existait une production d'APN *in situ* par du tissu pulmonaire humain et que cette production était corrélée au poids du patient. Nous avons vérifié que les récepteurs à l'APN (AdipoR1 et AdipR2) étaient tous les deux exprimés par des macrophages pulmonaires, des explants de bronches et des cellules épithéliales bronchiques.

Nous avons soumis les macrophages pulmonaires humains à un traitement par de l'APN (3-10-30µg/ml) avant de les stimuler par du LPS (10 ng/ml ou Poly I:C 10 ng/ml) ou de l'IL-4 (10 ng/ml). Nous avons montré que l'APN diminuait la production des cytokines M1 induites par le LPS et le Poly I:C (IL-6, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL8, TNF-α). tout comme celles des cytokines M2 induites par l'IL-4 (CCL13, CCL18, CCL22). L'adipoRon, agoniste de synthèse des récepteurs de l'adiponectine, a montré les mêmes effets que la protéine recombinante. En comparaison, la leptine à sa plus grande concentration (1000 ng/ml) induisait la production de cytokines de type M1 (IL6, CCL3, CCL4, CCL5, TNFα) par des macrophages non stimulés alors que la visfatine et la chémérine n'avaient aucun effet sur la production de cytokines par les macrophages. Seule l'APN a démontré un effet sur les cellules épithéliales bronchiques, en modulant de façon opposée la production de certaines cytokines : diminution de CXCL1 et CCL2 en situation basale et après stimulation par TNF (50 ng/ml) mais augmentation d'IL6, CCL20 et CXCL8 en situation basale.

Nous avons complété ce travail par des expériences sur la régulation du tonus bronchique par les adipokines, en utilisant des anneaux bronchiques dans des cuves à organes isolées. Ces résultats ont fait l'objet d'un dépôt de brevet européen.

Ces travaux sont les premiers à s'intéresser à l'effet de l'APN et de l'AdipoRon sur un modèle de culture primaire de macrophages et cellules épithéliales bronchiques humains. L'APN est capable de moduler la polarisation de ces cellules. Les adipokines sont essentielles à la compréhension du retentissement pulmonaire de l'obésité.

Role of adipokines in the regulation of human pulmonary macrophage activation

Keywords : Pulmonary Macrophages / Obesity / Adipokines / Adiponectin / Leptin

Abstract: Obesity promotes the development of chronic bronchial diseases (asthma, COPD) and complicates their management, induces sleep breathing disorders and increases susceptibility to respiratory infections. Adipocytea are a source of mediator production including adipokines. Among these, adiponectin (APN) is a 30kDa protein that can associate in multimers of variable molecular weight. It circulates at high level but its serum concentration decreases with weight gain. APN is involved in immunoregulation and pulmonary development. But the pro or anti-inflammatory role of the APN is still a matter for debate. The association between serum levels of APN and the occurrence of bronchial diseases is not clearly demonstrated in humans.

We explored the role of adipokines within the respiratory system. In particular, we studied the effect of the APN on the production of cytokines by pulmonary macrophages and bronchial epithelial cells. We obtained lung specimens from patients operated for carcinoma, from which we carried out primary cultures of parenchymal explants, pulmonary macrophages or bronchial epithelial cells and we also prepared bronchial rings for study in organ bath.

We have revealed an *in situ* production of APN by human lung tissue, which is correlated with patient weight. We have verified that APN receptors (AdipoR1 and AdipR2) were both expressed by pulmonary macrophages, bronchial explants, and bronchial epithelial cells.

We have treated human lung macrophages with APN (3-10-30 µg/ml) before stimulation with LPS (10 ng / ml) or Poly I: C (10 ng/ml) or IL-4 (10 ng/ml).We have shown that the APN decreased the production of M1 cytokines induced by LPS and Poly I: C (IL-6, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL8, TNFα) as well as those of M2 cytokines induced by IL-4 (CCL13, CCL18, CCL22). AdipoRon, a synthetic adiponectin receptor agonist, exhibited the same effects as the recombinant protein.

In comparison, leptin at its highest concentration (1000 ng/ml) induced the production of M1-type cytokines (IL-6, CCL3, CCL4, CCL5, TNF-α) by unstimulated macrophages whereas visfatin and chemerin did not reveal any effect on cytokine production by macrophages.

Only APN demonstrated an effect on bronchial epithelial cells: decreasing the production of CXCL1 and CCL2 at basal state and after stimulationwith TNF (50 ng / ml) but increasing production of IL6, CCL20 and CXCL8 in the basal situation.

We have completed this work by experiments on the regulation of bronchial tone by adipokines, using bronchial rings in isolated organ baths. These results have been the subject of a European patent application. This work is the first looking at the effect of APN and AdipoRon on primary human pulmonary macrophages and bronchial epithelial cells. APN is able to modulate the polarization of these cells. Adipokines are essential for understanding the respiratory burden of obesity.