



HAL
open science

Rôle des monocytes/macrophages dans le processus inflammatoire de l'hypertension artérielle pulmonaire et de la bronchopneumopathie chronique obstructive : effet du facteur de croissance des nerfs et implication de la voie de signalisation JAK/STAT

Yann Verres

► To cite this version:

Yann Verres. Rôle des monocytes/macrophages dans le processus inflammatoire de l'hypertension artérielle pulmonaire et de la bronchopneumopathie chronique obstructive : effet du facteur de croissance des nerfs et implication de la voie de signalisation JAK/STAT. Médecine humaine et pathologie. Université de Rennes, 2021. Français. NNT : 2021REN1B052 . tel-03897567

HAL Id: tel-03897567

<https://theses.hal.science/tel-03897567>

Submitted on 14 Dec 2022

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

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

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES 1

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité : « Physiologie, Physiopathologie, Biologie Systémique Médicale »

Par

Yann VERRES

Rôle des monocytes/macrophages dans le processus inflammatoire de l'hypertension artérielle pulmonaire et de la bronchopneumopathie chronique obstructive

Effet du facteur de croissance des nerfs et implication de la voie de signalisation JAK/STAT

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 13 Décembre 2021

Unité de recherche : UMR 1241 Institut NuMeCan – Nutrition, Métabolismes et Cancer

Rapporteurs avant soutenance :

Pascale REVERDIAU Professeure des Universités, Université de Tours
Jean-Claude LECRON Professeur des Universités, Université de Poitiers

Composition du Jury :

Présidente
Véronique FREUND-MICHEL Professeure des Universités, Université de Bordeaux

Rapporteurs
Pascale REVERDIAU Professeure des Universités, Université de Tours
Jean-Claude LECRON Professeur des Universités, Université de Poitiers

Examineurs
Boris MANOURY Maître de conférences, Université de Paris-Saclay
Tatiana VICTONI Maîtres de conférences, Université de Lyon

Directeur de thèse
Vincent LAGENTE Professeur des Universités, Université de Rennes 1

Co-directeur de thèse
Thomas GICQUEL Maître de conférences, Praticien hospitalier, Université de Rennes 1

« *La science va sans cesse se raturant elle-même. Ratures fécondes.* »

William Shakespeare (1864) de Victor Hugo

REMERCIEMENTS

Un grand merci tout d'abord à mes directeurs de thèse, Vincent Lagente et Thomas Gicquel, de m'avoir fait confiance pour ce projet, de m'avoir guidé pendant ces 3 années. Merci d'avoir, malgré les difficultés rencontrées, toujours cherché des solutions avec moi, pour aller de l'avant. Votre mentalité toujours positive a été précieuse pour moi, surtout en fin de course.

Merci aussi à Tatiana Victoni, de m'avoir accompagné de près pendant mes débuts, de m'avoir apporté du savoir et des conseils précieux pour me lancer sur ce sujet, merci de ton attention, de ta générosité et de ta bonne humeur qui rayonne partout où tu passes.

Merci à Aude Bodin, d'avoir toujours été disponible, ton aide, surtout ces derniers mois, m'a fait gagner un temps d'une valeur inestimable. Tu fais un travail formidable et tu peux prendre encore plus confiance en toi !

Merci à Véronique Freund-Michel, d'avoir coordonné ce projet depuis Bordeaux. Merci du temps que tu m'as accordé pour répondre à mes questions quand j'en avais besoin, merci des remarques toujours très avisées que tu as su apporter et qui ont fait murir mon travail.

Merci à Pascal Loyer et Anne Corlu, de m'avoir donné cette opportunité d'entrer dans ce laboratoire en stage de Master, de m'avoir recommandé pour cette thèse et accompagné jusqu'au bout dans ces démarches.

Merci à Dorian McIlroy, qui dès la Licence a été le premier à me faire confiance pour m'accueillir en laboratoire. Avec toi j'ai pu rapidement apprendre à évoluer en autonomie dans mes expériences.

Merci à toute cette petite famille de doctorants, sans qui la vie au labo et en dehors, n'aurais pas été la même. À Julien et son humour bien à lui, qui a disséminé dans tout le labo des affiches de prévention des BPL. À Kévin qui a su nous rassembler en bas des Lices à chaque fois que l'occasion s'en est présentée. À Yoann et sa gentillesse exemplaire (sauf en attendant le bus). À Elise ma colocataire de bureau tout au long de cette thèse. À Corentin, Clémence, Thomas avec qui le quatuor sportif s'est formé à l'origine, et à Sarah qui a repris le flambeau pour nous motiver à continuer. À Thomas (oui encore un de plus), et ses imitations inégalables. À Kilian, avec qui j'ai formé un duo pendant mon stage et avec qui on a découvert l'invention du test ATP par Léonard de Vinci. Merci à tous d'être comme ça. Vous connaître et passer ces années avec vous a été un plaisir, et j'espère que nous saurons garder contact pour les années à venir.

Merci à Chirine Rafia, grâce à toi j'ai considéré plus sérieusement l'idée de partir de Nantes en direction de Rennes et à Bastien Ouvrard, qui a parlé de moi à la bonne personne, entraînant une chaîne de recommandations arrivant jusqu'à NuMeCan, vous avez joué un rôle dans mon arrivée ici.

Merci à Robin Canac, mon binôme de toujours à la fac de Nantes, tu es un modèle de sérieux et de travail tout en sachant te détendre quand il le faut, je n'aurais certainement pas eu la même réussite si je n'avais pas croisé ta route.

Et pour finir, un grand merci à ma famille, et surtout à mes parents, pour avoir toujours soutenu mes projets et mes envies, de m'avoir apporté le soutien moral dont j'avais besoin dans les périodes difficiles. Vous avez tout mis en place pour que je puisse prendre le meilleur départ possible dans ma vie, et je pense qu'aujourd'hui, le train est sur les bons rails. Je ne saurai pas être assez reconnaissant pour tout ça.

Merci mille fois, je vous aime fort !

LISTE DES ARTICLES ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Articles originaux publiés en premier auteur :

-À soumettre à “Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology” :

Effects of the nerve growth factor NGF and its carrier protein, the bovine serum albumin, on human monocytes (Verres Y, Bodin A, Victoni T, Freund-Michel V, Gicquel T, Lagente V)

-Soumis à “Fundamental & Clinical Pharmacology” :

Dual role of ruxolitinib, modulator of inflammation, a potential therapeutic target in chronic obstructive pulmonary disease (Verres Y, Oliveira da Silva C, Aljebawi B, Bodin A, Barreto E, Lagente V, Victoni T)

Participation à d'autres articles originaux :

-En rédaction :

Differential mucus secretion and inflammatory processes in human airway epithelial cells in an in vitro model of chronic obstructive pulmonary disease (Bodin A; Verres Y; Bellaud P; Casset A; Fautrel A; Gicquel T; Pons F; Lagente V)

-Publié dans “Toxicology In Vitro” : (Hugbart and al. 2020)

Non-oxidative ethanol metabolism in human hepatic cells in vitro: Involvement of uridine diphospho-glucuronosyltransferase 1A9 in ethylglucuronide production (Hugbart C, Verres Y, Le Daré B, Bucher S, Vène E, Bodin A, Lagente V, Fromenty B, Bouvet R, Morel I, Loyer P, Gicquel T)

-Publié dans “Sensors” : (Vlach and al. 2019)

Cytochrome P450 1A1/2, 2B6 and 3A4 HepaRG Cell-Based Biosensors to Monitor Hepatocyte Differentiation, Drug Metabolism and Toxicity (Vlach M, Quesnot N, Dubois-Pot-Schneider H, Ribault C, Verres Y, Petitjean K, Rauch C, Morel F, Robin MA, Corlu A, Loyer P)

Communications scientifiques en congrès :

-Communication vidéo aux Journées Scientifiques de l'Université Bretagne-Loire (2020) :

Can monocytes exposed to nerve growth factor really initiate inflammatory and remodeling response ? (Verres Y, Bellamri N, Chevret S, Victoni T, Coignard M, Bodin A, Freund-Michel V, Gicquel T, Lagente V)

-Communication affichée aux Journées Recherche du campus Villejean (2020) :

Human mononuclear cells response to nerve growth factor : Induction of inflammatory, chemotactic and remodeling signals (Verres Y, Chevret S, Victoni T, Coignard M, Bodin A, Freund-Michel V, Gicquel T, Lagente V)

-Communication affichée aux Journées de Recherche Respiratoire à Bruxelles (2019) :
Impact of the nerve growth factor on human monocytes and macrophages, exploration of inflammatory signal, chemotactic activity and tissue remodeling (Verres Y, Victoni T, Coignard M, Bodin A, Freund-Michel V, Gicquel T, Lagente V)

Autres communications scientifiques :

-Atelier de vulgarisation scientifique à la Fête de la Science, Espace des sciences de Rennes (2019 et 2020) :

Faire une extraction d'ADN avec des produits ménagers. Explications autour du rôle de l'ADN et le fonctionnement d'un test PCR (Association de doctorants « LUCA »)

-Présentation de vulgarisation scientifique « Doct'Oral » (2020) :

Hypertension artérielle pulmonaire, des poumons à bout de nerf ? (Yann Verres, Association de doctorants « LUCA »)

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	15
Partie I : Les monocytes et les macrophages	17
A. Généralités	17
B. Ontogénie	17
1. Formation des macrophages	17
2. Localisations possibles	18
3. Les macrophages pulmonaires	19
a) Généralités.....	19
b) Formation et entretien de la population	19
4. Polarisation.....	20
C. Rôle des monocytes et des macrophages pulmonaires.....	22
Partie II : Les pathologies pulmonaires impliquant les monocytes et les macrophages.....	26
A. Broncho-pneumopathie chronique obstructive	26
1. Définition	26
2. Étiologie	26
3. Épidémiologie	27
4. Physiopathologie	28
5. Diagnostic et pronostic.....	33
a) Traitements actuels.....	34
b) Perspectives de traitement.....	37
7. Voie de signalisation JAK/STAT comme nouvelle cible thérapeutique ?.....	38
a) La voie de signalisation JAK/STAT	38
b) Implications de JAK/STAT dans la BPCO.....	39
A. Hypertension pulmonaire	42
1. Définition	42
2. Étiologie	42
3.Épidémiologie	44
4. Physiopathologie	45
6. Traitements et limites	54
a) Traitements actuels.....	54
b) Perspectives de traitement.....	55
7. Le NGF comme nouvelle cible thérapeutique ?.....	57
a) Le facteur de croissance des nerfs (NGF)	57

b) Le NGF dans l'hypertension pulmonaire.....	59
TRAVAUX RÉALISÉS.....	63
CHAPITRE I : Implications de la voie de signalisation JAK/STAT dans la réponse des macrophages à la fumée de cigarette.....	65
A. Contexte et objectifs.....	65
B. Résumé des principaux résultats.....	90
C. Discussion.....	90
D. Conclusion.....	93
CHAPITRE II : Effets du NGF et de sa protéine de transport, la BSA, sur les monocytes humains.....	94
A. Contexte et objectifs.....	94
B. Résultats.....	95
1. Le potentiel de différenciation du NGF sur les monocytes humains.....	95
a) Différences de réponse au NGF entre monocytes et macrophages.....	95
b) Différenciation via l'exposition au NGF.....	96
c) Expression du marqueur de différenciation macrophagique CD68 dans les différentes conditions de différenciation.....	98
d) Comparaison des profils de réponse GM-CSF, LPS et NGF.....	99
2. Inflammation, chimiotactisme et remodelage des monocytes exposés au NGF ...	100
a) L'action du NGF sur l'expression et la production de cytokines pro- inflammatoires.....	100
b) L'action du NGF sur la balance MMP/TIMP.....	101
c) Cinétique de production des cytokines.....	102
d) Chimioquinas libérées après l'exposition au NGF.....	103
e) Blocage des effets du NGF par ciblage du NGF, de TrkA ou de p75 ^{NTR}	104
f) Changements d'expression des récepteurs TrkA et p75 ^{NTR}	105
g) La réponse liée à la protéine de transport : Albumine du Sérum Bovin.....	106
C. Résumé des principaux résultats.....	128
D. Discussion.....	128
E. Conclusion.....	137
PERSPECTIVES.....	139
MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	145
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	157
ANNEXES.....	191

LISTE DES ABBREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique	ERO : Espèce réactive de l'oxygène
ADP : Adénosine diphosphate	FGF : Fibroblast growth factor
ARN : Acide ribonucléique	FITC : Fluorescein isothiocyanate
AMP : Adénosine monophosphate	GM-CSF : Granulocyte-macrophage colony stimulating factor
ATP : Adénosine triphosphate	GMP : Guanosine monophosphate
BDNF : Brain derived neurotrophic factor	GMPc : Guanosine monophosphate cyclique
BMPR : Bone morphogenic protein receptor	GTP : Guanosine triphosphate
BPCO : Bronchopneumopathie chronique obstructive	GOLD : Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease
BSA : Bovine serum albumin	GRO : Growth regulated oncogene
CCL : C-C motif ligand	HDAC : Histone deacetylase
CCR : C-C motif receptor	HIF : Hypoxia induced factor
CEAP : Cellule endothéliale de l'artère pulmonaire	HLA : Human leukocyte antigen
CMLAP : Cellule musculaire lisse de l'artère pulmonaire	HMGB : High mobility group box
CV : Capacité vitale	HTP : Hypertension pulmonaire
CVF : Capacité vital forcée	HTAP : Hypertension artérielle pulmonaire
CD : Cluster de différenciation	ICS : Inhaled corticosteroids
CSE : Cigarette smoke extract	Ig : Immunoglobuline
CXCL : C-X-C motif ligand	IFN : Interféron
CXCR : C-X-C motif receptor	IL : Interleukine
DAMP : Danger associated molecular pattern	IRF : Interferon regulatory factor
DMSO : Dimethyl sulfoxide	JAK : Janus kinase
EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid	LABA : Long acting beta agonist
ELISA : Enzyme linked immunosorbent assay	LAMA : Long acting muscarinic antagonist
EndoMT : Endothelial-Mesenchymal transition	LBA : Lavage broncho-alvéolaire

LPS : Lipopolysaccharide

MAPK : Mitogen activated protein kinase

MABA : Muscarinic antagonists and beta agonists

MCP : Monocyte chemoattractant protein

MMP : Métalloprotéases

NES : Nuclear export sequence

NF-κB : Nuclear factor kappa B

NGF : Nerve growth factor

NIH : National institutes of health

NLR : Nod-like receptor

NO : Nitric Oxide

Nrf : Nuclear erythroid-2 related factor 2

p75 NTR : p75 neurotrophin receptor

PAMP : Pathogen associated molecular pattern

PAPm : Pression artérielle pulmonaire moyenne

PBS : Phosphate buffered saline

PBMC : Peripheral blood mononuclear cells

PDGF : Platelet-derived growth factor

PDE : Phosphodiesterase

PGE2 : Prostaglandine E2

PI3K : Phosphoinositide 3-kinase

PKC : Protein kinase C

PLC : Phospholipase C

PPAR : Peroxisome proliferator-activated receptor

PRR : Pattern recognition receptor

RAGE : Receptor for advanced glycation products

REVEAL : Registry to Evaluate Early and Long-Term PAH Disease Management

RIPA : Radioimmunoprecipitation assay buffer

RPMI : Roswell Park Memorial Institute

RT-qPCR : Real-time quantitative polymerase chained reaction

TBS : Tris-buffered saline

TBST : TBS-Tween

TGF : Tumor growth factor

Th : T helper

TLR : Toll-like receptor

TNF : Tumor necrosis factor

TIMP : Tissue inhibitor of MMP

Trk : Tropomyosin related kinase

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate SOCS

SOD : Super oxide dismutase

STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription

SVF : Sérum de Veau Fœtal

UV : Ultraviolet

VEGF : Vascular endothelial growth factor

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

LISTE DES FIGURES*

Figure 1 : Origine des populations de macrophages résidents et de macrophages transitoires

Figure 2 : Polarisation des macrophages

Figure 3 : Les fonctions des macrophages au niveau pulmonaire

Figure 4 : Obstruction des voies respiratoires dans la BPCO

Figure 5 : Les effets de la fumée de cigarette sur les macrophages

Figure 6 : Survie sur 5 ans des patients présentant une BPCO

Figure 7 : La voie de signalisation JAK/STAT

Figure 8 : Distribution des patients avec une HTAP, selon l'âge et le sexe

Figure 9 : Comparaison d'une artère pulmonaire saine et d'une artère pulmonaire dans l'HTAP

Figure 10 : Changements amenant à la contractilité augmentée des artères pulmonaires

Figure 11 : Epaissement des artères dans l'HTP due à la prolifération cellulaire accrue

Figure 12 : Les cellules immunitaire dans les artères pulmonaires durant l'HTP

Figure 13 : Survie jusqu'à 5 ans en fonction du nombre de la gravité de l'atteinte

Figure 14 : Survie des patients dans les différentes cohortes de patient HTAP

Figure 15 : Arbre décisionnel pour les traitements de l'HTAP

Figure 16 : Les neurotrophines, leurs récepteurs et les voies de signalisation impliquées

Figure 17 : Criblage des cytokines produites par les monocytes et les macrophages humains en réponse au NGF

Figure 18 : Différenciation des monocytes exposés au NGF sur une longue durée

Figure 19 : Expression du marqueur CD68 après 7 jours de différenciation

Figure 20 : Criblage des cytokines produites par les monocytes en réponse à un stimulus inflammatoire ou à un facteur de différenciation

Figure 21 : Réponse des monocytes humains à différentes concentrations de NGF sur les expressions de gènes et la libération de cytokines pro-inflammatoires

Figure 22 : Réponse des monocytes humains à différentes concentrations de NGF sur la balance MMP/TIMP au niveau génique et protéique

Figure 23 : Cinétique de libération des cytokines par les monocytes humains pendant l'exposition au NGF

Figure 24 : Chimioquinas libérées par les monocytes humains exposés au NGF

Figure 25 : Blocage du NGF ou de ses récepteurs avec des anticorps et inhibiteurs

Figure 26 : L'expression du NGF et de ses récepteurs chez les monocytes exposés au NGF

Figure 27 : Blocage du NGF ou de ses récepteurs avec des anticorps et inhibiteurs, test de toutes les conditions contrôles

Figure 28 : Paramètres des cycles d'amplification de RT-qPCR

*Tout ou partie de certaines figures présentées dans ce manuscrit ont été réalisées à l'aide des supports visuels « Servier Medical Art » de Servier. Lien : <https://smart.servier.com/>

Ce matériel est libre d'utilisation et de modification selon les termes de la licence Creative Commons Attribution 3.0 France.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Liste des amorces utilisées

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 :

Article publié dans « Toxicology In Vitro »: (Hugbart and al. 2020)

Hugbart C, Verres Y, Le Daré B, Bucher S, Vène E, Bodin A, Lagente V, Fromenty B, Bouvet R, Morel I, Loyer P, Gicquel T *Non-oxidative ethanol metabolism in human hepatic cells in vitro: Involvement of uridine diphospho-glucuronosyltransferase 1A9 in ethylglucuronide*

Annexe 2 :

Article publié dans « Sensors »: (Vlach and al. 2019)

Vlach M, Quesnot N, Dubois-Pot-Schneider H, Ribault C, Verres Y, Petitjean K, Rauch C, Morel F, Robin MA, Corlu A, Loyer P *Cytochrome P450 1A1/2, 2B6 and 3A4 HepaRG Cell-Based Biosensors to Monitor Hepatocyte Differentiation, Drug Metabolism and Toxicity*

INTRODUCTION

Partie I : Les monocytes et les macrophages

A. Généralités

Les macrophages sont des cellules connues depuis le début du XX^{ème} siècle. C'est au cours de ses travaux sur la digestion intracellulaire qu' Elie Metchnikoff a identifié cette population de cellules, présente dans de nombreux tissus. Ces cellules montrent une capacité à être recrutées, à s'agréger et surtout, à détruire les microbes par phagocytose.

Les macrophages sont des acteurs centraux dans les mécanismes de l'immunité innée, jouant un rôle essentiel dans l'élimination des pathogènes, mais aussi dans l'homéostasie des organes et dans les processus de régénération ou de cicatrisation des tissus.

B. Ontogénie

1. Formation des macrophages

Le consensus sur l'origine des macrophages présents dans l'organisme a longtemps voulu que leur population soit entretenue à partir des monocytes circulants. Ces derniers sont générés dans la moëlle osseuse et se différencient macrophages dans les différents tissus pour remplacer et entretenir la population de macrophages résidents. Ce premier modèle est basé sur les travaux publiés par Ralph van Furth et ses collaborateurs dans les années 1970 (Furth and al., 1972).

Les données plus récentes semblent montrer que les macrophages « résidents » des tissus viendraient majoritairement de progéniteurs générés dans le sac embryonnaire pendant les premières semaines du développement. Ces macrophages « immatures » seraient générés sans passer par l'intermédiaire des monocytes et migreraient dans les tissus embryonnaires avant de finir leur différenciation *in situ*. Ces macrophages résidents pourraient entretenir leur population par prolifération dans les tissus. En parallèle, on trouve aussi une population plus « transitoire » de macrophages qui est différenciée à partir des monocytes dérivés des cellules souches hématopoïétiques situées dans la moëlle osseuse et/ou des monocytes fœtaux générés dans le foie fœtal (Ginhoux and Jung 2014; Ginhoux and Guilliams 2016; Perdiguero and Geissmann 2016)

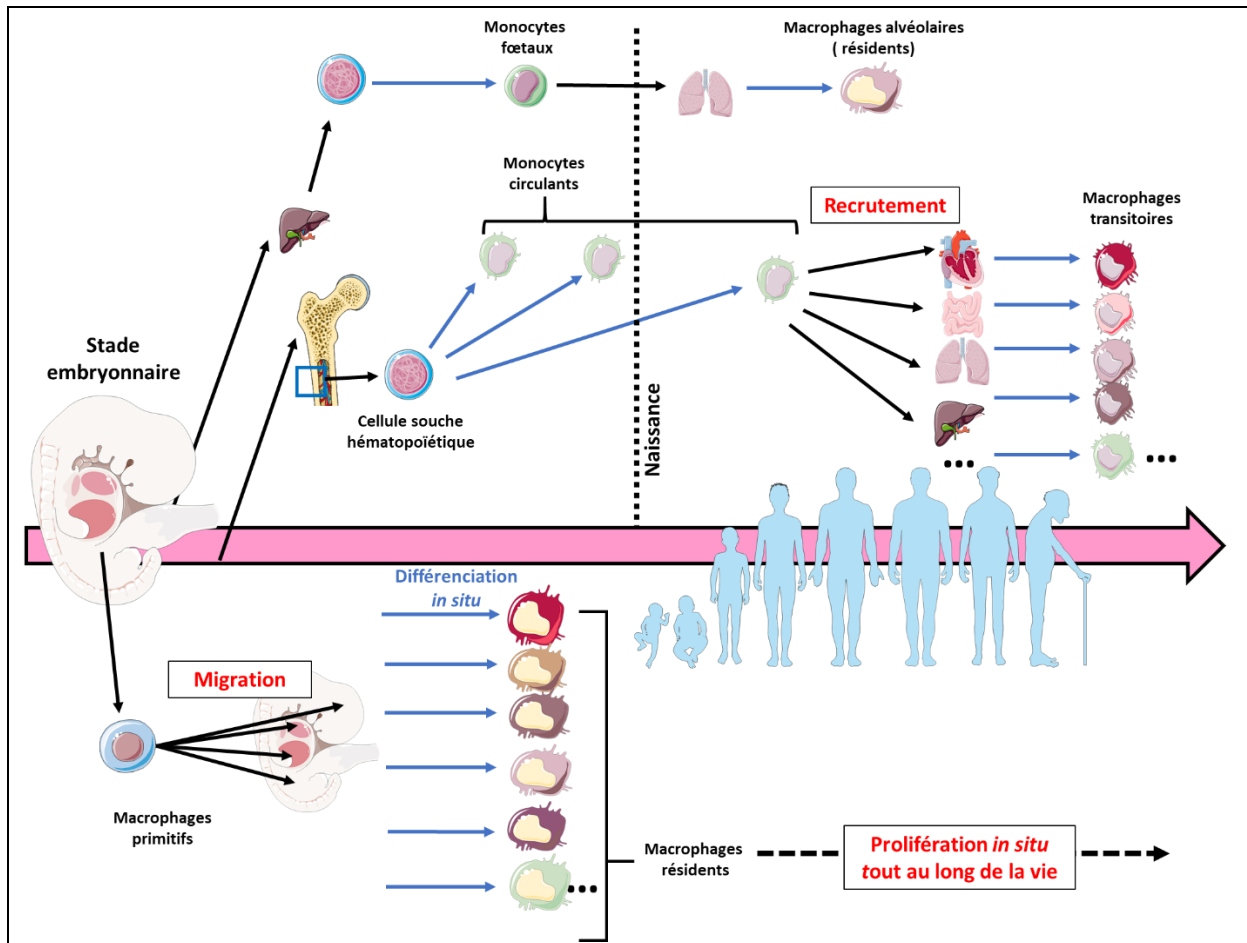


Figure 1 : Origine des populations de macrophages résidents et de macrophages transitoires

Dans les premières semaines du développement, dans le sac embryonnaire, émerge une population de macrophages « primitifs ». Ces macrophages vont migrer dans différents tissus et y finir leur différenciation. Tout au long de la vie, les macrophages résidents de ces tissus pourront proliférer pour maintenir leur population. Un peu plus tard dans le développement embryonnaire, quand l'hématopoïèse les cellules souches hématopoïétiques vont permettre la formation de monocytes. Ces monocytes seront produits et renouvelés tout au long de la vie et pourront être recrutés et différenciés en macrophages dans les différents tissus de l'organisme au moment nécessaire. Cette population est seulement transitoire et ne persiste pas dans les tissus comme les macrophages résidents.

2. Localisations possibles

Ces macrophages résidents sont présents dans plusieurs types de tissus ou d'organes, montrant chacun des particularités phénotypiques. Les cellules de Langerhans sont présentes dans l'épiderme, la microglie dans le cerveau, les cellules de Kupffer dans le foie. Existes aussi les macrophages péritonéaux, les macrophages de la rate, les macrophages pancréatiques, rénaux, cardiaques et alvéolaires (Perdiguero and Geissmann 2016).

Dans l'optique d'étudier le rôle des monocytes et macrophages dans le développement de pathologies pulmonaires inflammatoires, nous allons donc nous intéresser plus particulièrement à la physiologie des macrophages retrouvés dans les tissus pulmonaires.

3. Les macrophages pulmonaires

a) Généralités

Deux principales populations de macrophages sont présentes au niveau pulmonaire : les macrophages alvéolaires et les macrophages interstitiels qui ont des origines, des fonctionnements et des dynamiques différentes (Evren, Ringqvist, and Willinger 2020).

Les macrophages alvéolaires, présents au niveau des alvéoles du poumon sont ceux dont la physiologie est la plus documentée. Ils peuvent être récupérés en effectuant un lavage broncho-alvéolaire (LBA). Ce procédé peu invasif permet, en injectant une solution saline dans les bronches, d'obtenir un échantillon des différents composants cellulaires ou moléculaires s'y trouvant (Davidson and al. 2020).

À l'inverse, les macrophages interstitiels sont moins accessibles. Récupérer les cellules de ce type nécessite de les extraire des tissus de l'épithélium pulmonaire, ce qui est plus invasif que les LBA.

b) Formation et entretien de la population

D'après les connaissances actuelles, les macrophages résidents du poumon sont les macrophages alvéolaires. Contrairement aux autres types de macrophages résidents qui se sont formés à partir des macrophages primitifs venant du sac embryonnaire, les macrophages alvéolaires semblent dériver des monocytes fœtaux. Cela viendrait du fait que la « niche » de ces macrophages alvéolaires n'est pas disponible tant que les poumons n'ont pas été gonflés d'air lors des premières respirations juste après la naissance. Après cela, les monocytes pourraient alors coloniser les alvéoles et se différencier sous l'action du GM-CSF (facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages) et du facteur de croissance des tumeurs (TGF- β) (Schneider, Nobs, Kurrer, and al. 2014; Yu and al. 2017; Guilliams and al. 2013). Dès 48h après la naissance, des macrophages alvéolaires sont présents chez les nouveau-nés. L'exposition à l'environnement extérieur permet la maturation en macrophages alvéolaires

(Alenghat and Esterly 1984; Kasahara and al. 2012). Cette population de macrophages d'origine embryonnaire est maintenue indépendamment de la population de monocytes circulants venant de la moelle osseuse (Yona and al. 2013; Hashimoto and al. 2013; Guilliams and al. 2013). Ce maintien dépend de leur prolifération *in situ*, comme le reste des macrophages résidents (Soucie and al. 2016; Golde, Byers, and Finley 1974; Eguíluz-Gracia and al. 2016). Dans le cas de grandes pertes de population, une nouvelle niche se libère et peut alors être recolonisée par des macrophages dérivés de monocytes venant de la moelle osseuse (Machiels and al. 2017; Janssen and al. 2011; Maus and al. 2006; Guilliams and Scott 2017). La proportion de macrophages alvéolaires dérivés de monocytes venant de la moelle osseuse augmente avec l'âge (Gomez Perdiguero and al. 2015; Liu and al. 2019). Néanmoins, la population des macrophages alvéolaires montre une tendance à décroître au court de la vie, favorisant progressivement les infections par des pathogènes (Wong and al. 2017).

Au niveau pulmonaire, les macrophages interstitiels regroupent deux types de macrophages : les macrophages interstitiels et les macrophages périvasculaires (Chakarov and al. 2019; Gibbins and al. 2017). Ces macrophages interstitiels prendraient au moins partiellement origine dans le pool de monocytes circulants, et peuvent être recrutés temporairement pour accroître leur population, par exemple suite à un contact avec des bactéries (Sabatel and al. 2017). Les macrophages interstitiels ne sont recrutés que temporairement, et montrent un taux de renouvellement plus important que les macrophages alvéolaires (Cai and al. 2014).

4. Polarisation

En plus des différences observées entre les types de macrophages retrouvés dans l'organisme, un phénomène de polarisation peut aussi amener de la complexité dans le fonctionnement de ces cellules. Le microenvironnement des macrophages, comme les cytokines auxquelles ils sont exposés, les contacts avec les pathogènes ou des modifications épigénétiques peuvent impacter leur développement vers des phénotypes appelés « M1 » ou « M2 ».

Les macrophages M1 (activés « classiquement »), se développent au contact des cytokines produites par les lymphocytes T « *helper* » (Th1), notamment l'Interféron gamma (IFN)- γ . La stimulation des « *Toll-like receptors* » (TLR), souvent avec des lipopolysaccharides (LPS), contribue aussi à cette polarisation, ainsi que la stimulation des récepteurs à l'Interleukine 1

(IL-1R). Dans la polarisation M1, les voies de signalisation du facteur nucléaire kappa B (NF- κ B), du facteur de régulation des interférons (IRF5) et des transducteurs des signaux et activateurs de la transcription (STAT1) sont mobilisées. Les macrophages M1 sont présentés comme ayant un phénotype pro-inflammatoire, avec des sécrétions de cytokines comme l'interleukine (IL)-1 β , l'IL-6, le facteur de nécrose des tumeurs alpha (TNF)- α (Yunna and al. 2020; Murray 2017; Sica and Mantovani 2012; Guha and Mackman 2001; Ivashkiv 2013).

Les macrophages M2 (activés « alternativement »), se développent au contact des cytokines produites par les lymphocytes Th2, notamment l'IL-4 et l'IL-13. Les voies de signalisation impliquées dans leur développement comprennent les voies STAT6 et IRF4 ainsi que les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxydases (PPAR). Les macrophages M2 sont plutôt impliqués dans les réponses anti-inflammatoires, la réparation tissulaire et l'angiogenèse. Ils exercent aussi une activité phagocytaire qui permet l'élimination des cellules apoptotiques (Yunna and al. 2020; Murray 2017; Ivashkiv 2013; Van Dyken and Locksley 2013)

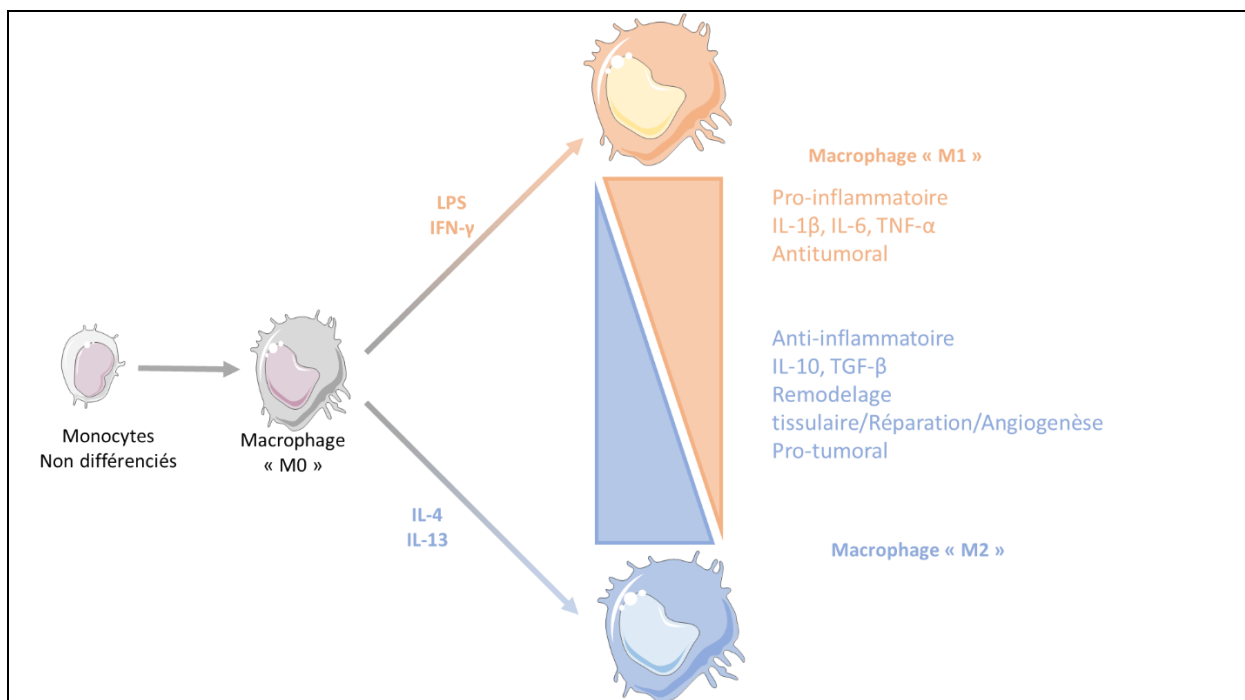


Figure 2 : Polarisation des macrophages

Les macrophages non activés sont au stade « M0 ». À partir de ce stade, selon les facteurs auxquels ils sont exposés, ils peuvent dériver vers un phénotype M1 plutôt pro-inflammatoire, ou un phénotype M2 anti inflammatoire. Des formes intermédiaires montrant des caractéristiques à la fois de M1 et M2 sont possible, il existe un spectre de polarisation, et non pas des catégories « fermées ». Les macrophages peuvent alterner entre M1 et M2 au cours du temps.

Comme décrits dans la revue de Murray en 2017, les phénotypes M1 et M2 habituellement présentés sont les extrêmes d'un spectre de polarisation dans lequel les macrophages évoluent selon un phénotype dynamique et peuvent progresser d'un type vers l'autre (Murray 2017). Pour l'instant, les marqueurs définis par l'étude *in vitro* des macrophages activés classiquement ou alternativement ne semblent pas suffisants pour s'appliquer à la caractérisation des macrophages M1 ou M2 observés *in vivo*. Une étude a montré qu'il y avait peu de signatures communes entre les macrophages activés classiquement *in vitro* et les macrophages M1 trouvés *in vivo*. Le résultat est le même pour les macrophages M2 (Orecchioni and al. 2019). Ceci montre qu'il est difficile de comparer les données et marqueurs entre des études *in vivo* et *in vitro*, et soutiennent l'idée que des efforts doivent être déployés pour identifier des marqueurs qui seraient pertinents pour les différents modèles d'étude.

C. Rôle des monocytes et des macrophages pulmonaires

À leur état basal, les macrophages alvéolaires ont un phénotype anti-inflammatoire, pour éviter des pathologies auto-immunes ou des réactions immunitaires inappropriées qui peuvent endommager les tissus. Les macrophages produisent des médiateurs comme l'IL-10, le TGF- β , les prostaglandines (PGE), qui sont nécessaires au contrôle et à la résolution de l'inflammation (Bissonnette and al. 2020; Ménard, Turmel, and Bissonnette 2007; Aggarwal and al. 2014; Watanabe and al., 2019.) .

Néanmoins, en cas de contact avec un signal de danger ou un pathogène, les macrophages évoluent vers un phénotype inflammatoire. La stimulation de différents récepteurs, groupés sous le nom de PRR (*Pattern Recognition Receptor*) qui comprend notamment les NLR (*Nod like receptors*) et les TLR permettent de détecter les invasions pathogènes ou les signaux de dangers endogènes. Le LPS, présent dans la membrane des bactéries Gram négatif, va activer les voies de signalisation liées à NF- κ B, ou celles liées aux kinases activées par les mitogènes (MAPK) et engendre alors la production de nombreuses cytokines, chimiokines ou facteurs de croissance parmi lesquelles on peut trouver l'IL-1 β , l'IL-6, le TNF- α , le GM-CSF, la protéine attractrice des monocytes (MCP-1) aussi appelée chimiokine a motif C-C (CCL)-2, (Guha and Mackman 2001; Rossol and al. 2011a; Takeuchi and Akira 2010 ; Blackwell and al. 2011) Ces cytokines libérées permettent l'initiation des réponses immunitaires innées et adaptatives

(Gordon and Read 2002; Martinez, Garg, and van Drunen Littel-van den Hurk 2019; Liu, Liu, and Ge 2017; Takeuchi and Akira 2010).

Dans les poumons, les macrophages alvéolaires travaillent de concert avec les cellules endothéliales pour assurer la fonction de barrière immunitaire (Tao and Kobzik 2002; Leiva-Juárez, Kolls, and Evans 2018; Hussell and Bell 2014). Ce sont les premières cellules en contact avec ces pathogènes, en mesure de les détecter et d'initier une réponse appropriée. Dans des modèles murins déplétés de leurs macrophages alvéolaires, les infections au virus influenza sont plus sévères, les fonctions respiratoires et la survie des animaux sont diminuées par rapport aux contrôles (Schneider, Nobs, Heer, and al. 2014; Purnama and al. 2014).

Cette protection est liée à la capacité de phagocytose des macrophages, qui leur permet de fixer, internaliser, dégrader et éliminer les microbes qui peuvent envahir les tissus. En plus d'éliminer les pathogènes, la phagocytose permet de se débarrasser des cellules apoptotiques, on parle alors d'efférocytose. La phagocytose ou efférocytose commence par la reconnaissance de la cible, comme une bactérie, une levure ou une cellule apoptotique identifiée par la liaison avec des marqueurs de surface spécifiques de l'agresseur. La signalisation cellulaire est alors activée et des changements du cytosquelette permettent des modifications structurales de la membrane qui va englober la particule détectée pour former une vacuole, le phagosome. Celui-ci va progressivement mûrir, fusionnant avec des vésicules provenant du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi ainsi qu'avec des lysosomes afin de former un phagolysosome. Ces vésicules aux conditions extrêmes, très acides, vont permettre la dégradation de leur contenu (Stuart and Ezekowitz 2005; Ortega-Gómez, Perretti, and Soehnlein 2013; Rosales and Uribe-Querol 2017).

Au cours de la phagocytose, la liaison avec la cible à éliminer stimule la production de cytokines immunorégulatrices, ce qui permet d'initier la résolution de l'inflammation au fur et à mesure que les éléments l'ayant générés sont éliminés (Ariel and Serhan 2012; Bratton and Henson 2011; Henson and Bratton 2013; Sugimoto and al. 2019; Henson 2017). L'injection de cellules apoptotiques *in vitro* permet de déclencher la résolution de l'inflammation dans des cellules stimulées par du LPS. Dans ces expériences, l'augmentation de la concentration du TGF β se fait en parallèle de la diminution de libération de cytokines telles que l'IL-1 β , le TNF- α , l'IL-8 et le GM-CSF (Fadok and al. 1998; Huynh, Fadok, and Henson 2002).

Après la phase inflammatoire, les macrophages participent à la réparation ou régénération des tissus en produisant des facteurs de croissance qui vont favoriser l'angiogenèse, le remodelage. La production de métalloprotéases (MMP), de facteur de croissance des fibroblastes (FGF), de facteur de croissance dérivée des plaquettes (PDGF) sert à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (Smigiel and Parks 2017; Rohani et al. 2015; Vannella and Wynn 2017).

Suite à des dégâts tissulaires, on peut distinguer deux mécanismes : le premier, la régénération, correspond à la prolifération de cellules qui vont remplacer le tissu manquant avec les cellules appropriées. L'autre, la réparation, implique la mise en place de fibrose et de tissu cicatriciel, ne régénérant pas un tissu identique à l'originel. Les processus de réparation et de régénération fonctionnent généralement de concert. Au long terme, l'accumulation de fibrose dans les tissus peut nuire à la fonction de celui-ci (Gurtner and al. 2008; Aurora and Olson 2014; Mescher and Neff 2005; Oishi and Manabe 2018; 2018; Wynn, Chawla, and Pollard 2013).

Le maintien anormal d'une population de macrophages activés et d'un environnement inflammatoire peut amener au développement de pathologies comme l'asthme (Fricker and Gibson 2017). C'est aussi le cas pour la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) et pour l'hypertension pulmonaire (HTP) des pathologies qui vont particulièrement nous intéresser pour les travaux à venir.

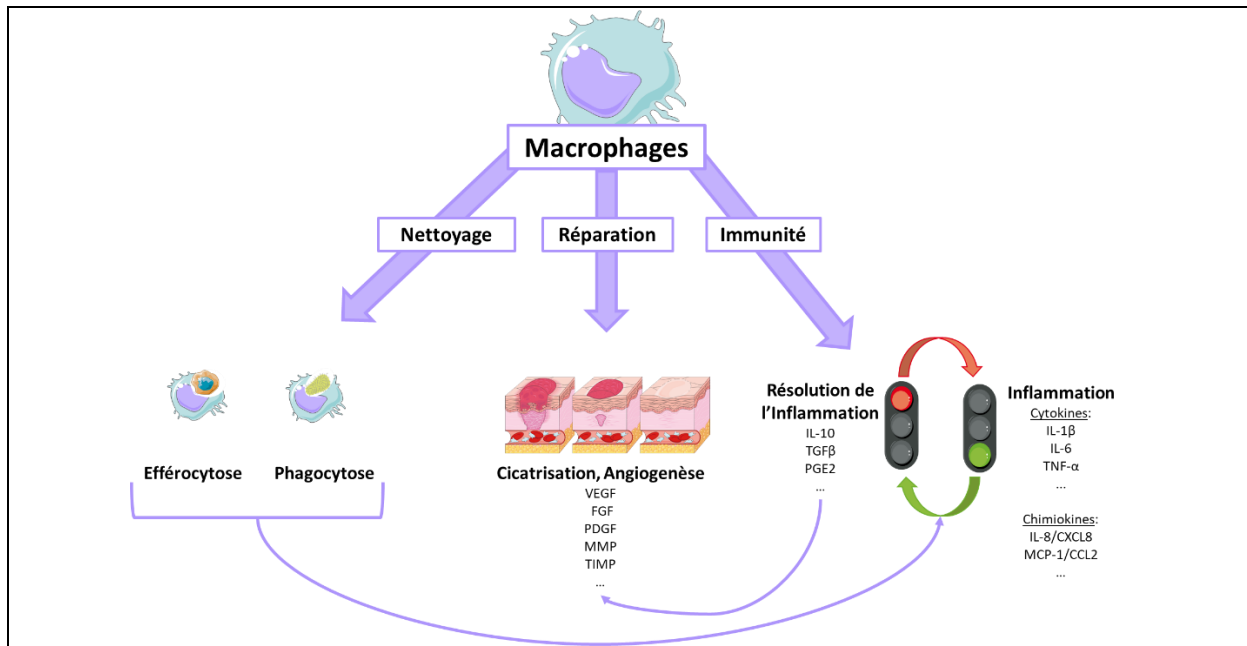


Figure 3 : Les fonctions des macrophages au niveau pulmonaire

Les macrophages dans leur état basal montrent un phénotype anti-inflammatoire, ou de résolution de l'inflammation. S'ils sont activés, ils peuvent produire des cytokines pro-inflammatoires pour activer les cellules voisines, ou des chimiokines pour recruter d'autres populations cellulaires (neutrophiles, monocytes, lymphocytes). Cette production de cytokines est rétro régulée par la libération de facteurs anti-inflammatoires, en particulier l'IL-10 et le TGF-β. Après la phase inflammatoire, la réparation des tissus est initiée avec différents facteurs de croissances et protéases. La résolution de l'inflammation passe aussi par l'élimination des corps apoptotiques ou des microbes ayant envahi les tissus. En plus de retirer des éléments inflammatoires de l'environnement, leur phagocytose déclenche la production de facteurs anti-inflammatoires favorisant progressivement la résolution de l'inflammation.

Partie II : Les pathologies pulmonaires impliquant les monocytes et les macrophages

A. Broncho-pneumopathie chronique obstructive

1. Définition

La BPCO est une maladie caractérisée par des symptômes respiratoires persistants et une limitation des capacités respiratoires dues à des anomalies au niveau alvéolaire. (Mirza and al. 2018). C'est une maladie progressive qui est souvent associée à une inflammation chronique des voies respiratoires, des alvéoles et de la microvasculature.

Il a été tenté de définir la BPCO selon l'évolution d'un paramètre respiratoire particulier : la capacité vitale (CV), le volume d'air maximal qu'une personne peut expirer après avoir réalisé une inspiration maximale. On s'intéressera plus particulièrement à la CVF (capacité vitale forcée), la proportion de cette CV que la personne expire dans la première seconde de son expiration. Il est décrit qu'un poumon « sain », la CVF représente plus de 70% de CV (ratio de 0,7). En dessous de cette capacité, on rentre dans la cadre d'une limitation des capacités respiratoires qui peut être liée à la BPCO (Barnes and al. 2015).

2. Étiologie

La BPCO est une pathologie largement évitable, du fait que son principal facteur de risque est le tabagisme. L'absence de consommation de tabac ou la cessation de sa consommation constitue une bonne protection contre cette pathologie. Il existe néanmoins d'autres facteurs de risque qui peuvent amener à son développement, tels que la pollution extérieure, le tabagisme passif, les poussières organiques et inorganiques ou des agents chimiques (Vogelmeier and al. 2017; Eisner and al. 2010; Paulin and al. 2015). Il semble aussi que des facteurs génétiques puissent jouer dans l'apparition de la maladie ; des tendances ethniques et historiques familiaux ont été déterminés (Ingebrigtsen and al. 2010; McCLOSKEY and al. 2001; Silverman and al. 1998). Ces facteurs génétiques pourraient jouer dans 30% de la susceptibilité à la maladie (Zhou et al. 2013).

L'âge est aussi un facteur de risque, sans qu'il soit clair si le vieillissement à lui seul est réellement responsable du développement de la BPCO ou si le cumul des expositions à risque au cours de la vie en est responsable (Mercado, Ito, and Barnes 2015). Le sexe aussi semblait potentiellement un facteur de risque important, du fait de l'atteinte majoritaire des hommes, mais cette tendance s'estompe dans le temps, sans doute en fonction de la consommation croissante de tabac chez les femmes, qui vient progressivement s'équilibrer avec celle des hommes (Landis and al. 2014).

D'une façon intéressante, il semble que dans les pays en voie de développement, la prévalence de la BPCO ne corresponde pas à la consommation de tabac comme on l'observe dans les pays développés. Pour les pays en voie de développement, l'exposition aux autres facteurs de risques semble prendre une place plus importante dans le développement de la maladie, potentiellement dû à la présence importante dans ces pays des énergies basées sur la combustion du charbon, des matières végétales ou des déchets animaux (Salvi and Barnes 2009).

Dans l'ensemble, l'âge, le sexe, la condition socio-économique sont des paramètres qui influent sur l'environnement des individus, les exposant plus ou moins à certains facteurs de risque tout de long de leur vie, et ce dès la naissance (GOLD-REPORT-2021-v1.1-25Nov20).

3. Épidémiologie

La prévalence de la BPCO est importante, puisqu'on considère qu'elle touche environ 11% de la population. En France, la proportion de fumeurs s'élève à 30%, dont 24% de fumeurs réguliers (Pasquereau 2020). Une proportion non négligeable des fumeurs sont atteints de la BPCO. Dans le monde, cette maladie représente plus de 3 millions de décès chaque année ('The Top 10 Causes of Death' 2020; Pauwels et al. 2001).

Les malades peuvent présenter beaucoup de comorbidités, des cancers dont le développement est aussi lié à la consommation de tabac. Parmi ces cancers on retrouve le cancer du poumon, mais aussi celui de la vessie, du col de l'utérus, du colon/rectum, de l'œsophage, des reins, du larynx, du foie, de la bouche/gorge, du pancréas, de l'estomac et les leucémies (Siegel and al. 2015).

En plus des cancers, des comorbidités comme de l'insuffisance cardiaque, des embolies pulmonaires, du déconditionnement, du diabète, de l'ostéoporose ou de la dépression sont

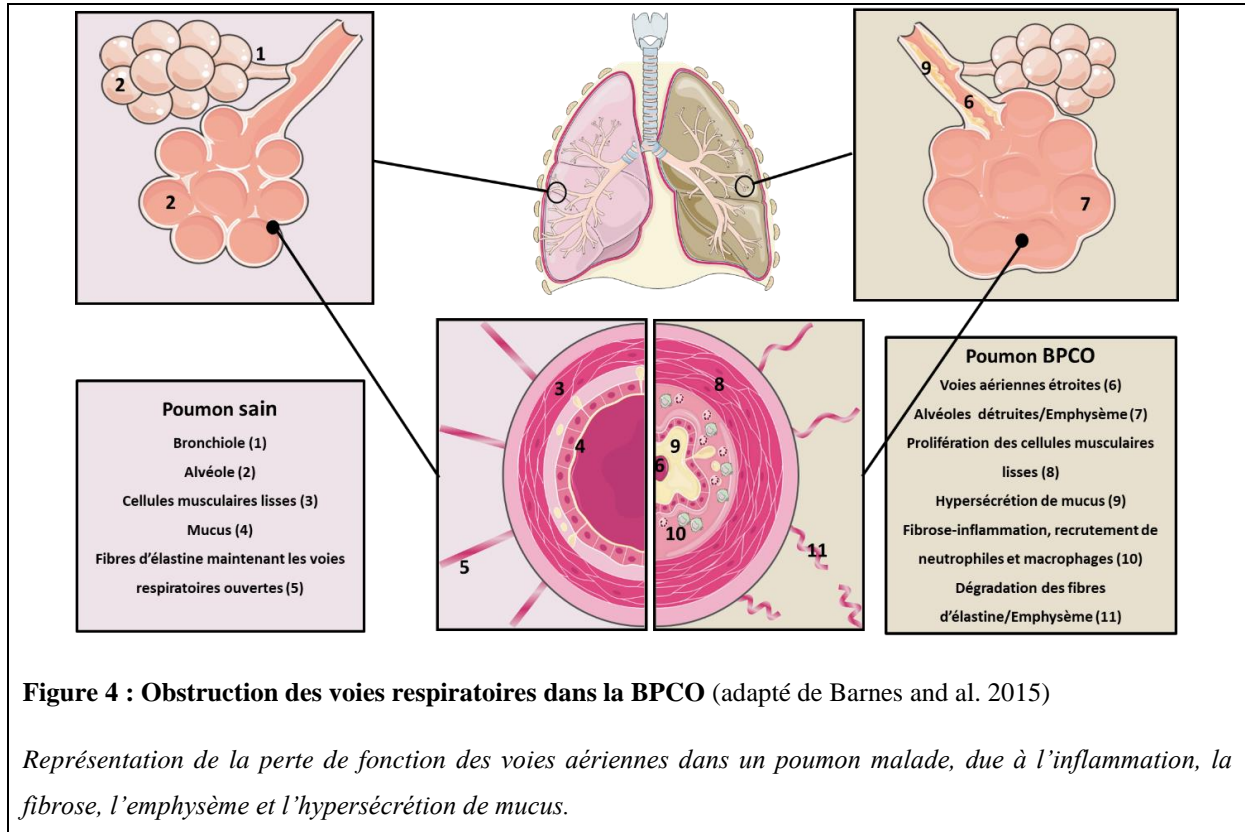
possibles. La plupart des décès dans la BPCO sont en fait à attribuer aux cancers pulmonaires et aux atteintes cardiovasculaires et pas nécessairement directement à la BPCO (Chatila and al. 2008; Anthonisen and al. 2002)

4. Physiopathologie

Plusieurs paramètres vont être clés dans le développement de la BPCO, résumés dans la **Figure 4**. Tout d'abord, l'inflammation et la fibrose présentes dans les tissus vont être responsables du développement d'une bronchiolite obstructive. Ensuite, le remodelage tissulaire, qui déclenche la destruction des voies aériennes (emphysème) va réduire la surface alvéolaire fonctionnelle, diminuer les échanges gazeux et donc l'oxygénation du sang. Enfin, on observe aussi une hypersécrétion de mucus qui encombre les voies aériennes. Moins fréquemment, il est possible d'observer des changements structurels avec un épaississement des artères pulmonaires dû à une prolifération des cellules musculaires lisses qui génère une vasoconstriction plus importante, un paramètre pouvant dans certains cas amener à l'hypertension pulmonaire (Barnes and al. 2015).

L'inflammation est générée et entretenue par de multiples facteurs qui vont maintenir cet environnement délétère et va être responsable des dysfonctions observées. La fumée de cigarette déclenche une réponse inflammatoire en stimulant les PRR présents en surface les macrophages, des cellules épithéliales et des cellules dendritiques. Ces PRR vont être stimulés soit par des PAMP (*Pathogen associated molecular pattern*) qui seront directement reconnus parmi les différents composants de la fumée, soit par des DAMP (*Danger associated molecular pattern*) qui auront été libérés suite aux dommages générés à cause de l'exposition (Opitz and al. 2010). Des niveaux augmentés de HMGB1 (*high-mobility groupe box 1*) et du récepteur qui va le lier, RAGE (*receptor for advanced glycation products*) vont être responsables d'une production accrue d'IL-1 β (Ferhani and al. 2010). Cette cytokine joue un rôle important dans le développement de la maladie. Dans le cas d'une délétion de son récepteur, des souris exposées à de la fumée de cigarette sont protégées contre la réponse inflammatoire et la destruction de la matrice extracellulaire qui s'en suit normalement (Churg and al. 2009). Des concentrations accrues d'adénosine tri phosphate (ATP) extracellulaire dans les lavages bronchoalvéolaires (LBA) des patients, qui en se fixant sur les récepteurs purinergiques P2 des

macrophages, peuvent aussi participer au développement de l'emphysème par production de métalloprotéases et d'IL-1 β (Cicko and al. 2010; Lommatzsch and al. 2010).



L'IL-1 β n'est pas la seule cytokine dont la production est changée. Des voies de signalisations telles que les voies NF- κ B et p38 MAPK sont activées chez les macrophages dans la BPCO (Stefano and al. 2002; Renda and al. 2008). Leur mobilisation peut résulter en la production de cytokines et chimiokines telles que l'IL-1 β , l'IL-6, le TNF- α , la MCP-1/CCL2, l'oncogène régulé par la croissance (GRO- α), aussi connu comme la chimiokine à motif C-X-C (CXCL)-1, IL-8/CXCL8, CXCL9, CXCL10 et CXCL11 (Barnes 2008).

Ces chimiokines vont servir à recruter différentes cellules jusqu'au poumon. On sait par exemple que MCP-1/CCL2 montre une capacité chimiotactique dirigée vers les monocytes circulants, qui vont donc affluer dans le poumon et se différencier en macrophages afin d'à leur tour produire une variété de cytokines et chimiokines (Deshmane and al. 2009a). GRO- α /CXCL1 et l'IL-8/CXCL8 sont deux chimiokines qui vont servir au recrutement des neutrophiles (Hoffmann and al. 2002; De Filippo and al. 2013). Dans la BPCO, les monocytes semblent aussi avoir une sensibilité accrue au chimiotactisme de CXCL1, dont le récepteur aux motif CXC (CXCR)-2 est plus exprimé chez les patients (S. Traves and al. 2002; S. L. Traves and al. 2004). Les neutrophiles, très présents au niveau pulmonaire dans la BPCO, vont

notamment avoir un rôle important dans le remodelage pulmonaire, via la production de protéases comme la MMP-9 et la neutrophile élastase humaine. Ces protéases vont contribuer à la destruction des tissus environnants, mais sont aussi des stimulateurs de la production de mucus (Kohri, Ueki, and Nadel 2002; Fahy and Dickey 2010).

Ce remodelage sera aussi médié par les macrophages, qui vont produire plus de métalloprotéases, notamment les MMP-2, MMP-9 et MMP-12 (Russell and al. 2002). L'accumulation de protéases au niveau alvéolaire induit une dégradation des fibres d'élastine, qui contribue au développement de l'emphysème.

Les chimiokines CXCL9, CXCL10, CXCL11 sont impliquées dans le recrutement des populations lymphocytaires via l'interaction avec leur récepteur CXCR3 et peuvent contribuer au développement de l'emphysème (Grumelli and al. 2004).

L'exposition à la fumée de cigarette génère aussi un terrain favorable au développement du stress oxydant, médié par la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) par les macrophages, neutrophiles, cellules épithéliales et endothéliales. Ces ERO vont être responsables de la carbonylation de protéines et de lipides qui vont à leur tour être responsables de multiples dysfonctions cellulaires qui participent à la progression de la maladie (Kirkham and Barnes 2013).

On peut noter l'activation des voies de signalisation NF- κ B et p38 MAPK évoquées plus tôt, résultant donc en la production accrue de cytokines, chimiokines et protéases (Barnes and al. 2015). Ces protéines carbonylées peuvent aussi être reconnues par les lymphocytes déjà recrutés au niveau du poumon et déclencher la production d'auto-anticorps impliqués dans l'emphysème (Kirkham and al. 2011).

Aussi, on peut observer la génération de dégâts à l'acide désoxyribonucléique (ADN) comme des cassures double brin, qui sont difficilement réparées dans la BPCO et peuvent mener plus tard à d'autres pathologies comme les cancers pulmonaires (Caramori and al. 2011).

Dans les cellules épithéliales, on observe au niveau mitochondrial une fragmentation des mitochondries accrue, conduisant à une baisse de la productivité en ATP et une sénescence prématurée des cellules épithéliales (Hara and al. 2013). Des ERO mitochondriaux vont aussi être produits, accentuant le stress oxydant. La fumée de cigarette est aussi responsable de l'autophagie (ou mitophagie) de ces organelles défectueux, résultant en des déficits de mitochondries déclenchant l'apoptose des cellules (Mizumura and al. 2014).

Enfin, les ERO ont été décrites comme un facteur dans le développement de la résistance aux corticostéroïdes, qui sont actuellement une des principales classes de traitement utilisées pour combattre la BPCO (Barnes 2013).

Toutes ces réponses inflammatoires et oxydantes s'organisent certainement dans une boucle qui s'auto-entretient, car même après avoir cessé l'exposition à la fumée de cigarette, les marqueurs de stress persistent (Montuschi and al. 2000). Les mécanismes de résolution de l'inflammation ne semblent pas opérationnels, comme par exemple l'histone désacétylase (HDAC), censée réprimer l'expression des gènes pro-inflammatoires, et dont l'expression et l'activité sont diminuées dans les macrophages des patients présentant une BPCO (Ito and al. 2005). De la même façon, le stress oxydant est censé activer Nrf2 (*nuclear erythroid-2 related factor 2*), qui répond par la production d'antioxydants. Dans la BPCO, Nrf2 n'est pas correctement mobilisé, empêchant un retour à la normale. L'acétylation augmentée des histones, due à l'expression diminuée de HDAC pourrait être responsable de la faible expression de Nrf2 (Mercado and al. 2011).

Ces multiples dysfonctions font que le tissu pulmonaire des fumeurs et des malades est le théâtre d'un vieillissement accéléré (Mercado, Ito, and Barnes 2015; Ito and Barnes 2009). Les défauts dans la capacité à réparer les dégâts accumulés à l'ADN, dans le fonctionnement des télomérases et d'autres mécanismes censés ralentir le vieillissement sont responsables de l'accumulation de cellules, organelles et protéines dysfonctionnelles qui constituent aussi un facteur de risque pour le développement de comorbidités (Paschalaki and al. 2013).

Étrangement, même si la BPCO comporte une importante composante inflammatoire, la fumée de cigarette peut aussi avoir des propriétés anti-inflammatoires. Dans la BPCO, les macrophages alvéolaires montrent une diminution progressive d'expression des gènes de macrophage M1 en faveur des M2 (Shaykhiev and al. 2009). La quantité et la proportion des macrophages M2 augmentent suite à l'exposition à la fumée de cigarette (Oliveira da Silva and al. 2017; He et al. 2017). Ces changements vers un profil M2 s'accompagnent d'une augmentation d'expression des MMP qui jouent un rôle important dans l'élastolyse et donc l'emphysème. Notre équipe a discuté du fait qu'un extrait de fumée de cigarette (CSE) pouvait augmenter chez les macrophages l'expression des gènes de l'IL-8/CXCL8 et de MCP-1/CCL2, mais n'augmentait pas l'expression de l'IL-6 ou de GRO- α /CXCL1. En revanche, en présence de LPS, le CSE va diminuer l'expression d'IL-6 et de GRO- α /CXCL1 induite par le LPS et accroître l'expression de l'IL-8/CXCL8 et de MCP-1/CCL2 (da Silva and al. 2020). Il est suggéré que la fumée de cigarette diminue la réponse inflammatoire des macrophages, mais pas

leur capacité chimiotactique, permettant le maintien de cellules immunitaires comme les neutrophiles et les monocytes.

On observe chez les malades un déficit de la capacité de phagocytose des macrophages à cause de l'exposition à la fumée de cigarette (Taylor and al. 2010; Donnelly and Barnes 2012). C'est aussi un paramètre que notre équipe a observé en exposant des macrophages humains *in vitro* à de la fumée de cigarette (da Silva and al. 2020). L'incapacité à combattre et éliminer correctement les pathogènes bactériens et viraux crée un terrain propice à leur prolifération. Par ailleurs, les capacités d'efférocytose des macrophages sont aussi altérées, empêchant l'élimination des débris cellulaires et corps apoptotiques qu'ils rencontrent. L'élimination de ces débris est un paramètre important dans la résolution de l'inflammation (Mukaro and Hodge 2011) et son dysfonctionnement contribue aussi au maintien d'un environnement inflammatoire.

Cette baisse de la capacité de phagocytose est responsable de l'augmentation de fréquence des infections virales et bactériennes chez ces malades. Ces infections sont d'ailleurs responsables des épisodes d'exacerbations, qui sont eux aussi plus fréquents et constituent des périodes à risque pour les patients.

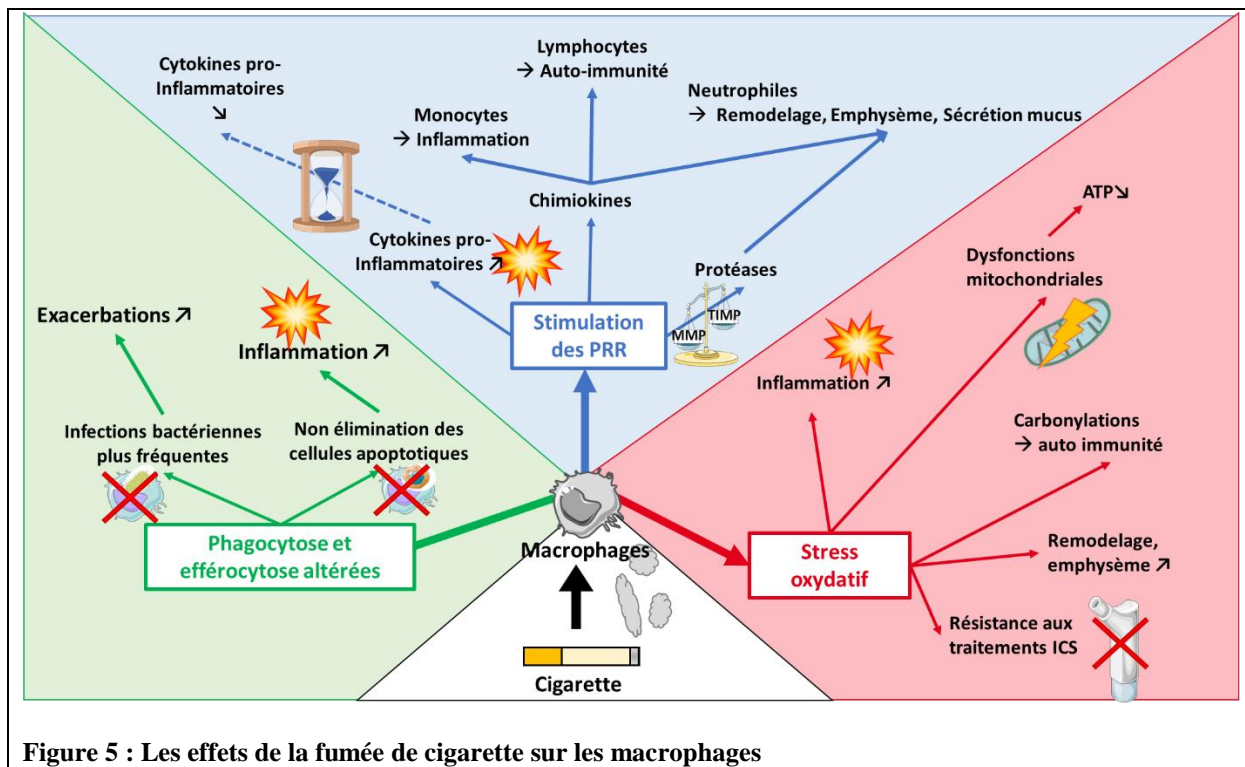


Figure 5 : Les effets de la fumée de cigarette sur les macrophages

5. Diagnostic et pronostic

Dans l'optique de poser un diagnostic, un examen physique doit d'abord être réalisé par un médecin, complété avec un test spirométrique qui permet de mesurer la CVF et la CV et déterminer le ratio CVF/CV (GOLD-REPORT-2021-v1.1-25Nov20).

Le diagnostic de la BPCO requiert 3 critères : une limitation des capacités respiratoires caractérisée par un ratio CVF/CV inférieur à 0,7 ; des symptômes appropriés tels que la dyspnée, des toux chroniques, des expectorations et des sifflements lors de la respiration ; et l'exposition connue à des stimuli nocifs ou une consommation connue de cigarettes (Vogelmeier and al. 2017). Une exposition notable à la cigarette est définie comme la consommation de plus de 10 paquets par an, soit moins d'1 cigarette par jour (Burrows et al., 1976).

Ces critères de diagnostic sont cependant discutés par Mirza and al. dans leur rapport sur les lignes directrices du GOLD (Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease), publié en 2018. Ils considèrent que le paramètre CVF/CV n'est pas adapté et peut mener à de faux diagnostics. C'est notamment le cas chez les patients âgés de plus de 60 ans, chez qui la capacité respiratoire peut déjà être altérée, et pour les jeunes patients, qui peuvent paraître asymptomatiques si on se concentre sur ce paramètre seul, sans évaluation à l'effort (Mirza and al. 2018; Hansen, Sun, and Wasserman 2007). Des méthodes utilisant des seuils du ratio CVF/CV adaptés en fonction de la population étudiée ont été testées mais ne montrent pas encore de meilleure discrimination que le ratio « optimal » de 0,7 (Bhatt and al. 2019).

Aussi, il y est discuté la pertinence de rechercher uniquement l'aspect « chronique » des symptômes. Certaines personnes avec une BPCO modérée peuvent arriver à s'adapter et ne présenter des symptômes qu'à l'effort, ce qui peut les exclure du diagnostic « classique » (Mirza and al. 2018). Dans l'ensemble il apparaît que le cumul des informations des trois critères de diagnostic permet de limiter les diagnostics erronés.

Une fois que la BPCO est confirmée chez le patient, la sévérité de l'atteindre doit être évaluée. Une première classification existe, basée sur le ratio CVF/CV. Les patients avec un ratio $> 0,8$ seront dans la catégorie « GOLD 1 », qui regroupe des BPCO légères ; les ratios entre 0,5 et 0,8 se placent en « GOLD 2 », correspondant aux BPCO modérées ; entre 0,3 et 0,5 se placent

dans les patients de la catégorie « GOLD 3 » qui correspond aux BPCO sévères ; en dessous de 0,3 les patient « GOLD 4 » subissent une BPCO très sévère.

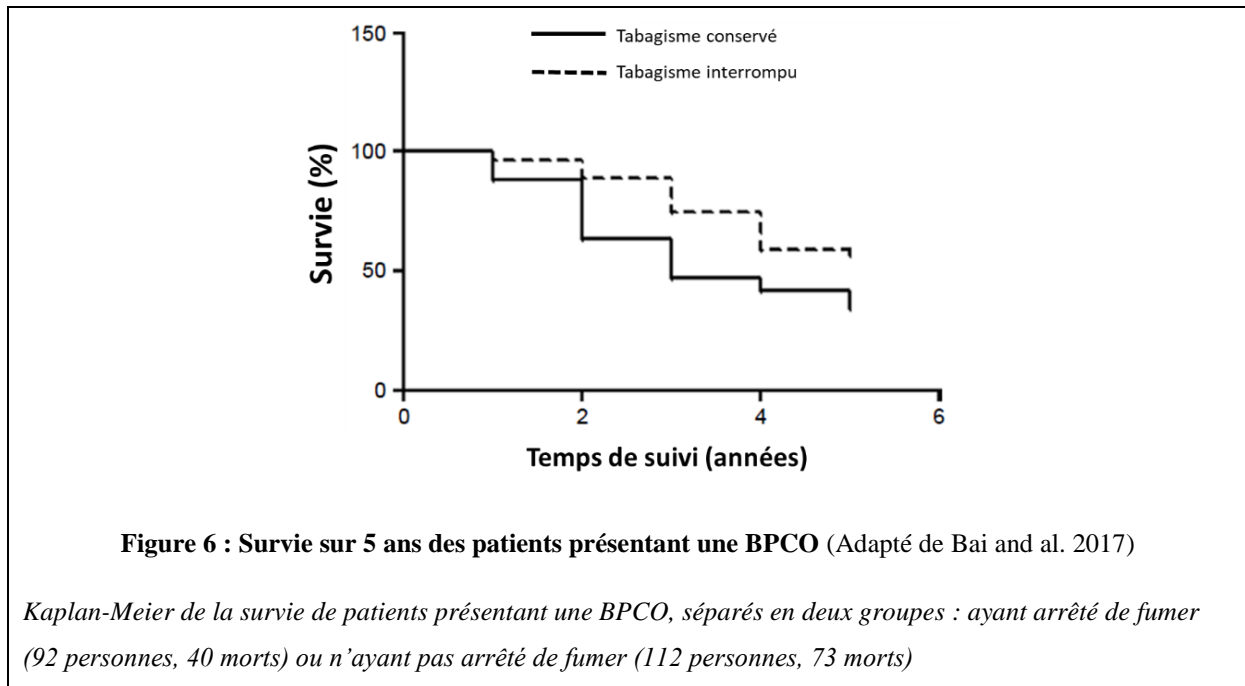
Une autre classification existe, basée sur les symptômes apparents de la maladie. Elle permet de placer les patients dans 4 groupes nommés de A à D ; des formes les plus modérées aux plus sévères. Cette classification est basée sur 2 échelles, la première intègre le nombre d'épisodes d'exacerbations récents. La deuxième renseigne sur la capacité du patient à effectuer des tâches physiques plus ou moins simples (marcher, courir, faire du sport, s'habiller, se lever...) (Mirza and al. 2018 ; Agusti and Vogelmeier 2021). Ces classifications servent à définir la stratégie thérapeutique à adopter vis-à-vis des patients.

6. Traitements et limites

a) Traitements actuels

Dans la prise en charge de la BPCO, le point crucial est la cessation de l'exposition à risque, la plupart du temps la consommation de tabac. Des moyens variés existent pour aider au sevrage des patients vis-à-vis de la nicotine et aident à maintenir une abstinence (The Tobacco Use and Dependence Clinical Practice Guideline Panel 2000; van der Meer and al. 2003; 'A Clinical Practice Guideline for Treating Tobacco Use and Dependence: 2008 Update' 2008). À ce jour, les données de la littérature ne permettent pas de démontrer un effet de la cigarette électronique dans le sevrage qui soit supérieur à ce que peuvent apporter les patches de nicotine (Bullen and al. 2013).

L'abstinence permet d'améliorer la qualité de vie, en ralentissant le déclin des fonctions pulmonaires, diminuer les symptômes et le nombre d'exacerbations. Le risque de mortalité est diminué chez les patients abstinentes (**Figure 6**) (Bai and al. 2017). En plus de la cessation du tabagisme, il est recommandé de maintenir une activité sportive régulière, qui permet aux patients de sortir des cercles vicieux d'inactivité délétères à leur état de santé global. Il est aussi recommandé de maintenir à jour ses vaccinations contre le virus Influenza et contre les pneumocoques. Ces vaccins ont montré une efficacité pour diminuer les exacerbations et des décès des patients (Poole and al. 2006; Aslam and al. 2016; Wongsurakiat and al. 2004; Bonten and al. 2015)



En plus de ces mesures, des traitements pharmacologiques peuvent être mis en place. Ces traitements vont être définis selon le groupe (A, B, C ou D) dans lequel le patient a été diagnostiqué.

Les patients du groupe A se verront administrer des bronchodilatateurs. Selon l'efficacité, le traitement pourra être maintenu, stoppé ou changé pour une autre classe de bronchodilatateurs.

Les patients du groupe B commencent leur traitement directement avec des bronchodilatateurs à action longue, soit des LABA (*Long Acting Beta Agonist*) soit des LAMA (*Long Acting Muscarinic Antagonist*). Si le traitement ne se montre pas suffisant, une combinaison LABA + LAMA peut être envisagée.

Le groupe C commence la thérapie avec des LAMA, si le traitement est insuffisant et que d'autres exacerbations se produisent, la combinaison LABA + LAMA peut être mise en place. Les LABA peuvent aussi être combinés aux corticostéroïdes inhalés (*Inhaled corticosteroids – ICS*).

Pour les patients du groupe D, on préférera commencer directement avec la combinaison LABA + LAMA, auxquels pourra se rajouter les ICS si le traitement n'est pas assez fort. Le traitement pourra encore être modifié en incluant l'utilisation du roflumilast si le ratio CVF/CV est inférieur à 0,5 ou des macrolides si le patient n'est plus fumeur. (Mirza and al. 2018)

L'utilisation des LAMA et LABA génère une bronchodilatation vise à libérer les voies respiratoires en ciblant les récepteurs β 2-adrénrgiques pour relaxer les bronches et récepteurs muscariniques pour diminuer leur contraction (Melani 2015)

Les ICS agissent sur l'inflammation en modérant l'activation de multiples gènes pro-inflammatoires via le recrutement de HDAC, qui empêche l'acétylation des histones et l'expression de ces gènes pro-inflammatoires. Cependant, dans la BPCO, les résistances aux traitements ICS sont fréquentes et leur utilisation à des doses élevées peut générer des effets indésirables comme des pneumonies (Barnes 2010; 2013).

Les macrolides, comme l'azithromycine, sont des antibiotiques dont l'efficacité a été démontrée pour diminuer la fréquence des exacerbations en diminuant les chances d'une infection pulmonaire. Comme pour tout antibiotique, des souches bactériennes résistantes peuvent apparaître (Albert and al. 2011). Ceci implique des précautions dans leur utilisation pour éviter de devoir faire face à des infections ensuite intraitables par antibiotiques.

Le roflumilast est un anti-inflammatoire qui inhibe la phosphodiesterase (PDE) de type 4. Son utilisation réduit les exacerbations chez les patients montrant des formes sévères de la BPCO (Wedzicha, Calverley, and Rabe 2016)

Après les possibilités pharmacologiques, trois types d'interventions chirurgicales sont envisageables pour améliorer les fonctions respiratoires des patients.

-La chirurgie de réduction du volume pulmonaire a pour but d'augmenter mécaniquement l'efficacité des muscles respiratoires en retirant certaines parties du poumon afin de réduire l'hyperinflation. Cette procédure améliore le volume d'expiration et la fréquence des exacerbations. (Martinez and al. 1997; Criner and al. 1998; Gr and al. 2007).

-La bullectomie a pour objectif de retirer les parties du poumon touchées par l'emphysème, qui ne participent plus aux échanges gazeux, cette procédure permet une diminution de la dyspnée et augmente la tolérance à l'exercice mais est contre-indiquée chez les patients avec de l'hypertension pulmonaire ou de l'emphysème sévère (Marchetti and Criner 2015).

-Enfin, la transplantation pulmonaire a pour objectif de remplacer l'organe touché. Une transplantation simple ou double est possible. Les doubles greffes apportent de meilleures améliorations en termes de survie (Thabut and al. 2008). Les possibilités de transplantation sont limitées par le nombre de donneurs. Les complications possibles comprennent les rejets de

greffe, les infections opportunistes, les maladies lymphoprolifératives et les bronchiolites oblitérantes (Theodore and Lewiston 1990).

Enfin, dans la gestion des comorbidités, il est précisé que patients présentant des maladies cardiovasculaires ne doivent pas voir leur traitement affecté par le diagnostic de la BPCO, par exemple, l'utilisation des bêta bloquants ne doit pas être interrompue (Dransfield and al. 2008). Il est important de rappeler que la plupart des décès dans la BPCO sont liés aux cancers pulmonaires et atteintes cardiovasculaires, la prise en charge de ces maladies est donc généralement prioritaire vis-à-vis de la BPCO.

b) Perspectives de traitement

La recherche de nouveaux traitements comprend plusieurs aspects, dans un premier temps, il s'agit d'améliorer les classes thérapeutiques déjà existantes, pour une meilleure efficacité, ou des effets secondaires moins importants. Il faut aussi miser sur l'identification de nouvelles cibles génétiques ou de mécanismes physiopathologiques impliqués dans la maladie qui pourraient être exploités par des traitements.

De nouvelles classes de glucocorticoïdes, d'agonistes β 2-adrénergiques, d'inhibiteurs des phosphodiesterases et d'inhibiteurs de protéases sont à l'étude.

Parmi les nouvelles classes de traitements envisagées, on retrouve des bronchodilatateurs à double action muscarinique et β 2-adrénergique (MABA), des composés anti-inflammatoires comme les inhibiteurs de Janus-kinase (JAK), les inhibiteurs de MAPK, les inhibiteurs de phosphoinostol-3 kinase (PI3K) ou de NF- κ B. Il existe aussi des molécules qui vont agir directement au niveau des cytokines au lieu de viser leurs voies de signalisation, de même qu'au niveau des modificateurs de chimiokines ou de leurs récepteurs. L'intérêt des sénolytiques est aussi à l'étude, vu que les mécanismes de la BPCO peuvent s'apparenter à un vieillissement accéléré du poumon. Les composés pouvant ralentir le vieillissement présentent donc un potentiel intéressant. En plus des traitements antibiotiques déjà en place, les traitements antiviraux pourraient aussi être bénéfiques pour les patients, les infections virales étant aussi responsables des exacerbations. Pour finir, les composés anti-fibrotiques aidant à la

régénération pulmonaire pourraient permettre de prendre en charge les lésions tissulaires autrement que par la chirurgie (Lo Bello and al. 2020)

Même si l'efficacité n'est pas encore démontrée pour toutes ces classes, l'arrivée de nouvelles options de traitement devrait permettre une approche de plus en plus personnalisée dans la prise en charge des patients afin de choisir les molécules les plus susceptibles de fonctionner, éviter les expositions à risque et s'adapter selon l'évolution des symptômes.

7. Voie de signalisation JAK/STAT comme nouvelle cible thérapeutique ?

a) La voie de signalisation JAK/STAT

La voie de signalisation JAK/STAT fait appel aux interactions entre les 4 membres possibles de la famille JAK (JAK1, JAK2, JAK3 et Tyk2) et les 7 membres possibles de la famille STAT (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b et STAT6) (Schindler, Levy, and Decker 2007; Murray 2007). Le mécanisme d'activation de cette voie est décrit dans la **Figure 7**.

Brièvement, les JAK sont associées à différents récepteurs membranaires dont l'activation dépend généralement de la liaison avec des cytokines de la famille des interférons ou des interleukines. En présence de la cytokine, les sous-unités du récepteur portant les protéines JAK vont se rapprocher, les JAK sont phosphorylées et vont phosphoryler à leur tour le domaine tyrosine intracellulaire du récepteur, permettant le recrutement et la phosphorylation des protéines STAT présentes dans le cytoplasme. Ces STAT, une fois activées, vont se dimériser et rapidement se transloquer au noyau pour se fixer directement à l'ADN sur les promoteurs de la transcription et moduler l'expression des gènes cibles selon le type de STAT qui a été mobilisé (Haan and al. 2006).

La signalisation cellulaire revient à l'état normal grâce à l'action de phosphatases qui vont déphosphoryler STAT, mais aussi grâce à des séquences d'export nucléaire (NES). Un rétrocontrôle médié par les protéines SOCS (*Suppressor Of Cytokine Signaling proteins*) permet de rétablir la signalisation basale en empêchant d'autres activations de STAT. Ceci est fait en se liant aux récepteurs impliqués pour empêcher la transduction du signal (Mustelin, Vang, and Bottini 2005; Nakahira and al. 2007 ; Alexander and Hilton 2004; McBride and

Reich 2003). Les effets biologiques qui découlent de l'activation de la voie JAK/STAT dépendent de la cytokine activant la voie, mobilisant des protéines JAK et STAT différentes.

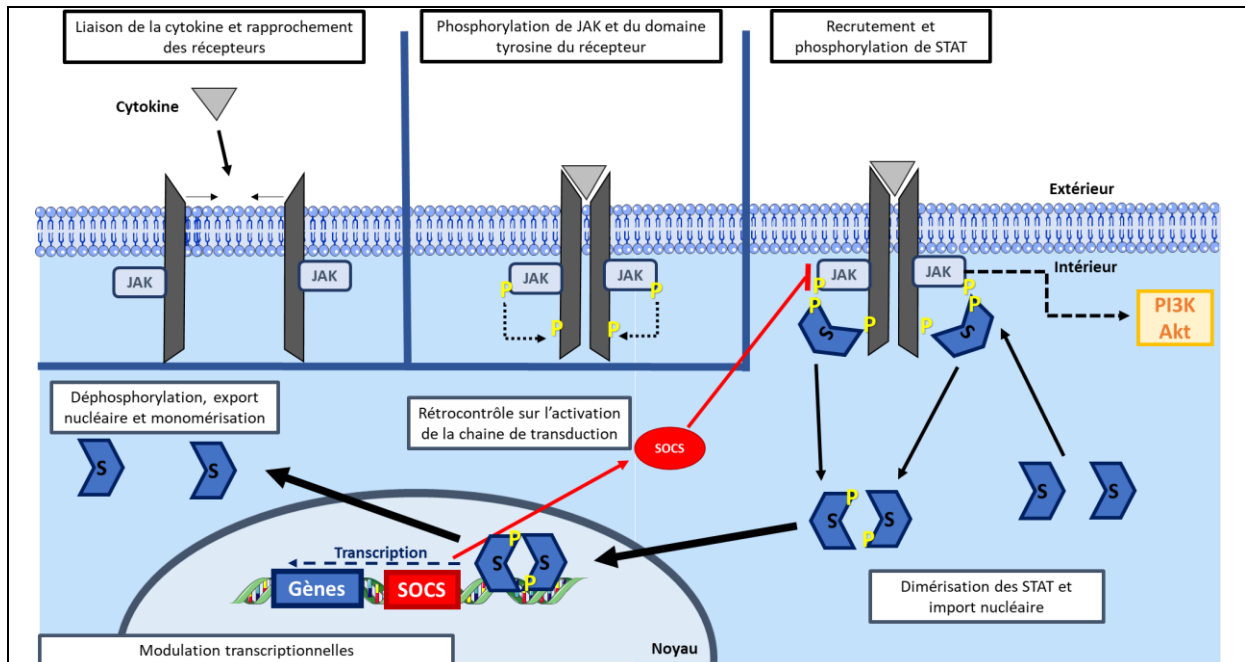


Figure 7 : La voie de signalisation JAK/STAT (adapté de Haan and al. 2006 et de Yan and al. 2018)

Les récepteurs s'agrègent après la liaison avec la cytokine, la protéine JAK est alors autophosphorylée et va aussi phosphoryler le domaine tyrosine du récepteur, permettant de recruter les protéines STAT, qui vont à leur tour être phosphorylées par JAK. Les STAT vont ensuite pouvoir se dimériser et être importées au noyau pour mener leur action de modulation transcriptionnelle en se fixant sur le promoteur de leur gène cible. STAT est ensuite déphosphorylée, exportée du noyau et retourne à l'état de monomère en attendant la prochaine activation. Un rétrocontrôle de l'activation de la voie de signalisation est effectué par les protéines SOCS par fixation directement au niveau du complexe JAK-récepteur, empêchant la transduction du signal.

b) Implications de JAK/STAT dans la BPCO

La voie JAK/STAT est mobilisée chez les fumeurs et les patients présentant une BPCO. Le niveau d'activation dans ces groupes est plus élevé, comparé à un groupe de non-fumeurs (Yew-Booth and al. 2015). Ce sont STAT1 et STAT3 qui sont activées dans les tissus pulmonaires de patients BPCO, où la phosphorylation des STAT est augmentée. Aussi, il a été noté une augmentation des phosphorylations de STAT2 dans les macrophages des fumeurs, et une augmentation de STAT3. On sait que l'expression de l'IL-6 est augmentée chez les patients BPCO (Eickmeier and al. 2010), et que son activation peut être régulée par l'activation de STAT3 (Murray 2007). L'activation de STAT3 est donc en partie responsable de la réponse inflammatoire observée dans la pathologie. Cette augmentation de l'activation de STAT est à

attribuer à l'exposition à la fumée de cigarette. Plusieurs études font état de son rôle dans l'activation de cette voie.

Dans une lignée de macrophages murins, l'activation de la voie JAK2/STAT3 par l'exposition des cellules à la fumée de cigarette a montré une implication dans la polarisation des macrophages vers un phénotype M2 (Yuan and al. 2014). L'exposition au CSE augmente l'expression de marqueurs et de cytokines de type M2 et diminue l'expression des marqueurs et cytokines M1. Ces changements sont inhibés par l'utilisation d'un inhibiteur de STAT3, confirmant l'implication de cette voie dans ce processus.

Dans un modèle de BPCO chez des rats exposés à du CSE et du LPS, une augmentation de production de cytokines pro-inflammatoires est mesurée (IL-1 β , IL-6, TNF- α), comme une augmentation du TGF- β alors que l'IL-10 diminue. Une augmentation de la phosphorylation de JAK1, JAK2, STAT3 et STAT5 est notée dans les cellules épithéliales des animaux. Il a aussi été observé une diminution d'expression de SOCS1 et SOCS3, censés avoir une action de rétrocontrôle sur le l'IL-6R, qui permet la production des gènes dépendants de l'IL-6 et donc une réponse inflammatoire.

Toujours dans un modèle de souris cette fois, il a été montré que l'ergostérol inhibe la production des cytokines pro-inflammatoires dépendantes de l'activation de la voie JAK3/STAT3 et de la voie NF- κ B après une stimulation avec de la fumée de cigarette (Huan and al. 2017).

Des travaux de notre équipe sur les cellules épithéliales pulmonaires ont aussi montré l'activation de JAK/STAT par la fumée de cigarette associée au LPS et son inhibition par le roflumilast, qui empêche la libération de cytokines pro-inflammatoires. Entre autres, la combinaison du CSE + LPS active STAT2, STAT3, STAT5a, STAT5b et STAT6 et augmente la production de l'IL-8/CXCL8, de MCP-1/CCL2 et de GRO- α /CXCL1. L'utilisation du roflumilast N-Oxide diminue l'activation des STAT et a partiellement inhibé la libération des cytokines induites par le CSE et LPS (Victoni and al. 2014).

Dans l'ensemble, les données de la littérature convergent vers l'idée que la voie de signalisation JAK/STAT joue un rôle non négligeable dans les paramètres de la BPCO de par son implication dans les mécanismes de réponse à la fumée de cigarette, qui est le principal facteur de risque de cette pathologie. Selon les études et les modèles, les cytokines reliées à l'activation de

JAK/STAT varient, montrant que les mécanismes d'activation de cette voie par la fumée de cigarette doivent encore être précisés. Développer et tester des outils pour cibler spécifiquement cette voie pourrait contribuer à la recherche de traitements contre la BPCO. C'est dans cette optique que les travaux présentés plus loin ont été menés.

A. Hypertension pulmonaire

1. Définition

L'hypertension pulmonaire (HTP) est une maladie rare, mais aux manifestations sévères qui se caractérise par une augmentation des résistances vasculaires pulmonaires qui engendre une augmentation de la pression artérielle pulmonaire moyenne (PAPm) au-delà de 20mmHg au repos. La valeur moyenne d'un individu sain est de 14 ± 3.3 mmHg au repos (Simonneau and al. 2019a). Chez les patients présentant une hypertension artérielle pulmonaire (HTAP), on note une HTP pré-capillaire ≤ 15 mmHg et d'une résistance vasculaire pulmonaire $>$ à 3 unités de Wood., contre 5-12mmHg et 2 unités de Wood chez une personne saine (Hoeper, Bogaard, and al. 2013).

Ces changements au niveau des artères pulmonaires se manifestent par différents symptômes, qui ne sont pas particulièrement spécifiques à la maladie, comme un excès de fatigue, une faiblesse musculaire, une dyspnée, des douleurs thoraciques, des vertiges et possiblement de la toux. Dans les stades avancés de la maladie, une insuffisance cardiaque droite se développe, pouvant conduire à terme au décès des patients. (Frost and al. 2019)

2. Étiologie

L'HTP se classifie en 5 groupes, définis selon leur étiologie.

Dans le groupe I, l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) se trouve la forme la plus sévère de la maladie. Dans le groupe II, l'HTP associée à une cardiopathie est la forme la plus répandue. Le groupe III rassemble les HTP associées aux maladies pulmonaires et à l'hypoxie. Le groupe IV comprend les HTP associées aux maladies thromboemboliques. Le groupe V rassemble les HTP liées à des facteurs incertains (Galiè and al. 2015; Simonneau and al. 2019a).

Dans le groupe I, les mutations du gène *BMPR2* (*Bone morphogenic protein receptor 2*) représentent 75% des HTAP familiales et 15% des HTAP sporadiques. D'autres mutations ont pu être mises en évidence avec des fréquences plus faibles (Morrell and al. 2019). L'utilisation de certaines drogues comme l'aminorex, la fenfluramine la dexfenfluramine ou le benfluorex, utilisées pour leurs propriétés anorexigènes, est aussi responsable d'HTAP (Simonneau and al.

2019b; Montani and al. 2012; Savale and al. 2012; 2014). L'HTAP peut être associée à d'autres pathologies, comme les maladies du tissu connectif, l'hypertension portale, l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), ou la schistosomiase (Galiè and al. 2015; Simonneau and al. 2019b). D'après les chiffres de la cohorte française, en 2006, les formes les plus communes d'HTAP sont l'HTAP idiopathique (39,2%), l'HTAP liée à une maladie du tissu connectif (15,3%), l'HTAP liée à des maladies cardiaques congénitales (11,3%), l'HTAP liée à une hypertension portale (10,4%), l'HTAP anorexigène (9,5%), HTAP associée au VIH (6,2%) et l'HTAP familiale (3,9) et certaines HTAP avec deux facteurs cumulés (4,2%) (Humbert and al. 2006) .

Dans le groupe II, la prévalence d'HTP augmente avec la sévérité de la cardiopathie associée. Dans les formes les plus sévères, jusqu'à 70% de prévalence d'HTP ont pu être observés chez les patients (Badesch and al. 2009; Oudiz 2007; Vahanian and al. 2012). En revanche, aucune signature génétique ne semble associée (Oudiz 2007).

Les patients du groupe III présentent fréquemment des HTP modérées associées à la BPCO, mais les formes graves sont rares (Seeger and al. 2013; Hurdman and al. 2013). Chez les patients fumeurs présentant un syndrome emphysème-fibrose, une autre pathologie liée à la consommation de tabac, la prévalence d'HTP est accrue (Cottin and al. 2005; Ahmad, Cordier, and Cottin, 2015). En plus des pathologies associées, on détecte dans ce groupe des polymorphismes génétiques au niveau du gène du transporteur de la sérotonine (5-HTT) (Eddahibi and al. 2003).

Au sein du groupe IV, on trouve une prévalence accrue de l'HTP chez les patients montrant une embolie pulmonaire. Ce critère n'est pas un paramètre suffisant pour déclencher l'HTP, seulement 1 à 4% des patients ayant un épisode sévère présentent aussi ensuite une HTP (Pengo and al. 2004).

Pour finir, au vu de la forte hétérogénéité du groupe V, il n'a pas été possible de faire des rapprochements vis-à-vis de possibles facteurs de risques ou caractéristiques génétiques.

3.Épidémiologie

La prévalence de l'HTP représente une centaine de cas par million d'habitants. Aux États-Unis, cette pathologie est responsable de 45 à 123 décès sur 1 million (Galiè and al. 2015). Il n'y a pas d'étude comparative des prévalences entre les différents groupes d'HTP, mais il est admis que le groupe II est le plus fréquemment représenté. L'HTAP, plus rare, mais plus sévère, montre une prévalence relativement faible, en moyenne 15 cas par million d'habitants, avec une variation assez importante selon les zones géographiques étudiées. L'incidence varie en 2,5 et 7 cas par an et par million d'habitants (Peacock and al. 2007; Humbert and al. 2006).

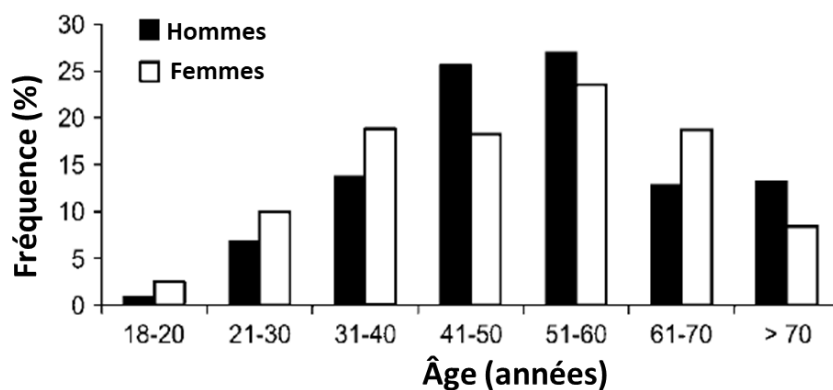
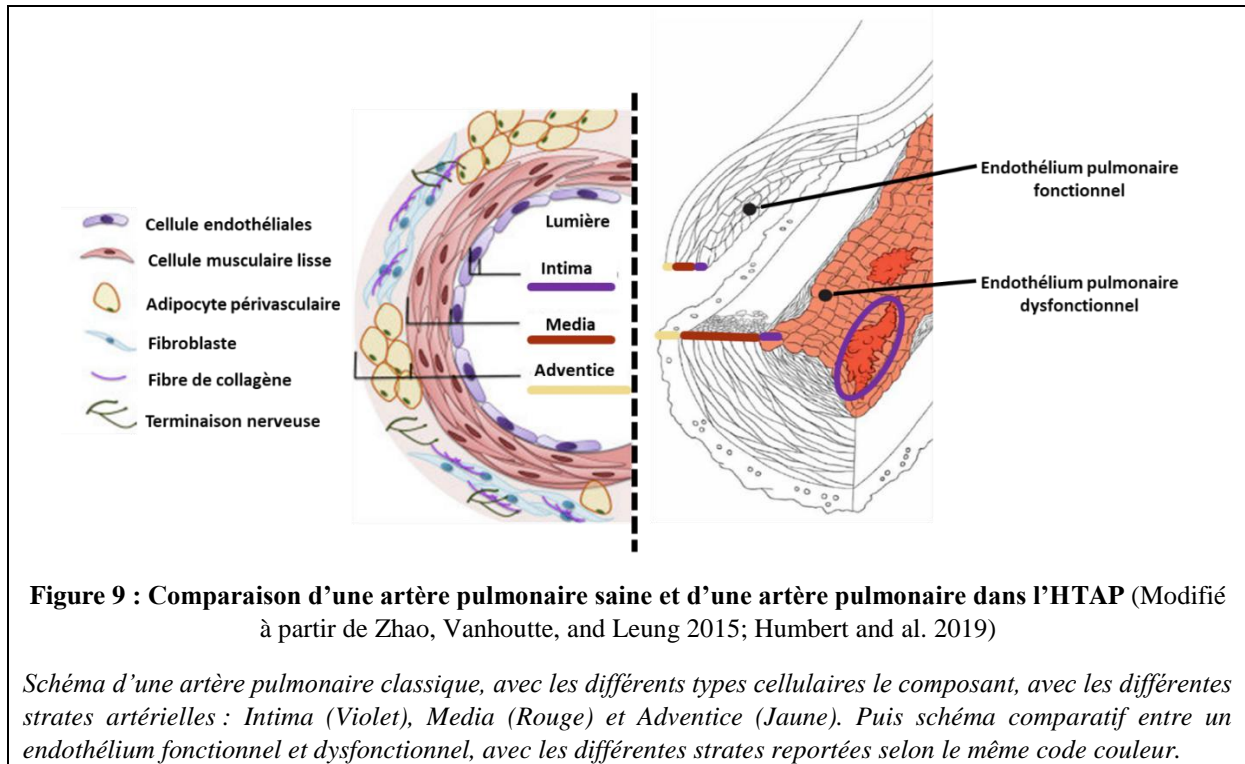


Figure 8 : Distribution des patients avec une HTAP, selon l'âge et le sexe
(Modifié à partir de Humbert and al. 2006)

Comme on peut le voir dans la **Figure 8**, cette maladie touche principalement les adultes, 90% des malades ont plus de 30 ans. La médiane d'âge se situe autour des 50 ans. Dans l'ensemble, les femmes sont plus touchées que les hommes (ratio 2:1 en moyenne) (Peacock and al. 2007; Humbert and al. 2006). Cette différence pourrait être liée au métabolisme des œstrogènes, suspectés d'être impliqués dans la pathogenèse de l'HTAP (Docherty and al. 2018).

Des formes pédiatriques d'HTAP existent, elles sont plus rares que les formes « adultes » avec une prévalence et une incidence de respectivement 4,4 et 0,7 cas / millions d'enfants (Ivy and al. 2013; 2013).

4. Physiopathologie



L'HTAP se caractérise par 3 principaux types de changement observés au niveau des artères : une hyperréactivité des artères pulmonaires, un remodelage tissulaire progressif et une inflammation importante au niveau vasculaire (Huertas and al. 2020; Hu and al. 2020; Galiè and al. 2015) Comme décrit dans la **Figure 9**, une artère pulmonaire peut être divisée en 3 couches : Intima, média et adventice. Dans l'artère pulmonaire d'un malade de l'HTAP, chacune de ces couches va être affectée, résultant en une artère plus épaisse et moins fonctionnelle du fait des différentes dysfonctions.

Parmi les paramètres responsables de l'hyperréactivité artérielle, on note que les flux calciques sont augmentés. En effet, l'hypoxie présente dans l'HTP peut induire diminution d'expression des canaux potassiques, ce qui provoque une dépolarisation des cellules musculaires lisses de l'artère pulmonaire (CMLAP) et la libération de calcium intracellulaire, augmentant la capacité de contraction des cellules (Sommer et al. 2008; Yuan and al. 1998). D'ailleurs, des mutations des canaux calciques sont décrites dans les formes familiales de l'HTP, ce qui indique que le dysfonctionnement peut aussi avoir d'une origine génétique (Ma and al. 2013).

Un important déséquilibre entre les facteurs vasoconstricteurs et vasodilatateurs est présent chez les patients. Les niveaux d'endothéline, aux effets vasoconstricteurs, sont plus élevés chez les patients de l'HTP. Ce niveau a été corrélé avec la sévérité de la maladie (Montani and al. 2007; Rubens and al. 2001)

En parallèle, les vasodilatateurs comme la prostacycline sont diminués (Christman and al. 2010). Cela s'explique par une baisse de l'expression de la prostacycline synthase et de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) chez les patients, éléments nécessaires à la production de la prostacycline (Tuder and al. 1999). Comme la prostacycline a déjà démontré des propriétés anti-inflammatoires chez les macrophages humains, sa diminution d'expression pourrait contribuer au maintien d'un environnement inflammatoire (Wang, Vu, and Poloso 2017).

Parmi les vasodilatateurs, les niveaux de monoxyde d'azote (NO) sont diminués chez les patients (Giaid and Saleh 1995). Le niveau de NO régule la quantité de guanosine monophosphate cyclique (GMPc) disponible. La quantité de GMPc dépend aussi des phosphodiéstérases qui convertissent le GMPc en GMP, ainsi que des guanylate cyclases qui forment le GMPc à partir de guanosine triphosphate (GTP) (Lindman and Chakinala 2010; Zsófia, Martina, and Andras 2020). Les changements de disponibilité du NO semblent être médiés par une dérégulation de l'arginase, libérée par les érythrocytes. L'arginase dégrade l'arginine, un substrat nécessaire à la synthèse du NO (Morris et al. 2005).

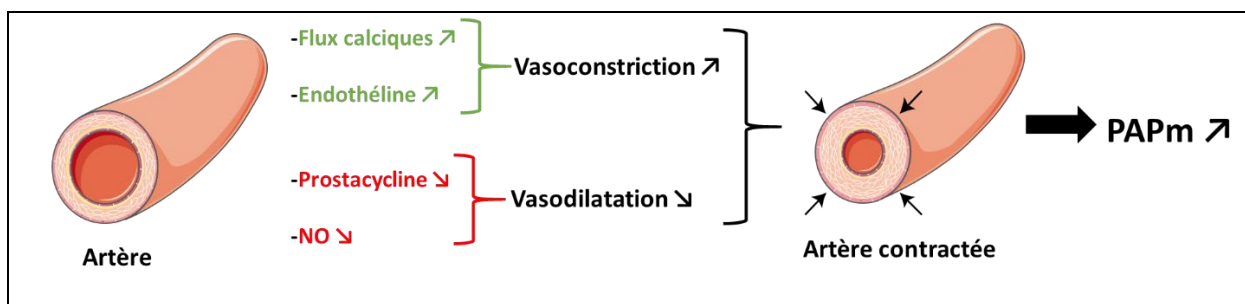


Figure 10 : Changements amenant à la contractilité augmentée des artères pulmonaires

L'augmentation des quantités de calcium intracellulaire et la production d'endothéline accrue jouent en faveur de la vasoconstriction accrue alors que les facteurs vasodilatateurs comme la prostacycline ou le monoxyde d'azote sont diminués, ce qui génère un signal de vasodilatation diminué, qui ne peut pas compenser la vasoconstriction accrue. En augmentant la contraction des artères, la pression artérielle pulmonaire augmente.

En plus des signaux régulant le niveau de contraction des CMLAP, les changements observés à ce niveau sont aussi à attribuer à une importante muscularisation de l'artère, due à la prolifération incontrôlée de ces cellules.

Tout d'abord, les mutations et dérégulations du gène de BMPR2 semblent jouer un rôle important. Dans les poumons des malades, on retrouve des quantités grandement diminuées de la protéine BMPR2 (Lavoie and al. 2014; Atkinson and al. 2002). Cette perte d'expression peut notamment être due à une dérégulation par le TNF- α et est responsable de la prolifération accrue des CMLAP et des cellules endothéliales de l'artère pulmonaire (CEAP). Cette prolifération participe au développement de la pathologie (Long and al. 2015; Hurst and al. 2017). L'endothéline, qui est surexprimée, va aussi jouer un rôle dans la dérégulation de la signalisation de BMPR2 dans les CMLAP et augmenter leur prolifération (Maruyama and al. 2015). Dans des modèles murins d'HTAP d'origine génétique ou d'HTAP induite, l'injection de BMP9, un des ligands de cette signalisation, compense l'absence de BMPR2 et montre un effet protecteur vis-à-vis du développement de la pathologie chez les animaux (Long and al. 2015; Chen and al. 2017).

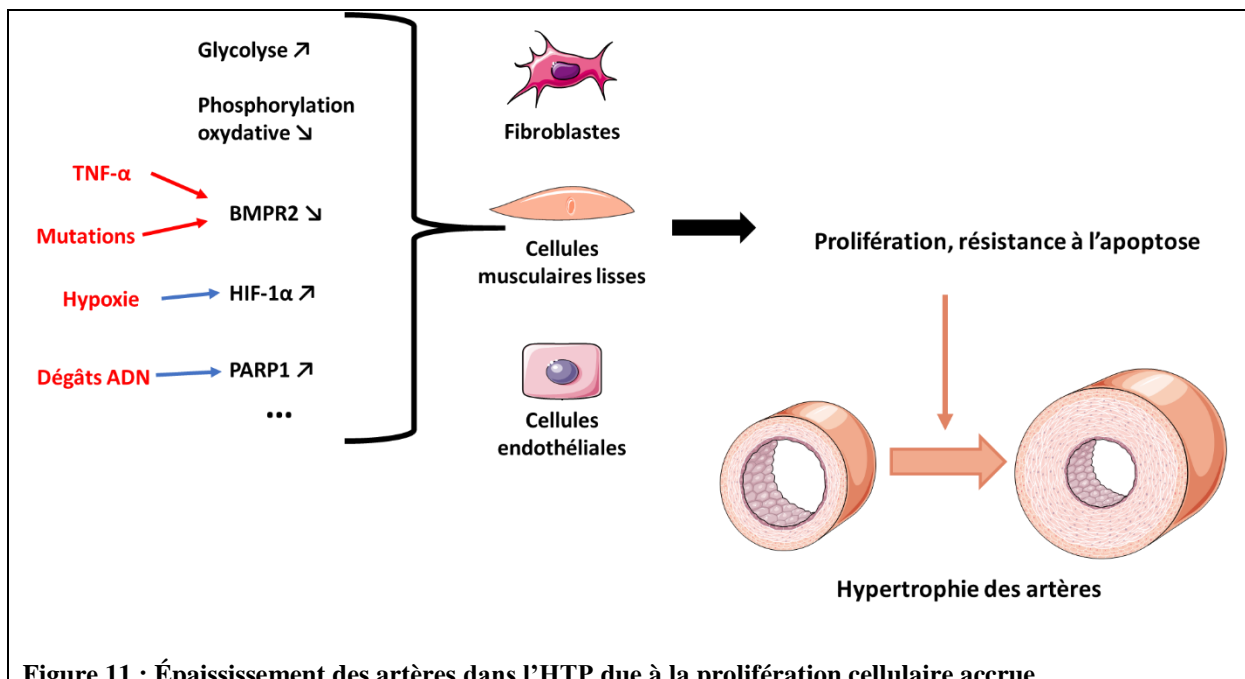


Figure 11 : Épaississement des artères dans l'HTP due à la prolifération cellulaire accrue

Les différentes dérégulations observées dans les modèles l'hypertension pulmonaire aboutissent au développement d'un phénotype hyperprolifératif chez les cellules musculaires lisses, cellules endothéliales et fibroblastes de l'artère pulmonaire. L'épaississement ainsi généré de l'artère contribue à l'augmentation des résistances vasculaires et donc à 'augmentation de la pression artérielle.

Des régulations épigénétiques ont aussi été mises en évidence. Entre autres, l'hyperméthylation de la superoxyde dismutase (SOD2) est responsable d'une diminution de son expression dans l'HTAP. La diminution de SOD2 résulte en une diminution de production de peroxyde d'hydrogène, ce qui active un signal d'hypoxie médié par le facteur induit par l'hypoxie (HIF-

1 α). La concentration accrue de HIF-1 α augmente la prolifération des CMLAP et active la vasoconstriction (Bonnet and al. 2006).

Dans les CMLAP, les CEAP et les fibroblastes adventitiels, des changements métaboliques se produisent. La répression de la phosphorylation oxydative et l'activation de la glycolyse favorisent la prolifération cellulaire (Marsboom and al. 2012; Piao and al. 2010; Kim and al. 2006 ; Li et al. 2016; Fijalkowska et al. 2010; Diebold et al. 2015).

Ce phénotype prolifératif et résistant à l'apoptose est renforcé par une activation de la poly (ADP-ribose) polymérase-1 (PARP-1). Cette enzyme a pour rôle de permettre la réparation des dommages faits à l'ADN et oriente les cellules vers phénotype de « survie » qui empêche leur entrée en apoptose (Ranchoux and al. 2016; Meloche and al. 2014).

Ce phénotype est attribué à des changements épigénétiques, notamment une augmentation d'activité de HDAC et l'expression diminuée du microARN124 (miR124). Ce miARN régule la prolifération et migration des fibroblastes, mais aussi leur production de MCP-1/CCL2, une chimiokine destinée au recrutement des monocytes (Wang and al. 2014).

Les cellules endothéliales subissent des changements dans l'HTAP. L'augmentation de la PAPm génère une pression mécanique qui s'applique sur les cellules endothéliales. Ces cellules sont normalement capables de s'adapter à ce stress mécanique en se déformant dans le sens du stress appliqué. En perdant leur forme cubique pour adopter une morphologie plus allongée, elles permettent normalement de faire baisser la pression intra-artérielle. Dans l'HTAP, les CEAP isolées des patients et cultivées *in vitro* ont une capacité d'adaptation plus tardive vis-à-vis de ce stress, ce qui laisse place à des dégâts au niveau cellulaire, mais sans forcément induire d'apoptose (Szulcek and al. 2016; Abe and al. 2016).

Au niveau de ces cellules endothéliales, le nombre de péricytes est augmenté, ce qui pourrait être lié à la production d'IL-6 et FGF-2 par les cellules endothéliales (Ricard and al. 2014). Leurs fonctions semblent altérées, car les péricytes isolés de ces artères montrent une incapacité à s'associer aux cellules endothéliales *in vitro*, comme ils devraient le faire (Yuan and al. 2015). Cette association péricyte-cellule endothéliale sert normalement à fournir un support structural, mais aussi à la régulation de leur prolifération et migration (Ribatti, Nico, and Crivellato 2011). Les péricytes sont aussi impliqués dans la réponse inflammatoire, en exprimant des chimiokines et des molécules d'adhésion pour recruter des leucocytes (Rudziak, Ellis, and Kowalewska 2019).

Dans les cellules endothéliales de la microvasculature de l'intestin, l'inflammation induit une transition endothélio-mésenchymateuse (*EndoMT*) qui contribue à l'installation de la fibrose. Cette transition est initiée par l'exposition à l'IL-1 β , au TNF- α et au TGF- β (Rieder and al. 2011). Ce processus d'EndoMT, présent au niveau pulmonaire, contribue au développement de l'HTAP. Les cellules passant par cette transition EndoMT sous-expriment les marqueurs vasculaires et surexpriment les marqueurs mésenchymateux. Elles surexpriment le collagène et l'actine, ainsi que le TNF- α , l'IL-6 et l'IL-8 en plus d'aider à la transmigration des cellules immunitaires (Good and al. 2015).

Le recrutement, l'activation et les interactions avec les différentes cellules de l'immunité innée ou acquise constituent un pan majeur de la pathogenèse de l'HTP. Au niveau des poumons de patients, les monocytes, les macrophages, les mastocytes, les cellules dendritiques et les lymphocytes sont retrouvés de façon plus importante au niveau des vaisseaux sanguins (Savai and al. 2012). Cet afflux de cellules immunitaires génère une réponse inflammatoire caractérisée par la production de cytokines, chimiokines et facteurs de croissance.

On retrouve par exemple des augmentations de l'IL-1 β , l'IL-2, l'IL-4, l'IL-6, l'IL-8/CXCL8, l'IL-10, l'IL-12, le TNF- α , la CX3CL1, la MCP-1/CCL2 et la CCL5 (Humbert and al. 1995; Soon and al. 2010; Perros and al. 2007; Sanchez and al. 2007; Dorfmueller and al. 2002). Les cytokines telles que l'IL-6, l'IL-8, l'IL-10 et l'IL-12 sont identifiées comme des facteurs de mauvais pronostic de survie dans la pathologie (Soon and al. 2010). Le criblage des concentrations de grands panels de cytokines permet d'établir des groupes montrant des courbes de survie distinctes (Sweatt and al. 2019).

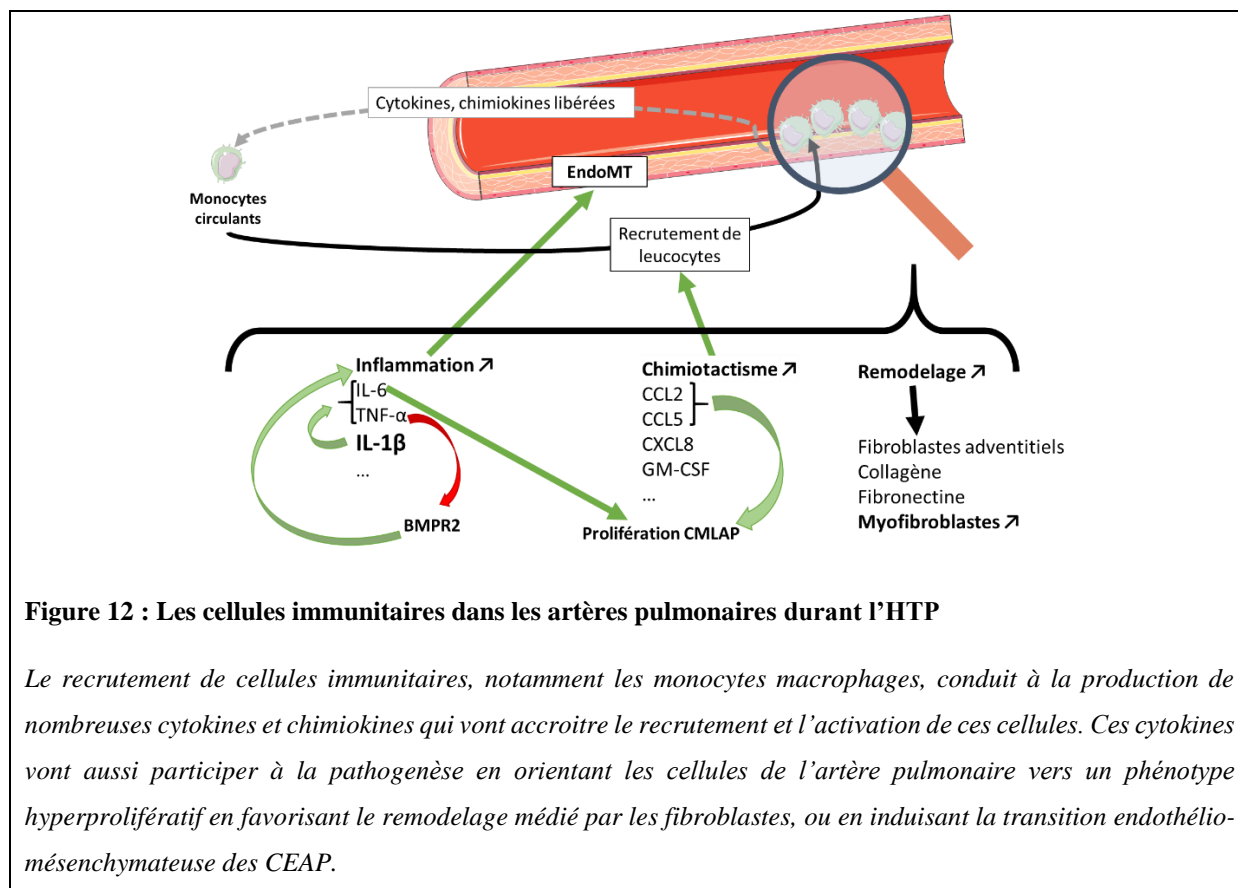
Le rôle des lymphocytes dans la pathologie n'est pas encore totalement défini. L'absence des lymphocytes dans des rats athymiques est responsable d'une HTAP plus sévère (Tamosiuniene and al. 2011; Miyata and al. 2000). À l'opposé, le blocage des lymphocytes T avec des inhibiteurs du leucotriène B4 inhibe l'inflammation périvasculaire empêche la prolifération, la migration et la différenciation des fibroblastes adventitiels (Qian and al. 2015). Il semble néanmoins que les lymphocytes soient capables de produire des auto-anticorps dirigés contre les CMLAP, CEAP et les fibroblastes adventitiels. Le rôle de ces anticorps n'est pas totalement évalué, mais en leur présence, la contraction des CMLAP est augmentée (Bussone and al. 2012; Dib and al. 2012; Terrier and al. 2008; Tamby and al. 2005).

L'IL-6 semble avoir un rôle central dans la pathologie, en effet, les animaux déficients en IL6R ou en IL-6 montrent une protection vis-à-vis de l'HTP induit par hypoxie, empêchant notamment la prolifération des CMLAP. Aussi, le blocage du récepteur à l'IL-6 par des antagonistes réduit l'HTP expérimentale (Tamura and al., 2018; Savale and al. 2009). De même pour le ciblage direct de l'IL-6 avec des anticorps bloquants chez la souris, qui diminue le développement de l'HTAP induite par hypoxie ainsi que le recrutement des macrophages (Hashimoto-Kataoka and al. 2015).

La signalisation de BMPR2 impacte aussi les réponses aux stimuli inflammatoires. Dans les modèles murins hétérozygotes pour BMPR2, les CMLAP produisent des quantités de cytokines plus importantes, notamment d'IL-6 et IL-8 (Soon and al. 2015). L'expression réduite de BMPR2 est associée à la production de GM-CSF, qui permet le recrutement de macrophages et contribue à la progression de l'HTP. Chez les rats, le blocage du GM-CSF par des anticorps montre un effet préventif dans le développement de la maladie (Sawada and al. 2014).

Les interactions entre les macrophages et les CMLAP dépendent des chimiokines CCL2 et CCL5 ainsi que leurs récepteurs CCR2 et CCR5. Le blocage de ces récepteurs diminue la prolifération et de la migration des CMLAP *in vitro* et réduit le développement de l'HTP *in vivo* (Abid and al. 2019). Le recrutement des macrophages dans les modèles d'HTAP en condition hypoxique se fait au niveau interstitiel, mais pas au niveau alvéolaire. Les macrophages alvéolaires déjà présents montrent une réponse pro-inflammatoire même 2 semaines après leur stimulation. A l'opposé, les macrophages interstitiels montrent un profil pro-inflammatoire pendant les premiers jours, avant de basculer sur un phénotype anti-inflammatoire (Pugliese and al. 2017). Ces macrophages interstitiels, recrutés dans le contexte de l'HTAP, pourraient être polarisés vers un phénotype M2.

Les monocytes et macrophages jouent un rôle primordial dans l'installation de la maladie. Dans un modèle murin déplété de sa population monocyttaire, l'accumulation des myofibroblastes, la production de collagène et de fibronectine est réduite. Le remodelage de l'adventice en est diminué et l'augmentation de la PAPm est aussi modérée. (Frid and al. 2006; Žaloudíková and al. 2016).



Les processus d’inflammation et de remodelage sont intimement liés dans l’HTAP. Il y a une corrélation entre la présence des marqueurs de l’inflammation et le développement du remodelage périvasculaire de l’artère (Stacher and al. 2012). Le ciblage des voies de signalisation associées à l’inflammation montre des effets bénéfiques dans les modèles d’HTP, et particulièrement celles liées à l’inflammasome, qui permet les productions d’IL-1 β et d’IL-18 (Voelkel and al. 1994; Kumar and al. 2012; Morisawa and al. 2016). En absence de la protéine adaptatrice ASC, essentielle à l’activation de l’inflammasome, les souris soumises à un stress hypoxique montrent une HTP plus modérée, avec des productions de cytokines, des marqueurs d’hypoxie un remodelage et une muscularisation des artères moins importants (Cero and al. 2015).

L’inflammasome joue un rôle dans de multiples types cellulaires. Il est particulièrement exprimé chez les macrophages, mais on en détecte l’expression chez les CEAP, les CMLAP, les cellules dendritiques, les neutrophiles, et les plaquettes (Guarda and al. 2011; Xiang and al. 2011; Xia and al. 2014; Hottz and al. 2013; De Nardo and al. 2014).

Au vu de connaissances actuelles, le développement de l'HTP est le résultat des interactions entre les cellules structurelles de l'artère pulmonaire (cellules endothéliales, cellules musculaires lisses, fibroblastes, myofibroblastes), qui en plus de leurs propres dysfonctions, vont participer au recrutement et à l'activation des leucocytes (monocytes, macrophages, lymphocytes, neutrophiles...). Ces cellules immunitaires infiltrantes vont participer à la pathogenèse en produisant des cytokines, générant un environnement inflammatoire favorable au remodelage tissulaire. Elles vont donc contribuer au recrutement et à l'activation de nouvelles cellules, mais aussi aggraver les dysfonctions présentes au niveau des cellules structurelles.

5. Diagnostic et pronostic

L'HTP est une maladie de mauvais pronostic, en partie due à des diagnostics souvent tardifs, après les premières manifestations d'insuffisance cardiaque. Différents outils diagnostiques existent et sont utilisés en complémentarité selon un algorithme défini, qui permet de confirmer ou non le diagnostic d'HTP et de définir dans quel groupe le patient se situe (Galiè and al. 2015). Parmi ces outils diagnostiques, on trouve l'électrocardiographie, les tests sanguins et immunologiques, les tests fonctionnels pulmonaires, la mesure des gaz du sang, des exercices cardiopulmonaires, l'échographie transthoracique, la scintigraphie de ventilation-perfusion pulmonaire et la tomographie du thorax. Ces examens peuvent être mis en place suite à l'apparition des symptômes chez une personne sans pathologie associée, mais aussi sur recommandation médicale, dans un but de dépistage chez les personnes présentant déjà des pathologies comme l'hypertension portale ou des cardiopathies congénitales (Frost and al. 2019).

Une fois le diagnostic posé, la sévérité de la maladie est évaluée selon différents critères. On retrouve dans cette évaluation la mesure des paramètres hémodynamiques comme la PAP, mais aussi la mesure de la capacité d'exercice notamment avec la distance de marche à 6 minutes et la mesure de la VO₂max. La dysfonction vasculaire, l'inflammation, le stress myocardique ou l'hypoxie sont aussi pris en compte. L'évolution de la maladie et de l'état général du patient va être déterminant dans l'évaluation de la sévérité, selon si les fonctions cardiaques sont stables ou se détériorent. La survie à 1 an des patients à « faible risque » est supérieure à 95%, tandis que celle des patients à « haut risque » est inférieure à 90% (Galiè and al. 2015).

La **Figure 13** représente la survie stratifiée d'une cohorte de patients HTAP du registre français selon la présence ou non de « critères de faibles risques ». À 5 ans, les patients à faible risque montrent une survie de plus de 90% alors que les patients à haut risque ont une survie inférieure à 40% (Boucly and al. 2017).

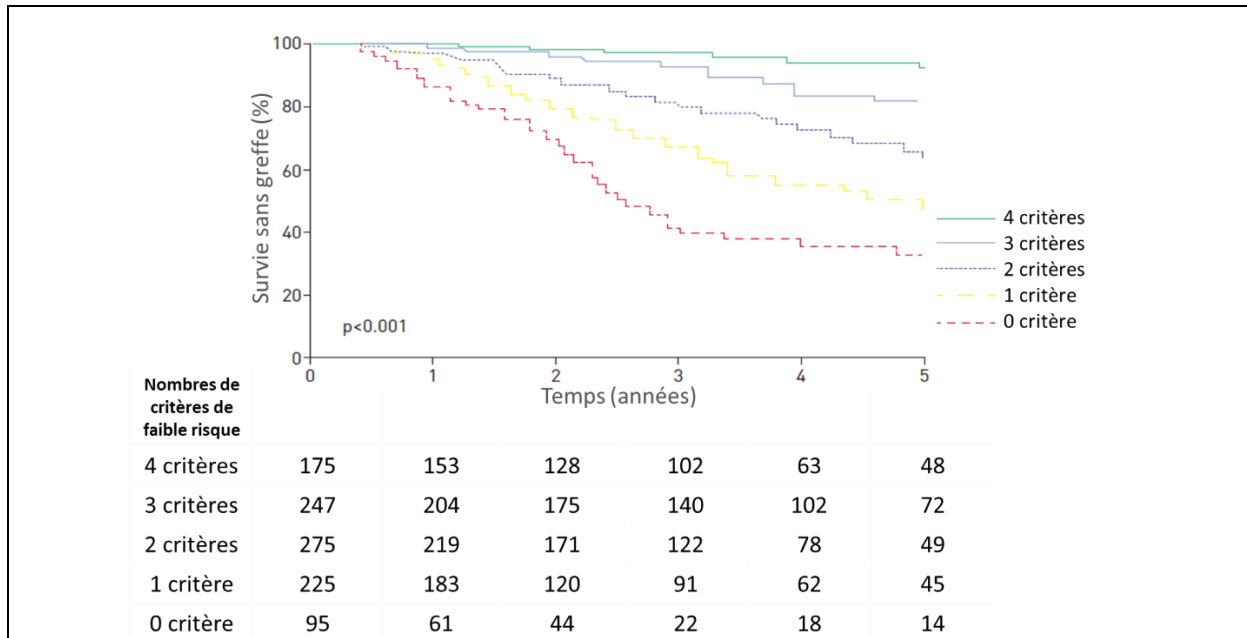


Figure 13: Survie jusqu'à 5 ans en fonction du nombre de la gravité de l'atteinte (Adapté de Boucly and al. 2017)

Survie des patients sans greffe évaluée sur 5 ans. Séparée en fonction du nombre de critères de faibles risques présentés par les patients (Classe I ou II de la New York Heart Association ; distance de marche à 6 minutes > 440 mètres ; pression auriculaire droite cardiaque < 8mmHg ; index cardiaque >2.5L/min/m²). Critères ré-évalués 1 an après le diagnostic.

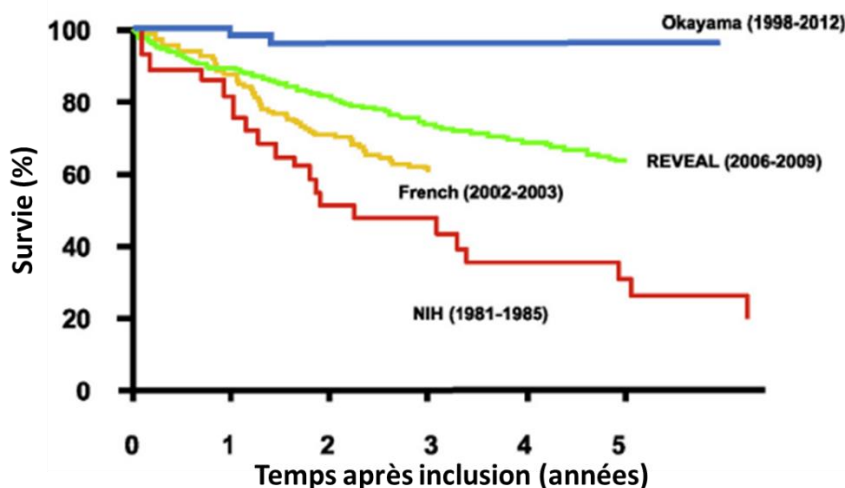


Figure 14 : Survie des patients dans les différentes cohortes de patient HTAP (Matsubara and Ogawa 2014)

Estimation de la survie des patients présentant une HTAP idiopathique ou héréditaire dans différentes cohortes. En rouge est représentée la cohorte du NIH, en orange la cohorte du registre français, en vert la cohorte du registre REVEAL et en bleu la cohorte du centre médical d'Okayama.

Comme on peut le voir dans la **Figure 14**, la survie est variable au sein des cohortes établies dans différents pays et à différentes époques. La cohorte américaine du NIH montre une survie globale très basse, avec une médiane de survie globale à 2,8 ans, et une survie à 5 ans inférieure à 30% (D'Alonzo and al. 1991). À l'opposé, la cohorte japonaise d'Okayama montre une survie à 5 ans de 96% qui descend à 78% après 10 ans (Ogawa, Ejiri, and Matsubara 2014).

6. Traitements et limites

a) Traitements actuels

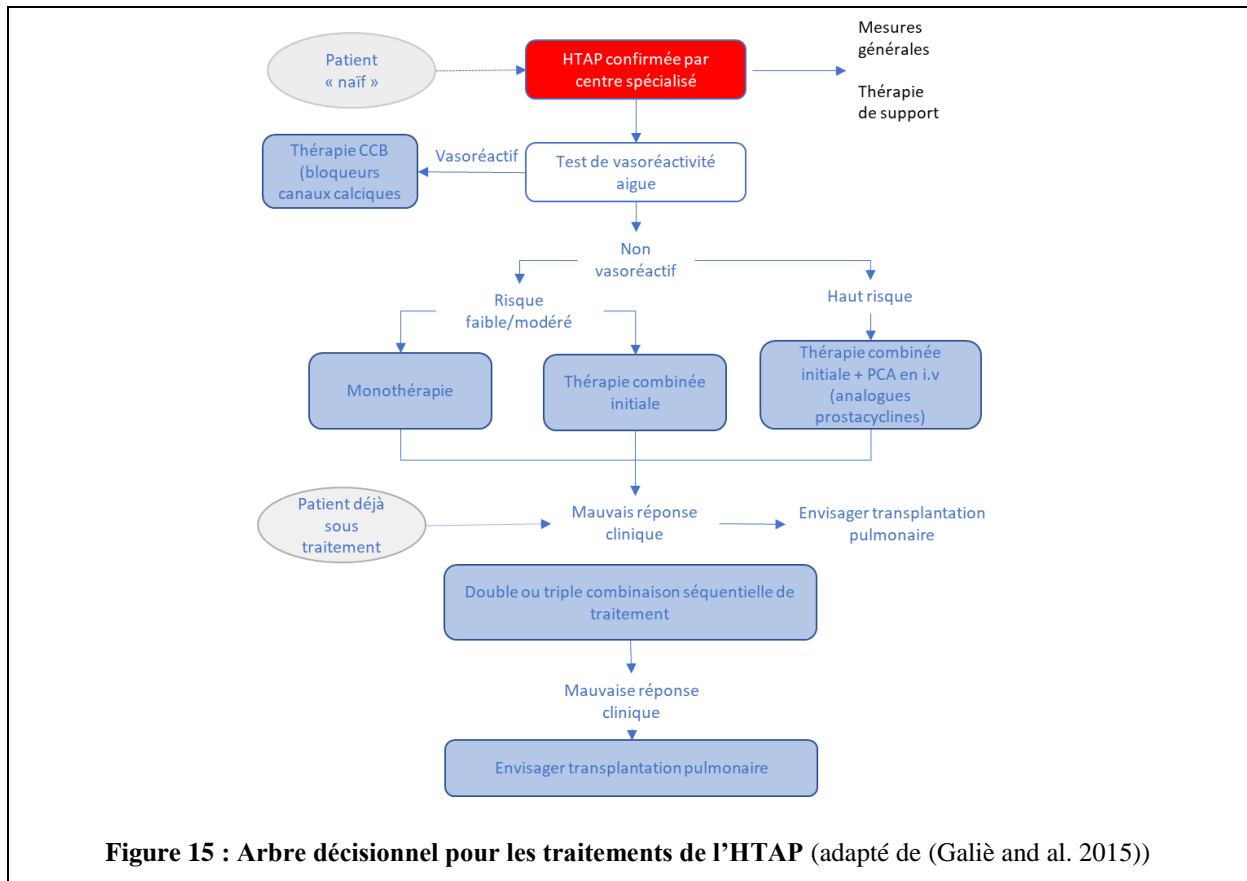
Il n'existe pas de moyen curatif contre l'HTAP. Les traitements ne permettent qu'une amélioration des symptômes chez certains patients. Ils ont pour objectif de rétablir un fonctionnement normal dans plusieurs voies de signalisations liées à la réactivité vasculaire.

Pour décider des traitements, un algorithme permet d'orienter vers les différentes stratégies thérapeutiques (**Figure 15**). Dans un premier temps, la vasoréactivité des patients est mesurée par inhalation de monoxyde d'azote (NO), qui est censé faire baisser la PAPm d'au moins 10mmHg. Les patients répondant à cette procédure seront classés comme « vasoréactifs » et traités avec des inhibiteurs des canaux calciques. Les patients « non-vasoréactifs » seront alors pris en charge avec des traitements qui ciblent trois voies différentes (Humbert and al. 2019; Galiè and al. 2019).

-La voie de la prostacycline est stimulée par l'utilisation des analogues de la prostacycline ou d'agonistes de son récepteur IP, afin d'augmenter son effet vasodilatateur (Del Pozo, Hernandez Gonzalez, and Escribano-Subias 2017).

-La voie du NO est réactivée grâce à l'utilisation d'inhibiteurs de la phosphodiesterase de type 5 et de stimulateurs de la guanylate cyclase. Cette voie utilise du GMPc (forme active) qui est formé à partir de GTP par les guanylates cyclases et qui est transformé en GMP (forme inactive) par les phosphodiesterases. Les différentes drogues utilisées vont donc permettre de maintenir un niveau de GMPc plus élevé pour augmenter son effet vasodilatateur (Chester, Yacoub, and Moncada, n.d.; Zsófia, Martina, and Andras 2020).

-La voie de l'endothéline est en revanche bloquée par l'utilisation d'antagonistes du récepteur à l'endothéline afin de contrer ses effets vasoconstricteurs (Anthony P. Davenport and al. 2016; A. P. Davenport and al. 2018).



Depuis les 15 dernières années, aucune nouvelle cible thérapeutique n'a été validée pour les traitements de l'HTAP, les changements et les progrès observés sont à attribuer aux stratégies thérapeutiques combinant les différents traitements existants (Lajoie and al. 2016; Lajoie and al. 2018).

La seule alternative à ces traitements est la transplantation pulmonaire parfois aussi associée à une transplantation cardiaque. Un échappement thérapeutique est possible, mais la survie post-greffe n'est pas satisfaisante. La survie à 5 ans est de 70% de pour une greffe de poumons et 61% pour une double transplantation cœur et poumons (Brouckaert and al. 2019).

b) Perspectives de traitement

En vue de dénicher de nouvelles cibles thérapeutiques pouvant être mises à contribution dans les traitements de l'HTAP, de nombreux essais cliniques randomisés sont en cours. Des aspects très variés de la biologie humaine sont envisagés, avec des approches au niveau moléculaire, cellulaire, ou systémique.

Le rétablissement de la signalisation de BMPR2, l'inhibition de l'action des histones désacétylases ou de PARP1, des actions sur le métabolisme glucidique et lipidique, l'inhibition de la synthèse des œstrogènes, la compensation du stress hypoxique, l'inhibition des mécanismes liés à la sérotonine, les thérapies par cellules souches autologues ou même la dénervation pulmonaire sont autant de possibilités envisagées et/ou étudiées (Sitbon and al. 2019). Deux axes qui vont plus particulièrement nous intéresser : la régulation de la réponse immunitaire et inflammatoire, ainsi que l'inhibition de l'action de facteurs de croissance impliqués dans la maladie.

Concernant l'aspect immunitaire, cela passe par l'utilisation d'anticorps anti-CD20 pour moduler la population lymphocytaire qui produit des auto-anticorps dans la pathologie. Des essais cliniques sont en cours, et d'après les premiers résultats, leur utilisation améliore la distance de marche à 6 minutes (Zamarian and al. 2021). Pour ce qui est du rôle des facteurs de croissance, les taux de PDGF augmentés chez les patients HTAP sont traités avec un inhibiteur du PDGF. Les patients montrent une amélioration de la distance de marche à 6 minutes ainsi qu'une baisse de la résistance vasculaire. Des patients montrent une stabilisation, voire même une amélioration après les traitements. Cependant, ces inhibiteurs provoquent des effets secondaires graves chez certains patients, ce qui demande une précaution accrue lors de leur prescription (Hoepfer, Barst, and al. 2013). Certains inhibiteurs de tyrosine kinase sont capables de déclencher ou d'aggraver l'HTAP (Montani and al. 2012; Guignabert and al. 2016; Gomberg-Maitland and al. 2010). Ces inhibiteurs restent une piste majeure dans la recherche de traitement et devront être utilisés avec une meilleure connaissance des profils des patients cibles et être évités chez les patients à risque.

Pour l'instant, les essais cliniques concernant les cellules immunitaires se concentrent sur l'action des lymphocytes B au niveau pulmonaire, mais d'autres cellules qui pourraient être ciblées dans une optique thérapeutique. On a évoqué beaucoup de types cellulaires recrutés de façon plus importante au niveau pulmonaire chez les malades. Parmi ces cellules se trouvent les monocytes-macrophages, qui jouent un rôle important dans la mise en place et le maintien de l'inflammation (Frid and al. 2006; Florentin and al. 2018; El Kasmi and al. 2014). Pour les facteurs de croissance, d'autres que le PDGF pourraient être ciblés dans l'HTAP. Un de ces facteurs va particulièrement nous intéresser ici. Il s'agit du facteur de croissance des nerfs (NGF), dont l'implication a déjà été démontrée dans des mécanismes d'inflammation, de

remodelage et d'hyperréactivité artérielle, qui sont particulièrement intéressants dans le contexte de l'HTP (Freund-Michel and Frossard 2008; Cardouat, Guibert, and Freund-Michel 2020).

7. Le NGF comme nouvelle cible thérapeutique ?

a) Le facteur de croissance des nerfs (NGF)

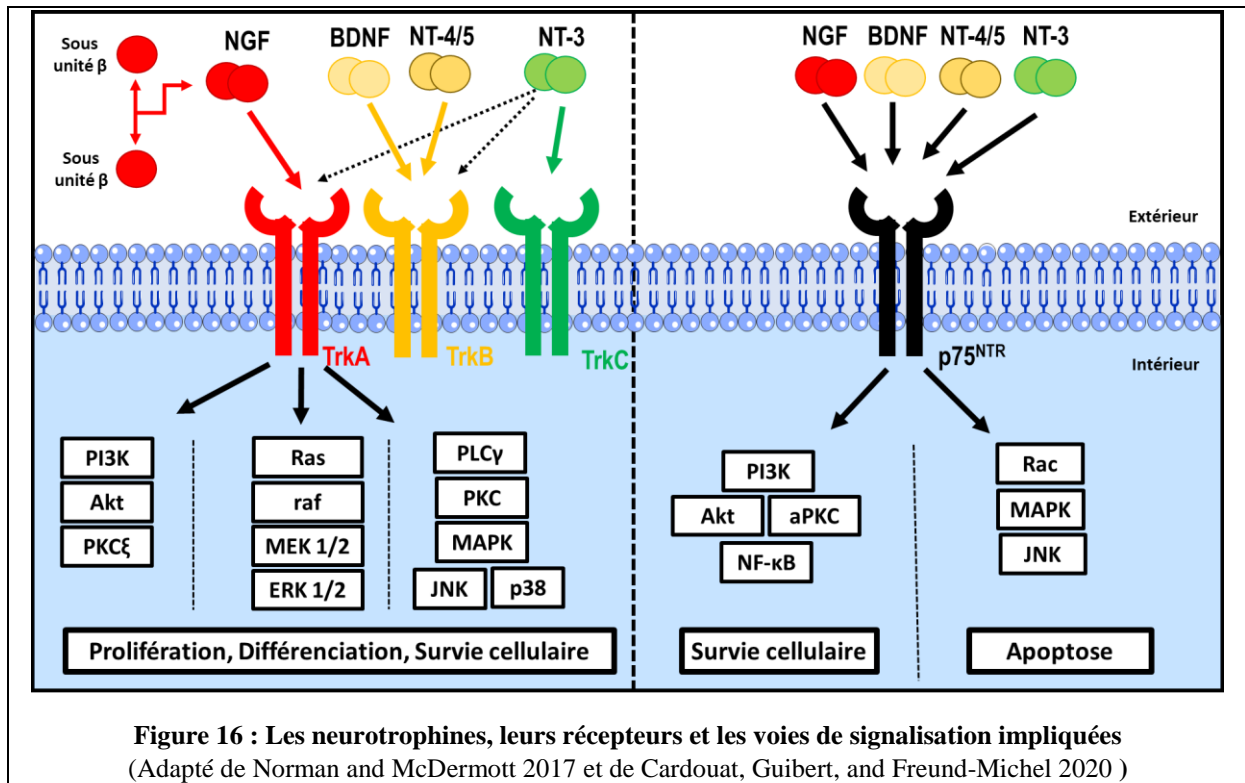
Le facteur de croissance des nerfs, ou « nerve growth factor » de son nom anglais, a été découvert dans les années 50 par l'équipe de Rita-Levi Montalcini (Levi-Montalcini and Hamburger 1951; Levi-Montalcini and al. 1995). Il appartient à la classe des neurotrophines, qui comprennent aussi le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF), les neurotrophines-3 et -4/5 (NT-3 et NT-4/5) (Dechant and Neumann 2002).

Le NGF se présente sous la forme d'un homodimère de la sous-unité β du NGF. Les isoformes α et γ ont été décrites chez la souris et le rat (Bradshaw and al. 1994; McDonald and Chao 1995). Chaque sous-unité β fait 13.5 kDa pour une protéine totale de 27 kDa. Le NGF est produit dans un premier temps sous une forme inactive : le pro-NGF, dont le prodomaine est ensuite clivé pour pouvoir obtenir la version mature de la protéine (Berger and Shooter 1977). Néanmoins il a été montré que le pro-NGF est aussi présent dans certains tissus et présente une activité biologique, comme des propriétés pro-apoptotiques. Le NGF peut se fixer à deux récepteurs différents (**Figure 16**),

-Le récepteur « *Tropomyosine Related Kinase A* » (TrkA), qui est spécifique du NGF et le lie avec une forte affinité de l'ordre du picomolaire (Sutter and al. 1979).

-Le deuxième récepteur du NGF est le récepteur p75 des neurotrophines (p75^{NTR}) avec qui il a une affinité plus faible, de l'ordre du nanomolaire (Sutter and al. 1979).

Il existe d'autres récepteurs TrkB et TrkC, sur lesquels viennent se lier le BDNF et NT-4/5 ainsi que la NT-3 respectivement. Toutes les neurotrophines sont toutes capables de se lier au récepteur p75^{NTR}.



Chacun des récepteurs du NGF peut activer plusieurs voies de signalisation. Le récepteur TrkA peut agir sur les voies PI3K, Ras/raf et de la Phospholipase C (PLC)- γ . Ces voies sont impliquées dans des réponses liées à la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire. Le récepteur p75^{NTR} active la voie des MAPK, impliquée dans les mécanismes d'apoptose dans les cellules. Paradoxalement, l'activation de ce récepteur peut aussi mobiliser la voie NF- κ B, qui joue dans les mécanismes de survie cellulaire. (Freund-Michel and Frossard 2008). L'activation la voie NF- κ B chez les monocytes/macrophages est aussi responsable de multiples réponses inflammatoires (Guha and Mackman 2001; Rossol and al. 2011a). Les récepteurs peuvent aussi fonctionner de pair. Dans des cellules de thyroïde de rat, la stimulation du récepteur p75^{NTR} entraîne une colocalisation et interaction directe avec récepteur TrkA ce qui permet leur transport au pôle basolatéral des cellules (Perrone and al. 2005).

Le NGF a d'abord été mis décrit pour ses effets sur les cellules nerveuses, notamment en stimulant leur prolifération, leur différenciation et leur survie. Au court de cette thèse, nous allons particulièrement nous intéresser à son rôle dans le développement de l'hypertension pulmonaire.

b) Le NGF dans l'hypertension pulmonaire

L'action du NGF a un rôle délétère dans le développement des maladies pulmonaires inflammatoires comme l'asthme et l'HTP. En effet le NGF montre une capacité à influencer sur l'inflammation, le remodelage et l'hyperréactivité pulmonaire, qui sont des aspects clés de ces pathologies (Freund-Michel and Frossard 2008; Freund-Michel and al. 2015; Cardouat, Guibert, and Freund-Michel 2020).

Les cellules présentes au niveau du tissu pulmonaire sont capables de produire du NGF, mais aussi d'y répondre. La stimulation de tissus alvéolaires avec de l'IL-1 β permet d'induire la production de NGF. L'augmentation de concentration du NGF est corrélée à une contraction accrue des bronchioles (Frossard and al. 2005). Parmi les cellules présentes au niveau alvéolaire, les cellules musculaires lisses, les cellules épithéliales et les fibroblastes sont capables de produire du NGF en réponse à l'IL-1 β (Olgart and Frossard 2001; Freund and al. 2002; Pons and al. 2001; Fox and al. 2001). Dans une lignée de rats développant spontanément une hypertension, l'expression des neurotrophines et de leurs récepteurs est corrélée à l'âge et au développement de l'hypertension. Cette augmentation des neurotrophines est particulièrement marquée au niveau pulmonaire, dans les CEAP et des CMLAP (Ricci and al. 2004).

Pour les CMLAP exposées au NGF, la prolifération augmentée, déclenchée par l'activation des voies de signalisation Ras/raf et PKC, dépendantes du récepteur TrkA (Freund-Michel, Bertrand, and Frossard 2006). On note aussi une augmentation de production de MMP-9 qui pourrait jouer dans le remodelage des voies aériennes (Dagnell and al. 2007). Les fibroblastes, exposés au NGF voient leur migration augmentée et initient leur différenciation en myofibroblastes avec un niveau de contraction augmenté (Micera and al. 2001). Ceci suggère un rôle potentiel du NGF dans les mécanismes de cicatrisation ou de fibrose.

En plus de son action sur les cellules de l'endothélium pulmonaire, le NGF cible les cellules infiltrantes du poumon, comme les monocytes-macrophages, les lymphocytes, les neutrophiles, les éosinophiles, les mastocytes et les basophiles. Ces cellules possèdent les récepteurs du NGF et y sont sensibles (Labouyrie and al. 1997; Minnone, De Benedetti, and Bracci-Laudiero 2017; Williams et al. 2015). Il est intéressant de voir que les macrophages sont à la fois capables de produire du NGF, mais aussi d'en être la cible.

En présence d'IL-1 β ou de TNF- α , les macrophages synoviaux produisent du NGF (Takano and al. 2017), comme les monocytes non différenciés stimulés par du LPS (Caroleo and al. 2001). Sur des cellules de la lignée THP-1, le NGF est capable d'induire la production d'IL-1 β via la stimulation du récepteur TrkA et activation de la voie de signalisation NF- κ B (Datta-Mitra and al. 2015). Le TNF- α est aussi produit dans des macrophages murins exposés au NGF (Barouch and al. 2001).

Le NGF est induit par l'IL-1 β et le TNF- α , eux même induits par le NGF. Miyagi and al proposent que cette induction réciproque soit responsable de conditions pathologiques comme des lombalgies discogéniques (Miyagi and al. 2018). En plus de la libération de cytokines pro-inflammatoires, les macrophages différenciés stimulés par le NGF surexpriment CXCR4, les rendant plus sensibles à des signaux chimiotactiques (Kobayashi and Mizisin 2001; Samah, Porcheray, and Gras 2008). Sachant que les monocytes-macrophages, parmi les autres cellules infiltrantes, sont recrutés au niveau pulmonaire dans l'HTP, ces changements induits par le NGF pourraient effectivement avoir un rôle dans la pathologie.

Dans une étude *in vitro* sur des macrophages humains, le NGF et le pro-NGF ont affecté l'expression, de nombreux gènes responsables de capacité de phagocytose, de la sécrétion de facteurs de croissance, de la régulation des flux calciques et de la migration (Williams and al. 2015).

La littérature apporte des données sur les réponses inflammatoires et chimiotactiques des macrophages exposés au NGF, mais la plupart des travaux se concentrent sur les cellules différenciées, ne s'intéressant que peu aux changements se produisant dans les monocytes. Ceux-ci sont pourtant aussi exposés au NGF. Il serait donc intéressant de chercher à vérifier comment ces monocytes non différenciés répondent au NGF afin d'avoir une complémentarité vis-à-vis des données connues sur les macrophages.

Au vu des données de littérature qui s'accumulent, le NGF montre de plus en plus d'intérêt dans le contexte des maladies pulmonaires et son ciblage thérapeutique pourrait bien avoir des effets bénéfiques chez les malades de l'HTP. Des anticorps bloquants du NGF sont déjà utilisés dans d'autres applications, notamment pour les traitements des douleurs (par exemple dans le cas d'ostéoarthrose et de lombalgies) et montrent des résultats prometteurs (Dakin and al. 2019; Tive and al. 2019). Des essais *in vivo* chez le rat ont montré que des anticorps bloquants anti-NGF permettent de réduire significativement l'hyperréactivité artérielle, le remodelage et l'inflammation (Freund-Michel and al. 2015).

La disponibilité de ces outils thérapeutiques ainsi qu'un certain recul sur la sécurité de leur utilisation chez l'homme pourrait faciliter la mise en place de futurs essais cliniques dans le cadre de l'HTP.

TRAVAUX RÉALISÉS

CHAPITRE I : Implications de la voie de signalisation JAK/STAT dans la réponse des macrophages à la fumée de cigarette

A. Contexte et objectifs

Le tabagisme et plus précisément l'exposition à la fumée de cigarette est le principal facteur de risque dans le développement de la BPCO (Mannino and Buist 2007). La fumée de cigarette déclenche des effets complexes, parfois opposés. Elle est capable d'induire un influx important de cellules inflammatoires au niveau pulmonaire (Barnes 2016), qui contribuent ensuite l'inflammation en produisant des cytokines comme l'IL-6, l'IL-8/CXCL8, la MCP-1/CCL2 ou le GRO- α /CXCL1, augmentées dans la BPCO (Chung 2001). Paradoxalement, la fumée de cigarette est aussi capable d'interférer avec la production de certaines de ces cytokines et donc de jouer un rôle dans la suppression de la réponse inflammatoire (Herr and al. 2009).

Dans des travaux précédents, notre équipe a montré que la fumée de cigarette pouvait réduire la production de l'IL-6 et de GRO- α /CXCL1, tout en augmentant celle de MCP-1 et IL-8/CXCL8, nous avons aussi montré que la voie JAK/STAT était impliquée dans les mécanismes de réponse des cellules épithéliales à la fumée de cigarette (Victoni and al. 2014).

Du fait de l'absence de traitement curatif pour la BPCO et des résistances fréquentes aux traitements habituels (Barnes 2013), la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques est un nécessaire pour développer de nouveaux traitements contre la BPCO. JAK/STAT pourrait être une voie de signalisation clé dans le développement de la maladie, du fait de son activation décrite dans différents modèles de BPCO (Yew-Booth and al. 2015; K. Zhao and al. 2020).

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'implication de la voie JAK/STAT dans la réponse des macrophages humains à la fumée de cigarette. Les effets du ruxolitinib (inhibiteur de JAK1 et JAK2) et de l'AG490 (inhibiteur spécifique de JAK2) seront évalués. Nous nous pencherons sur l'évolution de la production de cytokines comme IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2, IL-6 et GRO- α /CXCL1, mais aussi au niveau de l'impact des traitements sur la capacité phagocytose des cellules. L'action des deux inhibiteurs sera comparée à la dexaméthasone, notre traitement anti-inflammatoire de référence.

Dual role of ruxolitinib, modulator of inflammation, a potential therapeutic target in chronic obstructive pulmonary disease.

Running Head: JAK/STAT inhibitors against COPD

Yann Verres ¹, Camila Oliveira da Silva ², Bachar Aljebawi ¹, Aude Bodin ¹, Emiliano Barreto ³, Vincent Lagente ¹ Tatiana Victoni ⁴

Affiliations:

- 1- NuMeCan Institute (Nutrition, Metabolism and Cancer), INSERM, INRAE, CHU Rennes, Univ Rennes, Rennes, France.
- 2- Laboratory of Histocompatibility and Cryopreservation, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, Brazil.
- 3- Laboratory of Cell Biology, Federal University of Alagoas, Maceió, AL 57072-900, Brazil.
- 4- University of Lyon, VetAgro Sup, APCSe, Marcy l'Étoile, France.

Work conducted at NuMeCan Institute, CHU Pontchaillou, 2 rue Henri Le Guilloux, Rennes, 35033 Rennes Cedex, France

* Corresponding author: Yann Verres, NuMeCan Institute (Nutrition, Metabolism and Cancer), INSERM, INRAE, CHU Rennes, Univ Rennes, Rennes, France. E-mail : yann.verres@univ-rennes1.fr Tel. +33-780043429

Abstract

Background: Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a very widespread pulmonary disease and among the leading causes of mortality worldwide. Its main known risk factor is cigarette smoke, displaying various and complex effects due to the huge number of different compounds found in cigarettes. Several cellular pathways can be activated due to cigarette smoke (CS) exposure, and a better understanding of CS mechanisms of action could help to lead treatments for the patients.

Objectives: We wanted to assess the importance of the JAK/STAT pathway in the cytokines released by human monocyte-derived-macrophages (MDMs) stimulated by cigarette smoke extract (CSE) and lipopolysaccharides (LPS) and study the effects of two JAK/STAT inhibitors in MDM-stimulated cells.

Methods: We exposed human MDMs to CSE+LPS with or without two different JAK/STAT inhibitors, studied the changes in cytokine release by ELISA and measured the uptake capacity with fluorescent microbeads. JAK/STAT inhibitors were compared to the effects of dexamethasone.

Results: CSE alone was not able to increase the levels of cytokines, except for IL-8/CXCL8, but in addition with LPS, the levels of IL-8/CXCL8 and MCP-1/CCL2 were significantly increased. A diminution of IL-6 and GRO- α /CXCL1 was observed. The use of inhibitors induced a decrease of the cytokine's levels induced by LPS and CSE, but ruxolitinib showed a more temperate effect, not decreasing the GRO- α /CXCL1 levels.

Conclusions: We highlighted the JAK/STAT pathway as a promising therapeutic target for the COPD treatment.

Keywords: Cigarette smoke, COPD, Macrophages, Inflammation, Cytokines, JAK/STAT

List of abbreviations

- BALF: Bronchoalveolar lavage fluid
- CCL2: *C-C motif ligand*
- CXCL: *C-X-C motif ligand*
- CD: *Cluster of differentiation*
- COPD: *Chronic obstructive pulmonary disease*
- CS: *Cigarette smoke*
- CSE: *Cigarette smoke extract*
- DMSO: *Dimethyl sulfoxide*
- ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assay*
- GM-CSF: *Granulocyte macrophage colony stimulating factor)*
- GRO: *Growth-regulated oncogene*
- IL: *Interleukin*
- JAK: *Janus kinase*
- LPS: *Lipopolysaccharide*
- MCP: *Monocyte chemoattractant protein*
- MDM: *Monocyte-derived macrophages*
- MTT: *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5,5-diphenyltetrazolium bromide*
- PBMC: *Peripheral blood mononuclear cell*
- RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*
- STAT: *Signaling transducer and activator of transcription proteins*

I. Introduction

Chronic obstructive pulmonary disease is the 3rd most important cause of mortality worldwide¹. It is characterized by long term respiration symptoms, airflow limitation and alveolar abnormalities that takes place in an inflammatory context². Exposition to harmful gas, pollution, or particles are known to be risk factors for chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and the main identified risk factor is cigarette smoke³, the estimation is between 80-90% of COPD that are induced by chronic smoke exposure⁴. Literature shows that exposure to cigarette smoke (CS) can increase the influx of inflammatory cells towards the lung that can worsen the inflammatory process that is already present in COPD⁵. This recruitment of immune cells to the lung includes T and B lymphocytes, neutrophils but also monocyte/macrophages, implying both innate and adaptative response⁶. These cells can then produce many pro-inflammatory cytokines or chemokines such as IL-6, IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2, GRO- α /CXCL1 that, among others, have been shown to have an increased expression in COPD⁷. Paradoxically, it seems that CS can contribute to locally suppress the innate response, by interfering with the cytokine release⁸.

It was shown that cigarette smoke extract (CSE) can alter many macrophage functions such as phagocytosis and cytokine's production. The activation through the Janus kinase (JAK)-2 and Signaling transducer and activator of transcription proteins (STAT)-3 pathway seem to able to increase the expression of anti-inflammatory cytokines like IL-10 and to decrease the expression of IL-12⁹. This type of activation can be of great importance, as it is known that dysregulation of macrophages can play a role in COPD¹⁰⁻¹². Also, we know that the excessive oxidative stress produced by CS harms macrophage function and thus impairs the phagocytosis of bacteria and efferocytosis of apoptotic cells. The impairment in phagocytosis might contribute to COPD exacerbations¹³. Phagocytosis is not the only macrophage function affected by CS. In previous works, we showed that CS can suppress the IL-6 and growth-regulated oncogene (GRO)- α / C-X-C motif ligand (CXCL)-1 production. It also has an additive effect for the production of monocyte chemoattractant protein (MCP)-1/C-C motif ligand (CCL)-2 and IL-8/CXCL8 induced by LPS on monocyte derived-macrophages (MDMs)¹⁴. Thus, the pro-inflammatory cytokine and chemokine productions of macrophages can be altered by CS. We also previously showed that the JAK/STAT pathway was involved in the CSE/LPS response in an airway epithelial model¹⁵.

COPD is a treatable disease, but without yet a total reversibility and with frequent resistances to the usual treatments¹⁶. From the data present in the literature, JAK/STAT is one of the

pathways that might be a key feature in COPD, as it seems to be activated in COPD models^{17,18}. Considering this, targeting the JAK/STAT pathway could help improve the actual treatments for COPD. The objective of this work was to bring insight to this mechanism by studying the role of the JAK/STAT pathways in the response of MDMs exposed to the CSE and LPS combination, focusing on cytokines release and the uptake capacity. We used the JAK/STAT inhibitors AG490 (specific inhibitor of JAK2) and ruxolitinib (inhibitor of JAK1 and JAK2), on MDMs that were stimulated with CSE and/or LPS and we observed the changes in cytokine release and uptake capacity. The results were compared to the action of dexamethasone, a common anti-inflammatory, to see if JAK/STAT inhibitors can be considered as new treatments for this pathology.

II. Materials and Methods

Cell culture

Primary monocyte-derived macrophages were obtained after selection and differentiation of cells extracted from human buffy coats donation (French Blood Agency, *Etablissement Français du Sang*, France). The procedure was described previously¹⁹. The experiments were all done in compliance with the French legislation on blood transfusion safety (Act 93-5, from January 4th, 1993) and under approval of the French Blood Agency. All samples are from subjects that gave their informed and written consent to participate in this research.

Shortly, the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were harvested from the buffy coat after centrifugation using Ficoll. The PMBC were then sorted using the human cluster of differentiation (CD)-14 magnetic microbeads separation kit (Miltenyi Biotec, Germany) and resuspended in cell culture medium. The medium was constituted of Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium (Gibco, Life Technologies, USA), supplemented with 1% of L-Glutamine (Gibco, Life Technologies, USA), 0.1% Penicillin-Streptomycin (Gibco, Life Technologies, USA) and 10% fetal bovine serum (Hyclone, fisher scientific, USA). CD14⁺ cells were placed in 24-well plates at a density of $5 \cdot 10^5$ cells/well. To obtain MDM, CD14⁺ cells were incubated with 50ng/ml of granulocyte-monocyte colony stimulating factor (Granulocyte-macrophage colony stimulation factor (GM-CSF) (R&D Systems, France)) for 7 days with 1/3 of medium renewed at day 3. After the differentiation, the medium was completely replaced with GM-CSF-free medium during 24 hours, before starting experiments.

Preparation of CSE

The procedure to prepare CSE was previously described¹⁵. Briefly, we aspirated the smoke from two cigarettes (Marlboro Red, with an average of 13mg of tar, 1mg of nicotine, 10mg of carbon monoxide) using a peristaltic pump, bubbled it into 20ml of culture medium, and then filtered through a 0.2µM membrane. pH of the medium was then adjusted to 7 and absorbance at 326nm was adjusted between 1.5-2.0. This solution was considered as the 100% CSE stock solution and later diluted to 2%, 4%, 8% and 10% extemporaneously.

Treatments

MDMs from healthy donors were stimulated with CSE (4% to 10%) associated or not with LPS (0.1µg/ml; from *Escherichia coli* 055:B5, Sigma-Aldrich) for 24 h. To explore possible signaling pathways involved MDM cells were also pre-incubated with AG490 (0.5 µM to 25µM, specific inhibitor of JAK2), or Ruxolitinib (0.5µM to 25µM, inhibitor of JAK1 and JAK2) or vehicle (Dimethyl sulfoxide (DMSO) 0.0125 to 0.025%) for 2 h before the addition of CSE+LPS. Dexamethasone (5µM) was used as an anti-inflammatory drug of reference. All experiments were performed in serum-free medium, triplicate and repeated at least 2 different donors. The culture supernatant was then harvested and the cells were left on the culture dish, conserved at -80°C and thawed immediately prior to the protein array or enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). At the end of the incubation period culture supernatants were harvested and stored at -80°C until further analysis.

Cell viability assay

The cytotoxicity of the different treatments was assessed using a tetrazolium salt (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3,4-diphenyl)tetrazolium bromide) (MTT) cell viability assay. After the treatments, the culture medium was eliminated and the cells were incubated with 0.5mg/ml of MTT for 1h at 37°C with 5% of humidified CO₂. The medium is then aspirated and replaced with DMSO (Sigma-Aldrich) to extract the product of the reaction. The absorbance is measured at 540nm. Viability is presented as a percentage of the absorbance of the control condition (untreated cells), normalized with the DMSO blank.

Protein and Kinase Arrays

Pathways activation and cytokine release was assessed in a semi-quantitative manner using protein arrays (Human Proteome Profiler Human Cytokine Array, and Human Phospho-Kinase Array, R&D Systems, France) following the manufacturer's recommendations. Cell lysates

(500 µg of total proteins per array) were applied to the phosphoprotein array and supernatant (500 µl per array) were applied to cytokines release.

Cytokine assays

Concentrations of cytokines (IL-8/CXCL8, GRO- α /CXCL1, IL-6 and MCP-1/CCL2) in the culture supernatant were measured using commercial ELISA DuoSet kits (R&D Systems, Minneapolis, USA, France), following manufacturer's recommendations. The different dilutions of the supernatants were conducted extemporaneously.

Cell uptake assay

The microsphere uptake assay was proceeded as previously described ²⁰. After treatments, the culture medium was aspirated and incubated overnight with medium containing fluorescent microspheres (yellow-green carboxylate-modified FluoSpheres 100nm (Molecular Probes, Eugene, USA)). Culture medium was then discarded and cells were washed with PBS. Fluorescence was then quantified with POLARstar Omega[®] (BMG Labtech[®]). Data were expressed in mean of fluorescence.

Statistical analysis

The results are presented as the mean \pm standard error of the mean (SEM) of three. The data were assessed in a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Bonferroni's post-test. P<0.05 was considered as the threshold for statistical significance. All statistical analyses were performed with GraphPad Prism software (version 6.0, GraphPad, USA).

III. Results

The effects of exposure to CSE on the production of cytokines and pathways activations by MDMs

It has been reported that CSE was associated with changes in the production of IL-8/CXCL8 by MDMs ²¹. However, we would like to investigate whether other cytokines can be altered after CSE exposure. The global outcome for the exposure of MDM to CSE was assessed with semi-quantitative protein arrays. CSE reduced the release of most of the cytokines quantified in this array, compared to the control condition (**Figure 1a**). We framed four cytokines with different responses: As expected IL-8/CXCL8 shows a strong increase after CSE, moreover MCP-1/CCL2 and IL-27 were also induced after exposure to CSE. In contrast, CSE inhibited IL-6, TNF- α and Gro- α /CXCL1 production in MDMs.

To analyze which signaling pathways seems involved in CSE-induced chemokine release, the expression of phosphorylated forms of kinase were analyzed by semi-quantitative protein arrays. Stimulation of MDM cells with CSE (**Figure 1b**) is able to activate eleven different kinases of 28 kinases studied and particularly the STAT family seems to be altered.

Figure 1 should be placed here

The effects of exposure to CSE on the production of GRO- α /CXCL1, IL-6, IL-8/CXCL8 and MCP-1/CCL2 by MDMs

This semi-quantitative observation of cytokines release will go through verification with techniques such as ELISA. Within the panel of cytokines that appear to be altered by exposure to cigarette smoke in the protein, we chose 4 cytokines (which play an important role in COPD) to be analyzed by ELISA. We confirmed that CSE at 4% significantly increased the release of IL-8/CXCL8 (**Figure 2a**) but did not significantly changed the release of GRO- α /CXCL1, MCP-1/CCL2 and IL-6 (**Figures 2b, 2c and 2d**).

Figure 2 should be placed here

To make sure that cytokine decrease was not related to cell mortality in the viability test was performed. The incubation of MDMs with CSE at 2%, 4% and 8% for 24h did not affect cell viability. However, the 10% concentration decreased the number of viable cells (data not shown).

Effects of the CSE-LPS combination on the production of pro-inflammatory cytokines

Exposure to CSE did not appear to affect a large number of cytokines, with the exception of IL-8/CXCL8. Hence, we sought to establish the impact of exposure to CSE on the immune response by investigating cytokine release by LPS-stimulated MDMs. We evaluated the effect of 4% CSE exposure in combination with 0.1 μ g/ml LPS on the production of the four cytokines shown previously. In the cells incubated 24h with 4% CSE + 0.1 μ g/ml LPS, there were a significantly increased release of IL-8/CXCL8 and MCP-1/CCL2 compared to LPS or CSE alone. (**Figures 3a and 3c**). As expected, LPS alone, at a concentration of 0.1 μ g/ml, increased the release of IL-6 and GRO- α /CXCL1 by MDM, compared to the control condition. However, the co-stimulation of cells with 4% CSE and 0.1 μ g/ml LPS decreased IL-6 and GRO- α /CXCL1 release compared to LPS alone (**Figures 3b and 3d**)

**Figure 3 should be placed here*

Effects of JAK/STAT inhibitors and Dexamethasone on the production of CSE-LPS induced pro-inflammatory cytokines

Finally, we studied the effects of two inhibitors of the JAK / STAT pathway, AG490 which is a specific inhibitor of the protein JAK2, and Ruxolitinib an inhibitor of JAK1 and JAK2. We focused on the release of cytokines induced by 4% CSE in combination with LPS 0.1 µg/mL. Dexamethasone was also used, at 5 µM, as a reference molecule. Neither the vehicle nor any of the compounds used in this study altered cell viability (data not shown).

Figure 4 should be placed here

Treatment with Dexamethasone at 5 µM was able to inhibit the release of IL-8/CXCL8, GRO- α /CXCL1, MCP-1/CCL2 and IL-6 (**Figures 4a, 4b, 4c and 4d**). The two inhibitors of the JAK /STAT pathway were also able to inhibit the production of different cytokines, regardless of the concentration used. The AG490 reduced release of the four cytokines (**Figures 5a, 5b, 5c and 5d**), with even stronger reduction at higher concentrations for GRO- α /CXCL1 and IL-6. Ruxolitinib also reduced cytokine release for IL-6, IL-8/CXCL8 and MCP-1/CCL2 (**Figures 5e, 5g and 5h**) but not for GRO- α /CXCL1, were increase of inhibitor concentration even seems to increase the cytokine release (**Figure 5f**).

Figure 5 should be placed here

The force of inhibition is not the same for every inhibitor, and also varies with every cytokine. Dexamethasone reduced IL-8/CXCL8 by 65%, GRO- α /CXCL1 by 40%, MCP-1/CCL2 by 90% and IL-6 by 55%. AG490 reduced IL-8/CXCL8 by 35-45%, GRO- α /CXCL1 by 45 to 80%, MCP-1/CCL2 by 35-55% and IL-6 by 55-80%. Finally, ruxolitinib reduced IL-8/CXCL8 by 50-55%, did not significantly reduced GRO- α /CXCL1, reduced MCP-1/CCL2 by 80-90% and IL-6 by 70-75%.

Effects of Dexamethasone and JAK /STAT inhibitors on microsphere uptake by MDMs

To complete the data on cytokine release, we also assessed the ability of MDMs to capture fluorescence microspheres. It appears that cell exposed to 4% CSE show not significant difference in the uptake capacity but cells exposed to LPS 0.1µg/ml or the LPS + CSE combination show a significantly reduced capacity to capture the microspheres compared to the control condition (**Figure 6a**). When added to the CSE + LPS treatment, the cell exposed to Dexamethasone are nearly unable to capture the microspheres (**Figure 6b**). Both AG490 and

Ruxolitinib didn't show more diminution of the uptake capacity compared to the CSE+LPS condition (**Figures 6c and 6d**).

Figure 6 should be placed here

IV. Discussion

COPD is characterized by persistent respiratory symptoms and airflow limitation from airway, associated with an inflammatory response. Today's, goal of medical treatment for COPD is to reduce exacerbation frequency, improve quality of life, and control symptoms. But no current treatments reduce disease progression or mortality and have relatively little effect in preventing exacerbations¹. Thus, because of the unsatisfying efficiency and the numerous undesirable effects displayed by the actual treatments, there is therefore an enormous need for the development of new treatments for COPD. We report here activation of JAK/STAT pathway in CSE-stimulated MDM cells. Moreover, we reveal a novel dual function of Ruxolitinib (non-specific inhibitor of JAK/STAT) in modulating inflammation without compromising uptake capacity of cells, thereby providing a new target for this disease.

We observed very opposed effect when adding CSE to the LPS: Firstly, we noticed a strong pro-inflammatory response, with the production of chemokines such as IL-8/CXCL8 and MCP-1/CCL2, respectively responsible of the neutrophils and monocyte chemotaxis. Interestingly, we also noticed an immunosuppressive effect of CSE added to LPS, with a diminution of the levels of the pro-inflammatory cytokines IL-6 and GRO- α /CXCL1 when compared to the LPS alone. A decrease of the phagocytosis capacity was also observed in MDMs, which seems to confirm that our model can fit what happens in COPD, where pulmonary infection is more common with reduced phagocytosis capacity²².

These results fit with the study of Metcalfe et al.²¹, who showed that a medium conditioned with cigarette smoke associated with an LPS treatment can reduce the inflammatory response of alveolar macrophages for COPD patients, except for IL-8/CXCL8, which was increased. Also, samples of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of COPD patients already showed higher IL-8/CXCL8 levels²³. It is possible that in this context close to COPD exacerbation, macrophages favor the chemotactic response for neutrophils rather than primary inflammatory response. We show here an additive effect of CSE and LPS in the production of MCP-1/CCL2 by MDMs. This cytokine is known for its role in monocyte chemotaxis which can then contribute to the local tissue remodeling. Another author observed the diminution of MCP-

1/CCL2 production after CSE treatment on THP-1 monocytes²⁴, but the cells were exposed to 10% of CSE, a concentration we found to be toxic to the cells, which might explain a reduction of the liberation of some cytokines. In summary, CS could not only help the recruitment of neutrophils via IL-8/CXCL8, but also of monocytes via MCP-1/CCL2 and contribute to increase the inflammation in the lung.

We showed in this work that IL-6 and GRO- α /CXCL1 production decreased when CSE was added on LPS-stimulated MDMs. This result is similar to what Gaschler and al. demonstrated, where IL-6 was reduced in alveolar macrophages when CSE was added with LPS²⁵. This was done on murine macrophages, and we provide here data generated on human macrophages, a closer model for COPD. In a previous work, we highlighted for the first time the reduction of the secretion of GRO- α /CXCL1 with CSE + LPS compared to the LPS alone¹⁴, a result we found again here. This cytokine displays a chemotactic capacity towards neutrophils. This decrease goes against the increase previously described for IL-8/CXCL8, also a chemoattractant for neutrophils. The numerous compounds present in cigarettes can explain the various effects we observe. Nicotine has been described to have an immunosuppressive capacity on the pro-inflammatory cytokines signaling²⁵. and other compounds could have an impact on many other signaling pathways, triggering responses that might look opposite.

Another parameter we studied is the uptake capacity of the cells. A reduced phagocytosis capacity of alveolar macrophages can lead to a less efficient elimination of the pathogens in the lung, explaining the increased exacerbations in COPD²⁶. We evaluated the capacity of MDM to capture fluorescent microspheres after treatment with LPS, with or without CSE. We found that co-exposition to CSE and LPS caused a reduction in the recapture of the microspheres, compared to the treatment with LPS alone. This complies to the data of other studies that showed a reduction of phagocytosis of bacteria in alveolar macrophages exposed to CSE, or macrophages from COPD patients^{27,28}.

Several pathways can be responsible for cytokine and chemokines regulation in MDMs, one of which is the JAK/STAT pathway. It was shown that the activation of JAK2/STAT3 pathway by CSE could lead the macrophages towards an M2 polarization, with production of anti-inflammatory cytokines⁹. Also, in a model of COPD rats, higher levels or phosphorylation of JAK1, JAK2, STAT1, STAT3 and STAT5 were observed, with higher levels of pro-inflammatory cytokines²⁹. In a mice model, another author linked the JAK3/STAT3 and NF- κ B pathway to the progression of COPD, which could be inhibited by the use of Ergosterol³⁰.

In human study, samples from non-smoker, smokers, and COPD patients showed variations in the activation of STAT1 and STAT3, increased in COPD patients, also non-significantly increased in the non-COPD smokers³¹. This reinforces the idea of the implication of JAK/STAT pathway in COPD and could mean that it is also involved in the response to cigarette smoke. Finally, Geraghty et al., used a model of STAT3 depleted mice that, when exposed to CS, showed a higher number of inflammatory cells, increased levels of inflammatory cytokines and proteases, and increased caspase activity compared to the control mice³². This, with in addition to the other studies suggest an important role of STAT3 in the activation/regulation of the response to cigarette smoke.

In our experiments, we used JAK/STAT inhibitors to assess the role the pathway during LPS+CSE stimulation on MDMs. Using a specific inhibitor (AG490) and non-specific inhibitor (Ruxolitinib), we observed a diminution of the production of IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2 and IL-6 by the MDMs stimulated with LPS and CSE. GRO- α /CXCL1 was also reduced by AG490, but (non-significantly) increased by Ruxolitinib. With these results, we demonstrated for the first time that the inhibition of JAK/STAT signaling triggers an anti-inflammatory response, tending to restore the basal levels of cytokines, observed in our control conditions. The action of Ruxolitinib could be slightly different for GRO- α /CXCL1, as it seems increase the level of the cytokine when higher concentration of inhibitor is used.

It is well known that the inhaled corticosteroids, with their anti-inflammatory effects, are commonly used treatments for COPD exacerbation. On the other hand, their use can increase the risk of infectious diseases, and we often must face resistance to those corticosteroids. Interestingly, in 2009, Barnes and Adcock had already listed the JAK3/STAT5 pathway among the different mechanisms of resistance to corticosteroids¹⁵. Our use of JAK/STAT inhibitors, and particularly Ruxolitinib, showed an effective, but more moderate anti-inflammatory action which might bring a better balance to avoid opportunist infections. This helps us think that the JAK/STAT pathway is indeed a promising therapeutic target for COPD treatments, and could also bring a complementary solution for the resistances to classical treatments. However, this promising therapeutic target must still be considered with caution, as they also seem to increase the risk of opportunistic and viral infections, and their safety in terms of malignancy as not yet been totally established³³.

In summary, our results showed and confirmed the versatility of the effects of cigarette smoke of monocyte-derived macrophages, with both pro and anti-inflammatory signals, associated to a strong chemotactic response and a decreased uptake capacity. The JAK/STAT inhibitors we used were able to partially recover the base level of our cytokines of interest in our cells,

without changing the phagocytosis capacity making it a possibly relevant alternative to the actual treatments for COPD.

Acknowledgements

The authors thank CAPES–COFECUB (Me 976/20) for the additional, bilateral funding (Brazil–France)

Funding statement

This study was supported by INSERM (France), CAPES-Cofecub Project (ME 976/20), and IDEXLYON (IMP/IDEX/2020-24)

Conflict of interest disclosure

The authors declare no conflicts of interest.

Ethics approval statement

All methods were carried out in accordance with the relevant guidelines and all subjects gave their written informed consent to participate in the study.

Patient consent statement

All methods were carried out in accordance with the relevant guidelines and all subjects gave their written informed consent to participate in the study

Permission to reproduce material from other sources

References

1. Vogelmeier CF, Criner GJ, Martinez FJ, et al. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease 2017 Report. GOLD Executive Summary. *Am J Respir Crit Care Med.* 2017;195(5):557-582. doi:10.1164/rccm.201701-0218PP
2. Global initiative for chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. <https://goldcopd.org/wp-content/uploads/2018/11/GOLD-2019-v1.7-FINAL-14Nov2018-WMS.pdf>
3. Mannino DM, Buist AS. Global burden of COPD: risk factors, prevalence, and future trends. *Lancet.* 2007;370(9589):765-773. doi:10.1016/S0140-6736(07)61380-4
4. Health USO on S and. The Health Consequences of Smoking: Cardiovascular Disease : A Report of the Surgeon General. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Office on Smoking and Health; 1983
5. Barnes PJ. Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2016;138(1):16-27. doi:10.1016/j.jaci.2016.05.011
6. Barnes PJ, Burney PGJ, Silverman EK, et al. Chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Dis Primers.* 2015;1(1):1-21. doi:10.1038/nrdp.2015.76
7. Chung KF. Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease. *European Respiratory Journal.* 2001;18(1):50-59. doi:10.1183/09031936.01.00229701
8. Herr C, Beisswenger C, Hess C, et al. Suppression of pulmonary innate host defence in smokers. *Thorax.* 2009;64(2):144-149. doi:10.1136/thx.2008.102681
9. Yuan F, Fu X, Shi H, Chen G, Dong P, Zhang W. Induction of Murine Macrophage M2 Polarization by Cigarette Smoke Extract via the JAK2/STAT3 Pathway. Cormet-Boyaka E, ed. *PLoS ONE.* 2014;9(9):e107063. doi:10.1371/journal.pone.0107063
10. Eapen MS, Hansbro PM, McAlinden K, et al. Abnormal M1/M2 macrophage phenotype profiles in the small airway wall and lumen in smokers and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Sci Rep.* 2017;7(1):13392. doi:10.1038/s41598-017-13888-x
11. He S, Xie L, Lu J, Sun S. Characteristics and potential role of M2 macrophages in COPD. *COPD.* 2017;Volume 12:3029-3039. doi:10.2147/COPD.S147144
12. Shaykhiev R, Krause A, Salit J, et al. Smoking-Dependent Reprogramming of Alveolar Macrophage Polarization: Implication for Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *J Immunol.* 2009;183(4):2867-2883. doi:10.4049/jimmunol.0900473
13. Ni I, Ji C, Vij N. Second-Hand Cigarette Smoke Impairs Bacterial Phagocytosis in Macrophages by Modulating CFTR Dependent Lipid-Rafts. *PLOS ONE.* 2015;10(3):e0121200. doi:10.1371/journal.pone.0121200
14. da Silva CO, Gicquel T, Daniel Y, et al. Alteration of immunophenotype of human

- macrophages and monocytes after exposure to cigarette smoke. *Sci Rep.* 2020;10:12796. doi:10.1038/s41598-020-68753-1
15. Victoni T, Gleonnec F, Lanzetti M, et al. Roflumilast N-oxide prevents cytokine secretion induced by cigarette smoke combined with LPS through JAK/STAT and ERK1/2 inhibition in airway epithelial cells. *PLoS One.* 2014;9(1):e85243. doi:10.1371/journal.pone.0085243
 16. Barnes PJ. Corticosteroid resistance in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2013;131(3):636-645. doi:10.1016/j.jaci.2012.12.1564
 17. Yew-Booth L, Birrell MA, Lau MS, et al. JAK–STAT pathway activation in COPD. *European Respiratory Journal.* 2015;46(3):843-845. doi:10.1183/09031936.00228414
 18. Zhao K, Dong R, Yu Y, et al. Cigarette smoke-induced lung inflammation in COPD mediated via CCR1/JAK/STAT /NF- κ B pathway. *Aging (Albany NY).* 2020;12(10):9125-9138. doi:10.18632/aging.103180
 19. Gicquel T, Robert S, Loyer P, et al. IL1 β production is dependent on the activation of purinergic receptors and NLRP3 pathway in human macrophages. *The FASEB Journal.* 2015;29(10):4162-4173. doi:10.1096/fj.14-267393
 20. Vene E, Barouti G, Jarnouen K, et al. Opsonisation of nanoparticles prepared from poly(β -hydroxybutyrate) and poly(trimethylene carbonate)-b-poly(malic acid) amphiphilic diblock copolymers: Impact on the in vitro cell uptake by primary human macrophages and HepaRG hepatoma cells. *International Journal of Pharmaceutics.* 2016;513(1):438-452. doi:10.1016/j.ijpharm.2016.09.048
 21. Metcalfe HJ, Lea S, Hughes D, Khalaf R, Abbott-Banner K, Singh D. Effects of cigarette smoke on Toll-like receptor (TLR) activation of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) macrophages. *Clin Exp Immunol.* 2014;176(3):461-472. doi:10.1111/cei.12289
 22. Papi A, Bellettato CM, Braccioni F, et al. Infections and Airway Inflammation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Severe Exacerbations. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;173(10):1114-1121. doi:10.1164/rccm.200506-859OC
 23. El-Shimy WS, El-Dib AS, Nagy HM, Sabry W. A study of IL-6, IL-8, and TNF- α as inflammatory markers in COPD patients. *Egypt J Bronchol.* 2014;8(2):91-99. doi:10.4103/1687-8426.145698
 24. Hamon R, Tran HB, Roscioli E, Ween M, Jersmann H, Hodge S. Bushfire smoke is pro-inflammatory and suppresses macrophage phagocytic function. *Sci Rep.* 2018;8(1):13424. doi:10.1038/s41598-018-31459-6
 25. Gaschler GJ, Zavitz CCJ, Bauer CMT, et al. Cigarette Smoke Exposure Attenuates Cytokine Production by Mouse Alveolar Macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2008;38(2):218-226. doi:10.1165/rcmb.2007-0053OC
 26. Wang Y, Luo G, Chen J, et al. Cigarette smoke attenuates phagocytic ability of macrophages through down-regulating Milk fat globule-EGF factor 8 (MFG-E8) expressions. *Sci Rep.* 2017;7:42642. doi:10.1038/srep42642

27. Hodge S, Hodge G, Ahern J, Jersmann H, Holmes M, Reynolds PN. Smoking alters alveolar macrophage recognition and phagocytic ability: implications in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2007;37(6):748-755. doi:10.1165/rcmb.2007-0025OC
28. Taylor AE, Finney-Hayward TK, Quint JK, et al. Defective macrophage phagocytosis of bacteria in COPD. *European Respiratory Journal.* 2010;35(5):1039-1047. doi:10.1183/09031936.00036709
29. Wang C, Ding H, Tang X, Li Z, Gan L. Effect of Liuweibuqi Capsules in Pulmonary Alveolar Epithelial Cells and COPD Through JAK/STAT Pathway. *CPB.* 2017;43(2):743-756. doi:10.1159/000481558
30. Huan W, Tianzhu Z, Yu L, Shumin W. Effects of Ergosterol on COPD in Mice via JAK3/STAT3/NF- κ B Pathway. *Inflammation.* 2017;40(3):884-893. doi:10.1007/s10753-017-0533-5
31. Yew-Booth L, Lau MS, Evans SM, Kilty I, Belvisi MG, Birrell MA. Activation Of The JAK/STAT Pathway In The Lungs Of COPD Patients. In: *C52. COPD PATHOGENESIS: HUMAN STUDIES.* American Thoracic Society; 2012:A4546-A4546. doi:10.1164/ajrccm-conference.2012.185.1_MeetingAbstracts.A4546
32. Geraghty PPD, Wyman AEMD, Garcia-Arcos IPD, Dabo AJMS, Gadhvi SMD, Foronjy RMD. STAT3 modulates cigarette smoke-induced inflammation and protease expression. *Front Physiol.* 2013;0. doi:10.3389/fphys.2013.00267
33. Winthrop KL. The emerging safety profile of JAK inhibitors in rheumatic disease. *Nat Rev Rheumatol.* 2017;13(4):234-243. doi:10.1038/nrrheum.2017.23

Figures

Figure 1

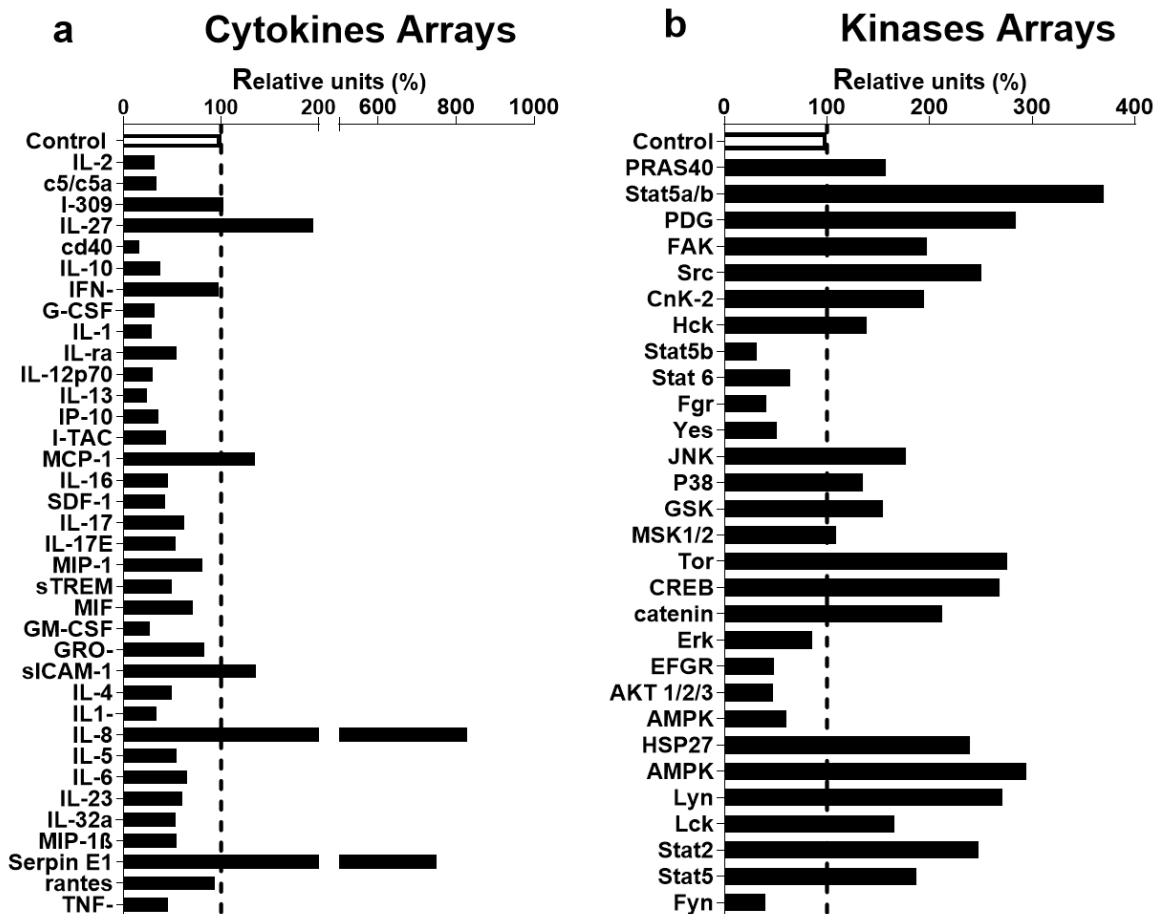


Figure 1. The effects of exposure to CSE on the production of cytokines and pathways activation by MDM. The MDMs were incubated with medium alone (Control) or with 4% CSE for 30 minutes or 24h. The culture supernatants were collected, and the concentration of multiple cytokines were measured using a protein array (a). Proteins were extracted from cell after the 30 minutes incubation with CSE treatments and used in the kinase array to measure pathways activations (b). The data is expressed in percentage of the control condition.

Figure 2

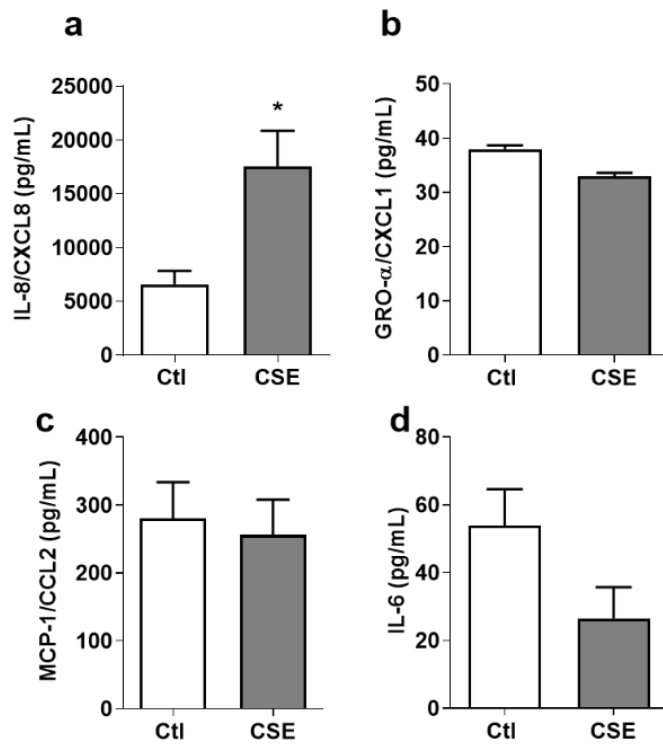


Figure 2. The effects of exposure to CSE on the production of GRO- α /CXCL1, IL-6, IL-8/CXCL8 and MCP-1/CCL2 by MDMs. The MDMs were incubated with medium alone (Ctl) or with 4% CSE for 24h. The culture supernatants were collected, and the concentrations of IL-8/CXCL8, GRO- α /CXCL1, MCP-1/CCL2 and IL-6 were measured using and ELISA (a-d). The data were assessed in an ANOVA, followed by a Bonferroni post-test. The data correspond to the mean \pm SEM of 4 to 10 donors. * $p < 0.05$, compared to the control.

Figure 3

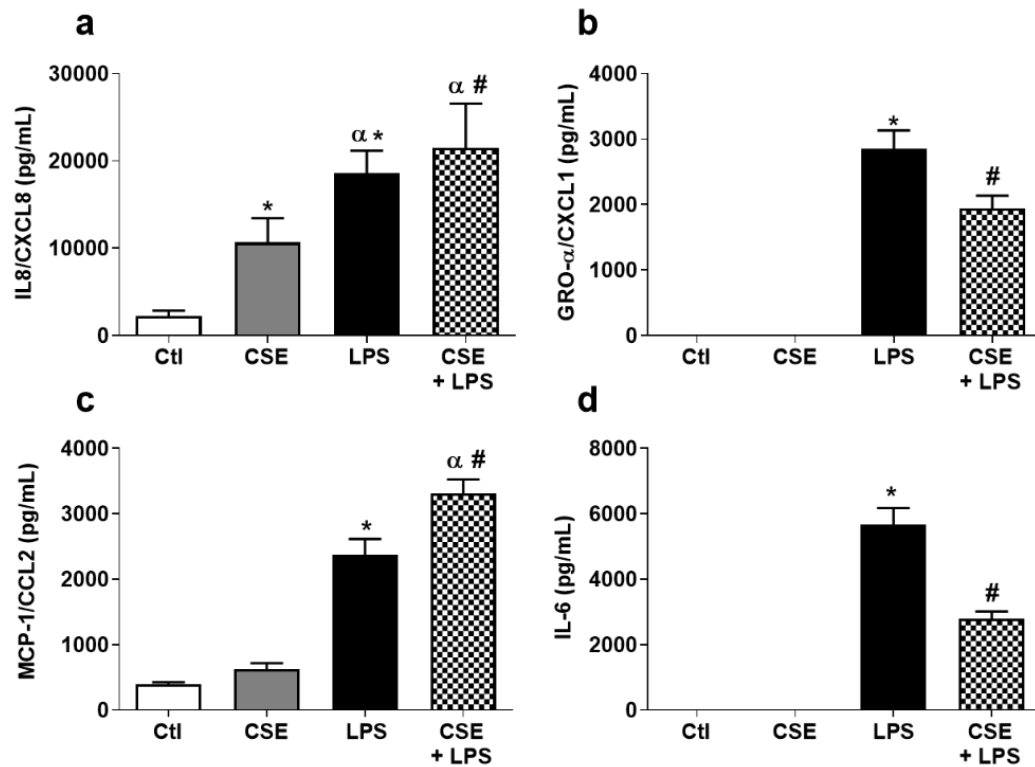


Figure 3. Effects of the CSE-LPS combination on the production of pro-inflammatory cytokines and microsphere uptake by MDMs. The MDMs were incubated with medium alone (Ctl), 4% CSE, 0.1 μ g/ml LPS or 4% CSE + 0.1 μ g/ml LPS for 24h. The culture supernatants were collected, and the concentrations of IL-8/CXCL8, GRO- α /CXCL1, MCP-1/CCL2 and IL-6 were measured using an ELISA (a-d). The data were assessed in an ANOVA, followed by a Bonferroni post-test. The data correspond to the mean \pm SEM of 4 to 9 donors. * $p < 0.05$, compared to the control; α $p < 0.05$ compared to 4% CSE; # $p < 0.05$ compared to 0.1 μ g/ml LPS

Figure 4

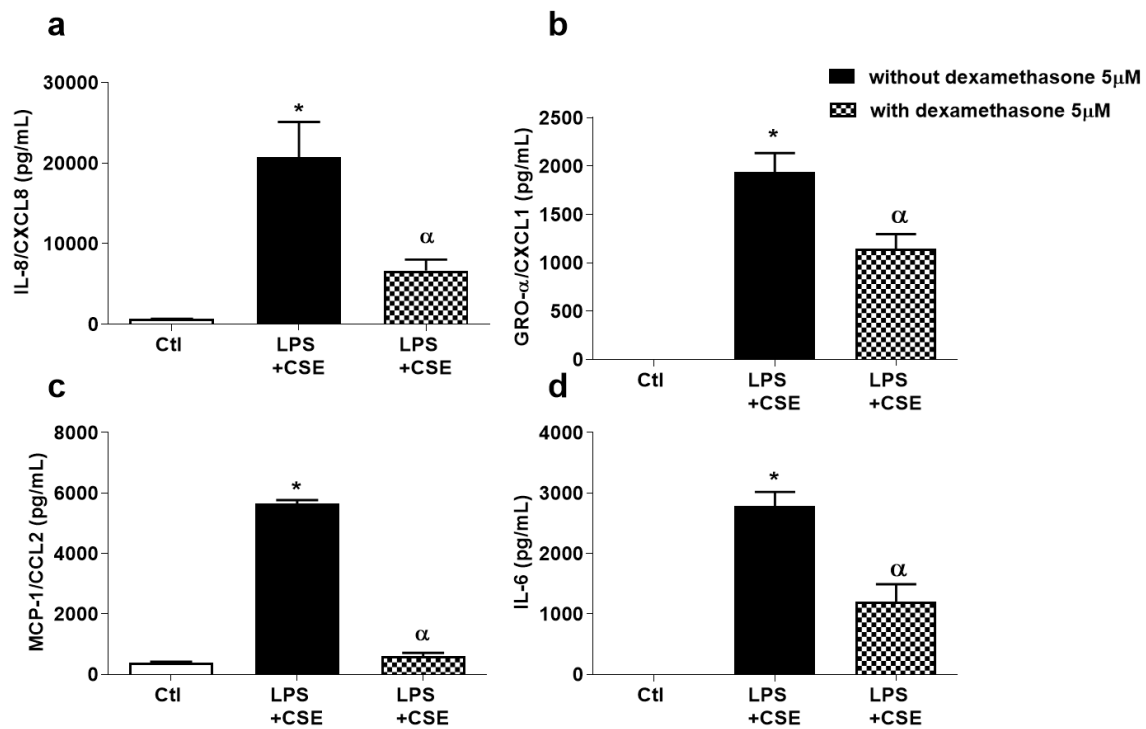


Figure 4. Effects of Dexamethasone on the production of CSE-LPS induced pro-inflammatory cytokines. The MDM were incubated with medium alone (Ctl), 4% CSE +0.1μg/ml with or without 5μM dexamethasone for 24h. The culture supernatants were collected, and the concentrations of IL-8/CXCL8, GRO-α/CXCL1, MCP-1/CCL2 and IL-6 were measured using an ELISA. The data were assessed in an ANOVA, followed by a Bonferroni post-test. The data correspond to the mean ± SEM of 8 donors. * p<0.05, compared to the control.

Figure 5

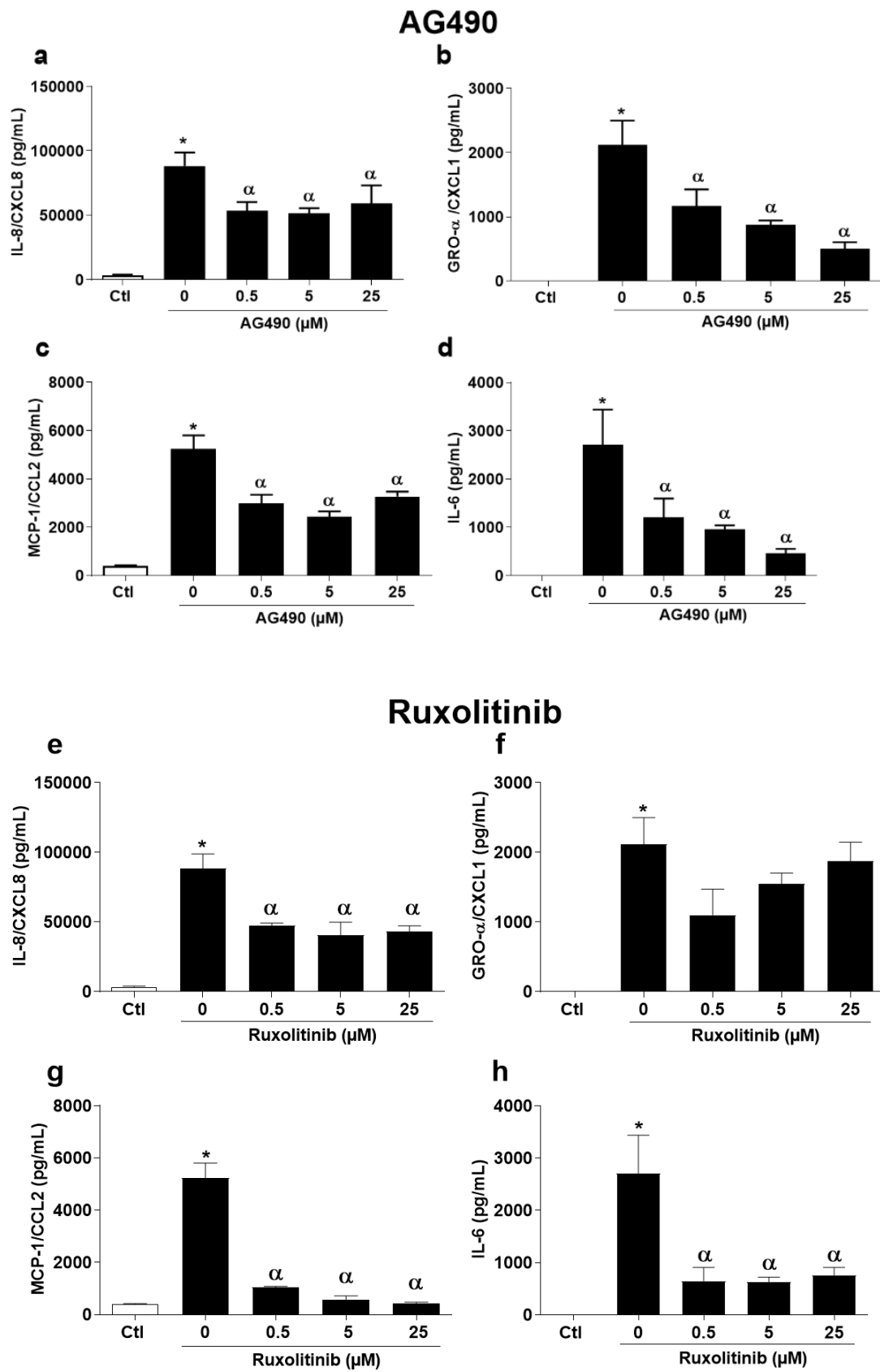


Figure 5. Effects of JAK/STAT inhibitors on the production of pro-inflammatory cytokines. The MDMs were incubated with medium alone (Ctl), vehicle (0.0125% DMSO), AG490 (0.5 μ M, 5 μ M, 25 μ M) (a-e) and Ruxolitinib (0.5 μ M, 5 μ M, 25 μ M) (f-j) 2h prior to stimulation with 4 % CSE + 0.1 μ g/ml LPS for 24h. The culture supernatants were collected, and measured using an ELISA. The data correspond to the mean \pm SEM of 3 donors. * $p < 0.05$ compared to the control; α $p < 0.05$ compared to the 4% CSE + 0.1 μ g/ml LPS.

Figure 6

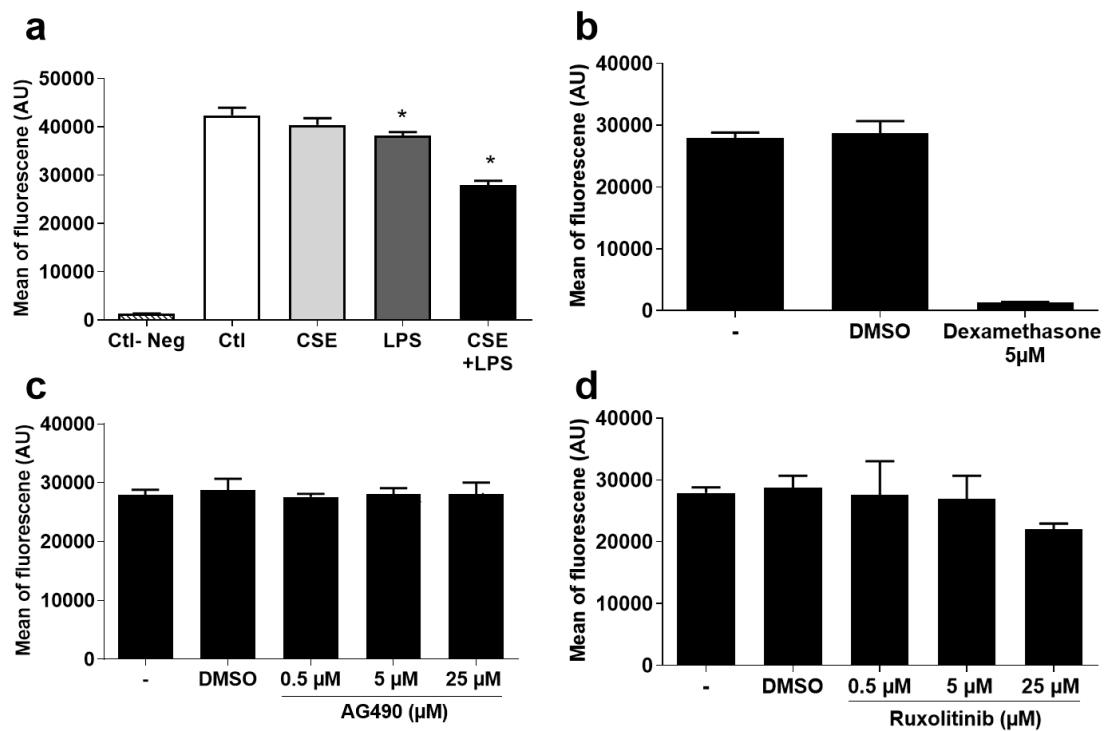
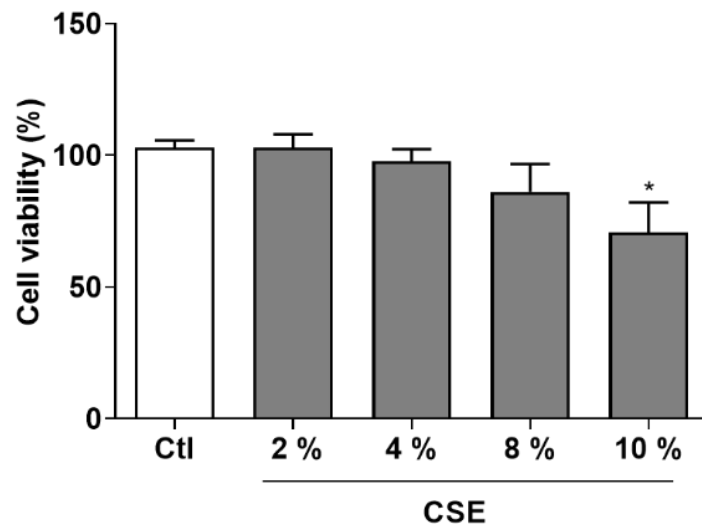


Figure 6. Effects of JAK/STAT inhibitors and Dexamethasone on microsphere uptake by MDMs. After 24h of exposure to treatments, the culture medium was renewed with medium containing fluorescent microspheres (size 100nm) and incubated overnight. After incubation, the culture medium was discarded and PBS was added to measure of fluorescence. The fluorescence emitted by microspheres inside cells was analyzed using the POLARstar Omega. The intrinsic fluorescence of MDMs was measured in the absence of microspheres. The data correspond to the mean \pm SEM of 4 donors. * $p < 0.05$, compared to the control.

Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 1. Effects of the CSE concentration on the MDMs viability. The MDMs were incubated with medium alone (Ctl) or with 2%, 4%, 8% or 10% CSE for 24h. The viability was assessed by an MTT assay. The data correspond to the mean \pm SEM of 5 to 7 donors. * $p < 0.05$, compared with the control.

B. Résumé des principaux résultats

Nous avons montré que les macrophages humains exposés à un extrait de fumée de cigarette libèrent de l'IL-8/CXCL8. Si cette exposition est associée à une stimulation par du LPS, la libération d'IL-8/CXCL8 augmente et est associée à la libération de MCP-1/CCL2. On note aussi une diminution de libération de l'IL-6 et du GRO- α /CXCL1 par rapport à la stimulation avec le LPS seul.

La libération de ces cytokines est réduite par l'utilisation de la dexaméthasone, notre traitement anti-inflammatoire de référence. L'utilisation d'inhibiteurs de la voie JAK/STAT, l'AG490 (inhibiteur spécifique de JAK2) et le ruxolitinib (inhibiteur de JAK1 et JAK2) a permis de diminuer la libération de ces cytokines après le traitement LPS+CSE. Le ruxolitinib montre une action plus modérée, n'inhibant pas la libération du GRO- α /CXCL1.

La capacité de phagocytose des macrophages est légèrement diminuée après l'exposition au CSE+LPS et devient quasiment inexistante après l'exposition à la dexaméthasone. En revanche l'utilisation des deux inhibiteurs de JAK/STAT n'altère pas cette capacité.

C. Discussion

Notre étude se base sur des macrophages humains dérivés de monocytes extraits du sang de donneurs sains. Ces macrophages ont été exposés à un traitement combinant le CSE avec du LPS afin d'obtenir un modèle d'étude mimant la BPCO. Ceci nous permet de tester des inhibiteurs (ici des inhibiteurs de la voie de signalisation JAK/STAT) pour bloquer les effets de la fumée de cigarette.

Les macrophages exposés au CSE et au LPS montrent plusieurs réponses. On détecte la libération d'IL-8/CXCL8 et de MCP-1, des chimiokines responsables de la chimiotaxie dirigée respectivement vers les neutrophiles et vers les monocytes (Yoshimura 2015; Deshmane and al. 2009b). Cette augmentation correspond aux autres données d'une autre équipe qui a montré que l'association d'un traitement LPS avec du CSE induit une augmentation d'expression d'IL-8/CXCL8 dans les macrophages alvéolaires des patients BPCO (Metcalf et al. 2014). La

concentration d'IL8/CXCL8 est aussi augmentée dans les lavages bronchoalvéolaires de ces patients (El-Shimy and al. 2014).

En revanche, nos données sur l'augmentation de la MCP-1/CCL2 vient contredire une étude sur la lignée de monocytes THP-1, où cette chimiokine est diminuée ans les cellules exposées au CSE (Hamon and al. 2018). À noter que cette réponse se produit avec du CSE à 10%, une concentration plus importante que les 4% que nous avons utilisé. Nos données montrent un effet toxique du CSE à 10% sur les macrophages, ce qui pourrait expliquer la différence avec les résultats obtenus par cette équipe.

Dans nos expériences, l'exposition des macrophages au LPS+CSE diminue la production de l'IL-6 par rapport au LPS seul. C'est aussi le cas dans les macrophages alvéolaires de souris (Gaschler and al. 2008). Dans les mêmes conditions, notre équipe avait déjà mis en lumière la diminution de production du GRO- α /CXCL1 (da Silva and al. 2020), résultat confirmé ici. Le traitement LPS+CSE a aussi pour effet de réduire la capacité de phagocytose des macrophages, une diminution observée dans la BPCO (Papi and al. 2006).

La fumée de cigarette induit des effets variés et même opposés, dus à la multitude de composés contenus dans les cigarettes. Parmi ceux-ci, la nicotine est capable de diminuer la signalisation de plusieurs cytokines pro-inflammatoires (Cui and al. 2013).

Pour cette étude, nous avons choisi de nous concentrer sur l'implication de la voie JAK/STAT dans la réponse des macrophages à la fumée de cigarette et son rôle dans la BPCO. L'activation de ces voies a déjà été décrite dans plusieurs modèles d'études.

Chez des rats traités au CSE+LPS pour établir un modèle de BPCO, les cellules épithéliales pulmonaires montrent des niveaux de phosphorylation de JAK1, JAK2, STAT1, STAT3 et STAT5 plus élevés. Les animaux présentent aussi une augmentation des niveaux de plusieurs cytokines pro-inflammatoires et une diminution des cytokines anti-inflammatoires (Wang and al. 2017). Dans un autre modèle, des souris traitées seulement à la fumée de cigarette voient l'expression de JAK3/STAT3 et NF- κ B augmentée dans les tissus pulmonaires, de même qu'une augmentation de la libération de cytokines pro-inflammatoires, comme l'IL-1 β , le TNF- α et l'IL-6. Le traitement des souris avec de l'ergostérol, une drogue aux propriétés anti-inflammatoire, permet de modérer ces changements d'une manière similaire à la dexaméthasone, utilisée comme référence dans cette étude (Huan and al. 2017).

Chez l'homme, les voies STAT1 et STAT3 sont activées chez les fumeurs et les patients BPCO (Yew-Booth and al. 2012). Des souris mutantes STAT3 (n'exprimant pas son isoforme β) ont été exposées 8 jours à de la fumée de cigarette. L'expression des protéases et des cytokines pro-inflammatoires est diminuée chez les souris STAT3^(-/-) en comparaison aux souris STAT3^(+/+) (Geraghty and al. 2013). La voie de signalisation JAK/STAT semble donc impliquée dans la réponse induite par la fumée de cigarette et par extension impliquée dans le développement de la BPCO.

Nous avons utilisé des inhibiteurs de la voie JAK/STAT, l'AG490 (inhibiteur JAK1) et le ruxolitinib (inhibiteur JAK1 et JAK2) avant de stimuler des macrophages humains avec du CSE et LPS. L'action de ces deux inhibiteurs a été comparée à celle de la dexaméthasone, notre traitement anti-inflammatoire de référence. Ces inhibiteurs ont réduit la libération de l'IL-8/CXCL8, de la MCP-1/CCL2, de l'IL-6 et du GRO- α /CXCL1. Chaque inhibiteur a montré une inhibition plus ou moins importante selon la cytokine observée. Le ruxolitinib, contrairement aux autres traitements, n'a pas réduit la libération du GRO- α /CXCL1. La capacité de phagocytose des macrophages, qui était déjà diminuée par le traitement LPS+CSE, est totalement bloquée après le traitement à la dexaméthasone, mais n'est pas affectée par l'utilisation des inhibiteurs de JAK/STAT.

L'action plus modérée des inhibiteurs JAK/STAT pourrait être un atout. En effet, les traitements actuels ne permettent pas combattre la progression de la maladie ou diminuer la mortalité et les effets sur les exacerbations ne sont pas assez satisfaisants (Vogelmeier and al. 2017). À cela s'ajoutent les effets secondaires provoqués par l'utilisation de ces traitements. Les corticostéroïdes inhalés sont communs pour le traitement des exacerbations dans la BPCO, mais dans un contexte où les patients font régulièrement face à des infections opportunistes, un traitement aux propriétés anti-inflammatoires trop importantes peut se montrer délétère (Papi and al. 2006). L'action du ruxolitinib pourrait s'intégrer dans un mécanisme anti-inflammatoire plus modéré permettant un meilleur équilibre entre l'effet anti-inflammatoire d'un traitement, et une moindre répression du système immunitaire combattant l'infection.

En 2009, Barnes et Adcock avaient déjà listé la voie JAK/STAT (notamment JAK3 et STAT5) dans les mécanismes possibles de la résistance aux traitements corticostéroïdes (Barnes and Adcock 2009). Nos résultats confirment l'implication de la voie JAK/STAT dans les mécanismes de réponse à la fumée de cigarette et nous permettent de suggérer cette voie comme une possible cible thérapeutique pour les traitements de la BCPO. Néanmoins, l'utilisation des inhibiteurs de la voie JAK/STAT reste encore à considérer avec prudence, car les infections

opportunistes semblent aussi se manifester pendant leur utilisation et leur potentiel cancérigène n'a pas encore été totalement défini (Winthrop 2017).

D. Conclusion

Cette étude a permis de confirmer les effets assez paradoxaux de la fumée de cigarette, qui entraîne à la fois des mécanismes pro-inflammatoires, avec une augmentation des signaux chimiotactiques vers les neutrophiles et les monocytes, mais aussi anti-inflammatoires, en diminuant l'expression de certaines cytokines et en réduisant la capacité de phagocytose des cellules. L'utilisation d'inhibiteurs de la voie JAK/STAT a permis de modérer les effets de la fumée de cigarette sur les macrophages, confirmant l'implication de cette voie dans les mécanismes de réponse à la fumée de cigarette. Contrairement à la dexaméthasone, les inhibiteurs de la voie JAK/STAT n'ont pas détérioré la capacité de phagocytose des macrophages. Ces observations nous permettent de suggérer la voie JAK/STAT comme une cible thérapeutique possible pour les traitements de la BPCO.

CHAPITRE II : Effets du NGF et de sa protéine de transport, la BSA, sur les monocytes humains

A. Contexte et objectifs

Découvert dans les années 50 par Rita-Levi Montalcini et son équipe (Rita Levi-Montalcini and Hamburger 1951), le NGF a été décrit pour son rôle dans la survie, la prolifération et la différenciation des cellules nerveuses (Levi-Montalcini 1987; Levi-Montalcini and al. 1995). Depuis plusieurs années, le NGF est considéré comme un possible facteur clé dans le développement de maladies pulmonaires inflammatoires telles l'asthme ou l'hypertension pulmonaire (Freund-Michel and Frossard 2008; Freund-Michel and al. 2015).

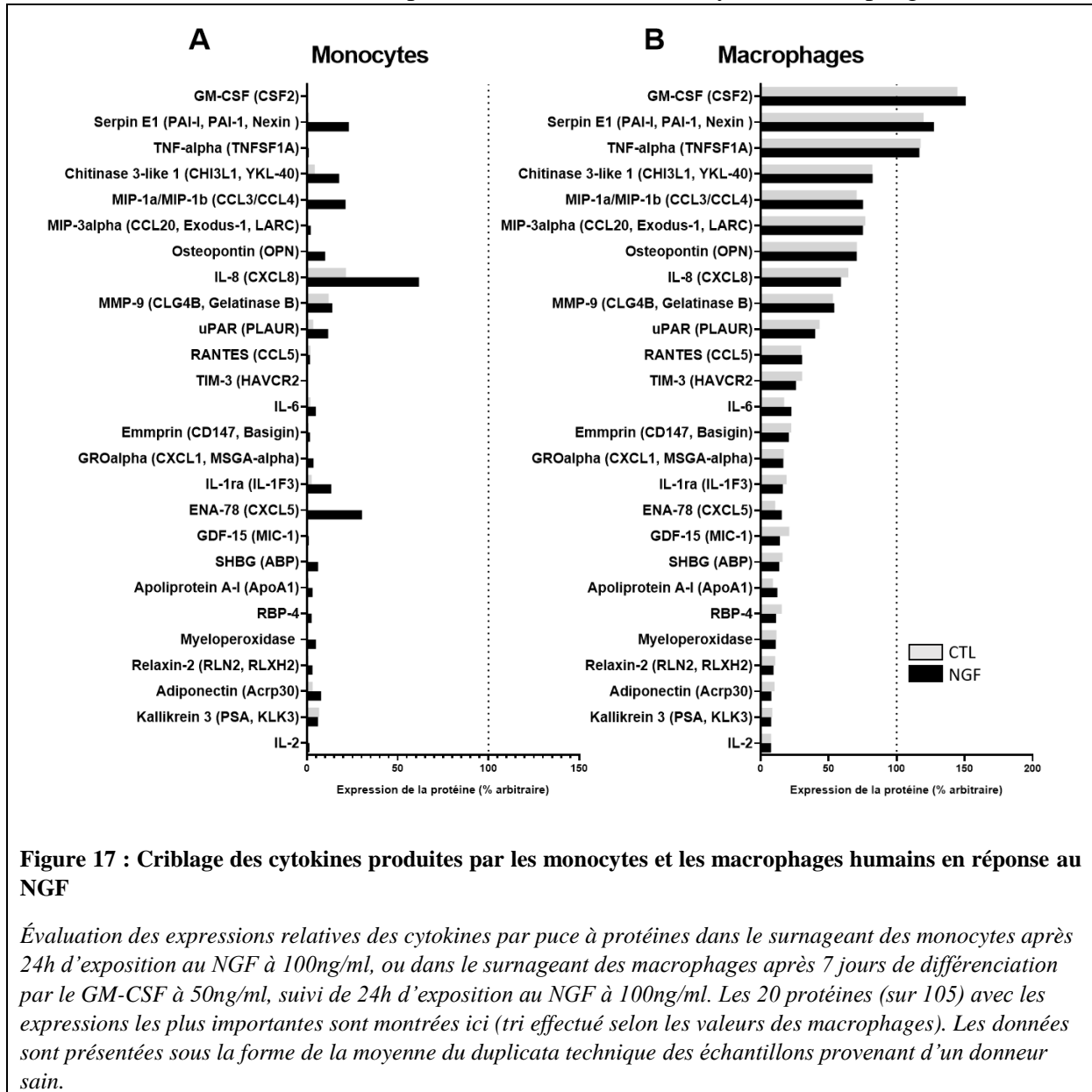
Les monocytes, recrutés aux poumons de façon plus importante dans des modèles d'hypertension pulmonaire (Li and al. 2011; Frid and al. 2006) peuvent contribuer à l'inflammation observée dans la pathologie (Hu and al. 2020). Les monocytes et les macrophages expriment les récepteurs au NGF (Minnone, De Benedetti, and Bracci-Laudiero 2017), ils peuvent être la cible d'une activation autocrine ou paracrine. L'exposition des monocytes THP-1 au NGF induit une augmentation de l'expression et de la libération d'une puissante cytokine pro-inflammatoire, l'IL-1 β (Datta-Mitra and al. 2015). Peu de données sont disponibles quant aux effets du NGF sur les monocytes et macrophages humains en culture primaire et particulièrement sur les monocytes non différenciés.

L'objectif de cette étude est d'explorer les effets du NGF sur les monocytes/macrophages à la recherche de signaux inflammatoires, chimiotactiques, ou de remodelage. Ceci pourrait aider à comprendre la contribution du NGF dans le développement de pathologies comme l'HTP. Nous pourrions évaluer son action directe sur les monocytes/macrophages, mais aussi indirecte sur les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales ou les fibroblastes via des cytokines ou des facteurs de croissance libérés par les monocytes et macrophages.

B. Résultats

1. Le potentiel de différenciation du NGF sur les monocytes humains

a) Différences de réponse au NGF entre monocytes et macrophages



Afin d'ouvrir des pistes de recherche, un criblage par puce à protéine a été effectué. Des monocytes, différenciés ou non en macrophages ont été exposés au NGF (100ng/ml) pendant 24h, les surnageants ont été collectés et les cytokines produites analysées semi-quantitativement grâce aux puces à protéines. De nombreuses cytokines sont induites, parmi lesquelles des

cytokines pro-inflammatoires, des chimiokines, des protéines jouant sur le remodelage tissulaire et des facteurs de croissance. Les monocytes (**Fig. 17A**) produisent des cytokines en quantité moins importante que les macrophages (**Fig. 17B**). Le niveau de la condition contrôle des monocytes est souvent très faible, voire indétectable et observe des augmentations relatives importantes avec le traitement NGF. Les macrophages au contraire, ont des niveaux de base élevés et détectables pour toutes les cytokines, mais l'augmentation relative avec le traitement NGF est moins importante.

b) Différenciation via l'exposition au NGF

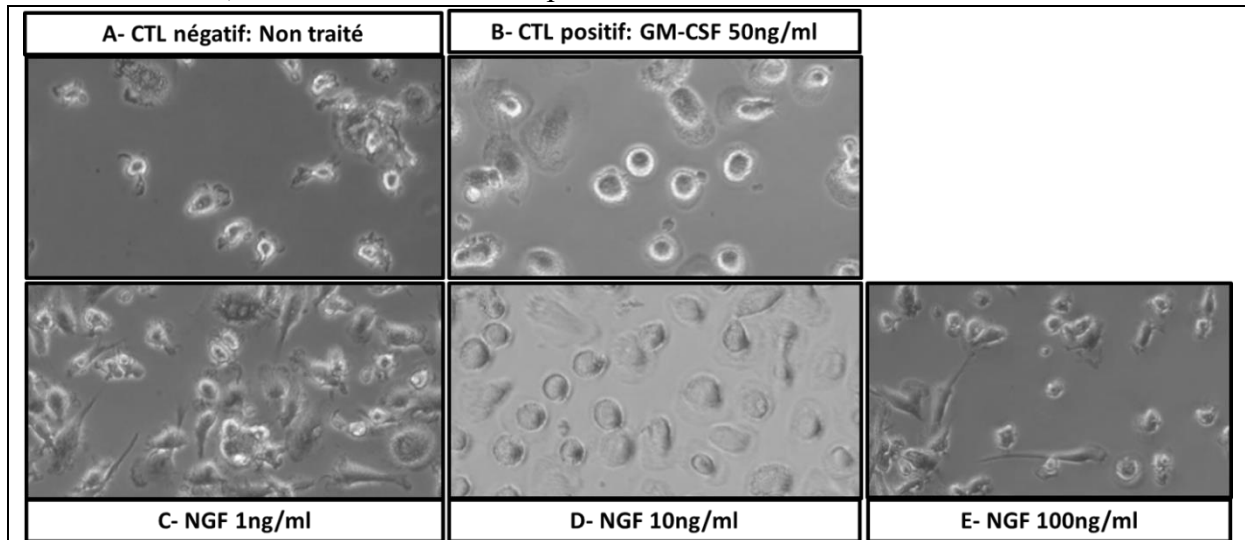


Figure 18 : Différenciation des monocytes exposés au NGF sur une longue durée

Photographies au microscope optique à contraste de phase de monocytes/macrophages après 7 jours de culture dans différents milieux de différenciation. Condition « contrôle négatif » non traitée (A), condition « contrôle positif » exposée au GM-CSF à 50ng/ml (B), et conditions « test » exposées au NGF à 1, 10 ou 100ng/ml (C-E).

Il a été tenté d'exposer les cellules pendant 1 semaine à du NGF au lieu du GM-CSF utilisé habituellement pour voir évaluer le potentiel de différenciation du NGF sur les monocytes. La condition non traitée (**Fig. 18A**), ne se différencie que très peu. Après 7 jours la majorité des cellules sont mortes et ont été décollées par les lavages et changements de milieu. Les cellules restantes ont pour la plupart gardé le phénotype des monocytes non différenciés, petits avec des contours irréguliers. La condition de différenciation « classique », exposée au GM-CSF (**Fig. 18B**) montre des cellules bien attachées, avec leur forme caractéristique « d'œuf au plat ». Les monocytes exposés au NGF à 1ng/ml (**Fig. 18C**) semblent montrer une meilleure survie que les monocytes CTL, présentes dans le puits en plus grand nombre. Une partie des

cellules prend l'apparence des cellules différenciées, mais on retrouve aussi des phénotypes très effilés, quasi fibroblastiques et certains monocytes gardent la forme des cellules non différenciées après 7 jours. Les cellules traitées avec 10ng/ml de NGF (**Fig. 18D**) montrent une apparence très similaire à la condition GM-CSF, les cellules sont nombreuses, bien attachées au support, avec cette même forme très arrondie. Les cellules traitées avec le NGF à 100ng/ml (**Fig. 18E**) montrent un phénotype similaire au traitement avec 1ng/ml, mais plus de cellules semblent décollées du support.

c) Expression du marqueur de différenciation macrophagique CD68 dans les différentes conditions de différenciation

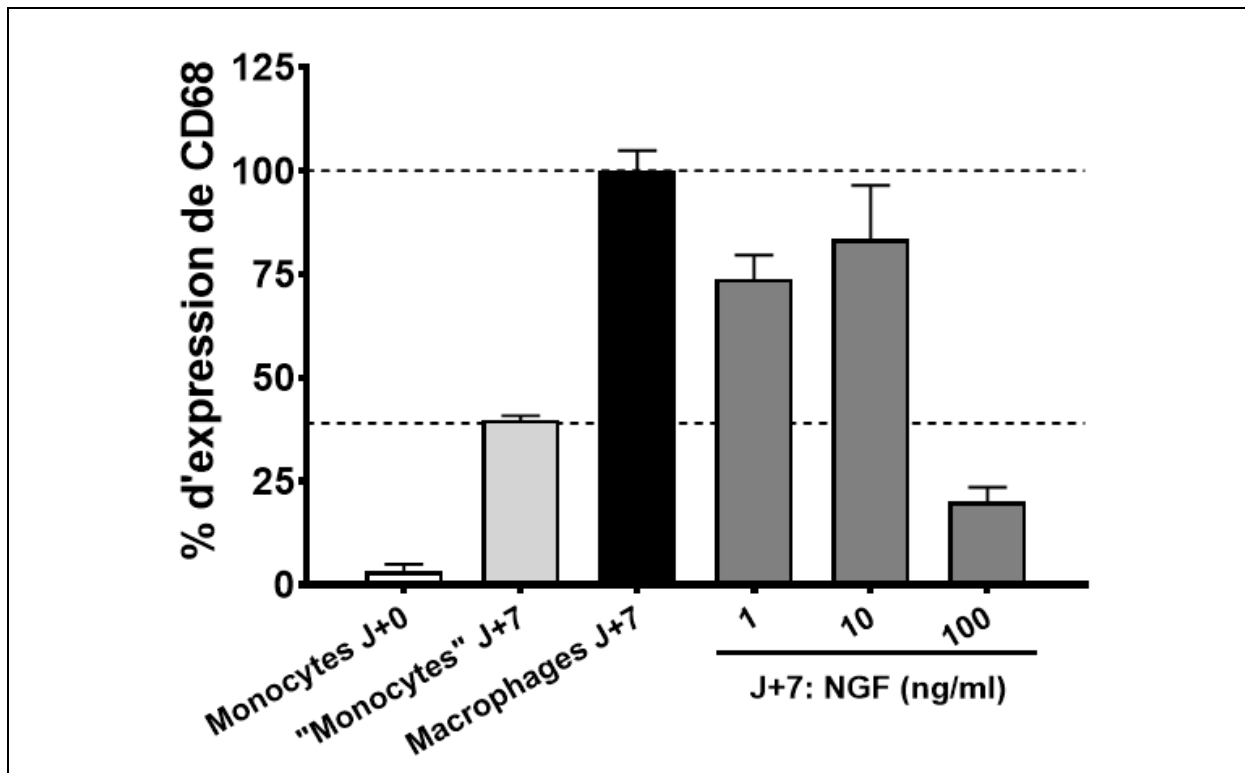
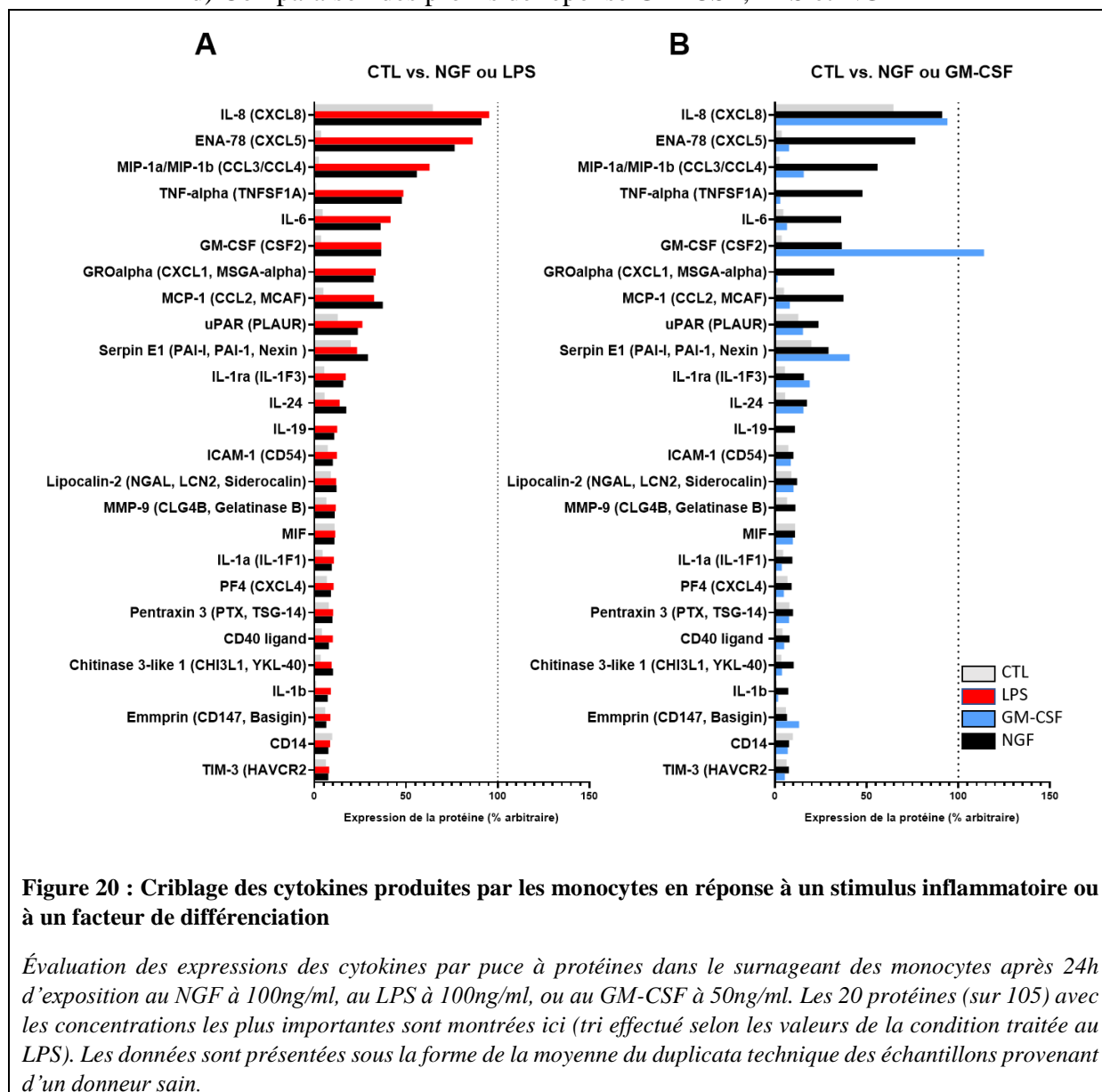


Figure 19 : Expression du marqueur CD68 après 7 jours de différenciation

Évaluation de l'expression relative du marqueur membranaire CD68 à la surface des cellules, mesurée par cytométrie en flux. Mesure effectuée sur les cellules qui ont été fixées et marquées après les 7 jours de différenciation avec différents traitements : conditions non-traitées (Monocytes), condition contrôle positif (Macrophages) exposée au GM-CSF à 50ng/ml, et conditions « test » exposées au NGF à 1, 10 ou 100ng/ml.

Après les traitements de différenciation, les cellules ont été décollées, fixées et marquées par des anticorps anti-CD68, un des marqueurs de différenciation des macrophages humains. Le niveau d'expression en surface de ce marqueur a été évalué par cytométrie en flux (**Fig. 19**). Les monocytes avant différenciation (J+0) ont un niveau très faible d'expression de CD68, par rapport aux macrophages différenciés (GM-CSF à J+7). Les « monocytes » à J+7 montrent une plus grande expression de CD68 qu'à J+0, de l'ordre de 35% de l'expression des macrophages différenciés. Les monocytes traités au NGF montrent aussi une expression accrue de CD68, particulièrement pour les cellules traitées avec 1ng/ml et 10ng/ml de NGF. Dans ces conditions, l'expression de CD68 avoisine les 75-80% du niveau des cellules différenciées. En revanche, les cellules traitées avec 100ng/ml de NGF montrent un niveau de CD68 de moins de 25%.

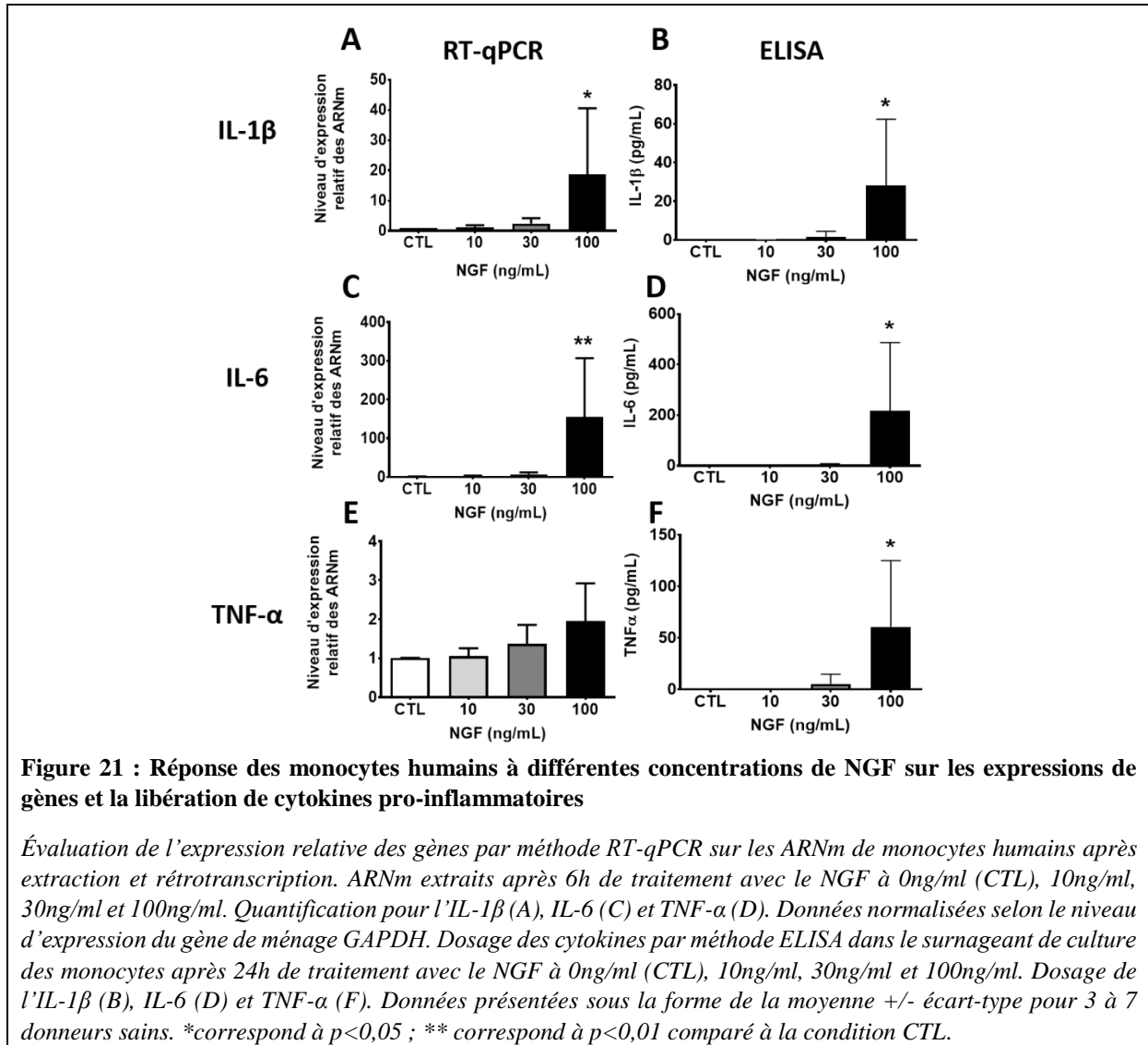
d) Comparaison des profils de réponse GM-CSF, LPS et NGF



Pour évaluer si le NGF induit un signal de différenciation ou un signal inflammatoire, un nouveau criblage a été effectué. Les monocytes non différenciés ont été traités 24h avec du NGF, du LPS ou du GM-CSF. Les réponses ont ensuite été comparées 2 à 2 : LPS vs. NGF (**Fig. 20A**) et GM-CSF vs. NGF (**Fig. 20B**). Il apparaît que les réponses au NGF et au LPS sont très similaires ; la quasi-totalité des cytokines montrent moins de 5-10% d'écart entre les niveaux induits par les deux traitements. En revanche, la comparaison entre les réponses au NGF et au GM-CSF donne des profils très différents.

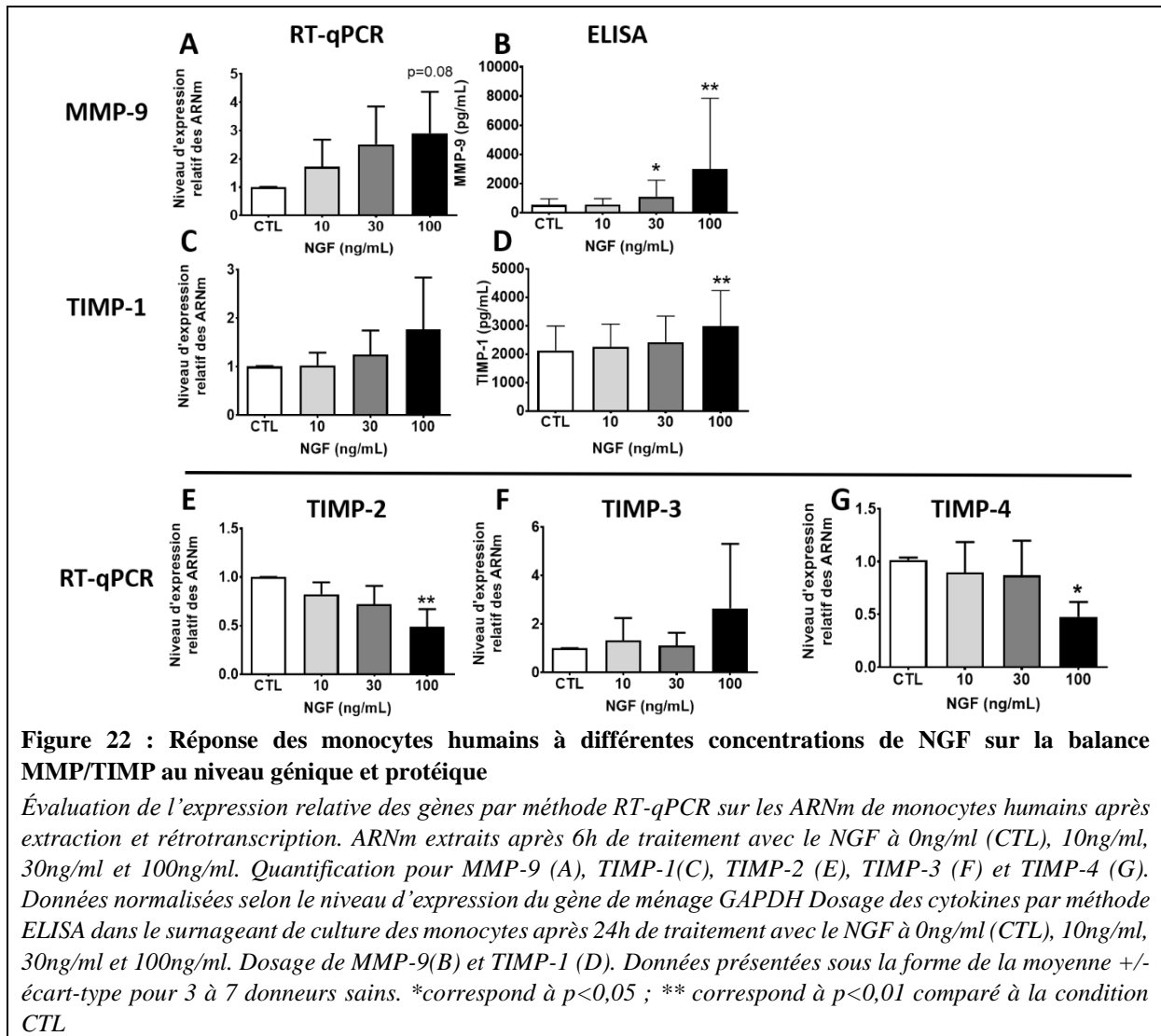
2. Inflammation, chimiotactisme et remodelage des monocytes exposés au NGF

a) L'action du NGF sur l'expression et la production de cytokines pro-inflammatoires.



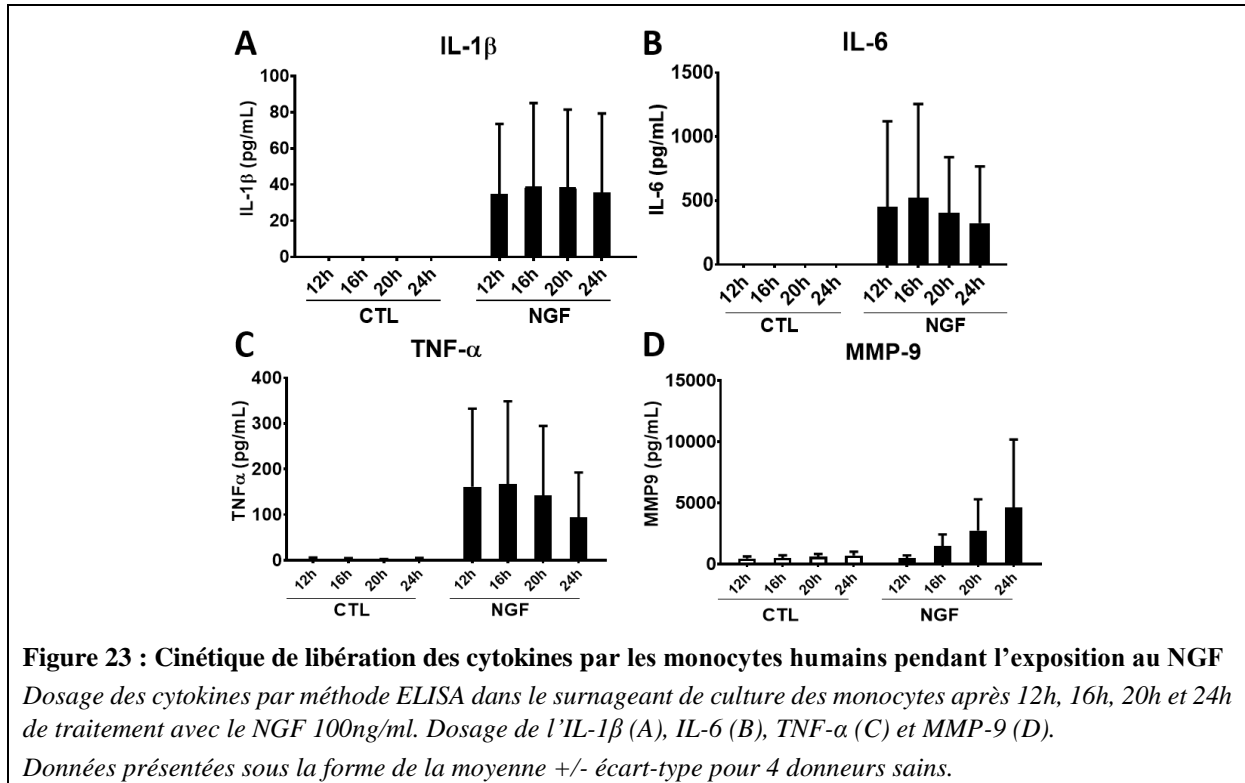
Nous nous sommes concentrés sur des expositions courtes des monocytes au NGF. Ici, des expériences en concentration-réponse ont été effectuées sur les monocytes. Les changements d'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF- α ont été observés par RT-qPCR (réaction de polymérase en chaîne quantitative en temps réel) (Fig. 21A, 21C et 21E) et ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) (Fig. 21B, 21D et 21F). Pour l'IL-1 β et l'IL-6, la concentration de NGF à 100ng/ml déclenche une augmentation significative de l'expression de la cytokine. Cette augmentation est détectée au niveau génique et protéique. Pour le TNF- α , cette augmentation est significative seulement au niveau protéique.

b) L'action du NGF sur la balance MMP/TIMP



Le déclenchement d'une réponse inflammatoire peut être associé ou suivi de changements liés au remodelage tissulaire. Un intérêt a donc été porté aux modifications d'expression de MMP et à leurs inhibiteurs tissulaires (TIMP) après l'exposition au NGF. Le NGF à 100ng/ml induit une augmentation d'expression des ARNm de MMP-9, sans atteindre le seuil de significativité (**Fig. 22A**). En revanche, la concentration de MMP-9 dans les surnageants de culture est significativement augmentée (**Fig. 22B**). Les expressions de TIMP-1 et TIMP-3 ne sont pas significativement modifiées par le NGF (**Fig. 22C et 22F**). On détecte une diminution significative des expressions de TIMP-2 et TIMP-4 en sa présence (**Fig. 22E et 22G**). La concentration de TIMP-1 dans les surnageants de culture est significativement augmentée en présence du NGF à 100ng/ml (**Fig. 22D**).

c) Cinétique de production des cytokines



Des cinétiques ont été mises en place pour repérer le temps où la réponse au NGF est la plus importante. Les cellules ont été traitées avec le NGF à 100ng/ml, les surnageants ont été récoltés entre 12h et 24h et analysés par technique ELISA pour quantifier l'IL-1β (**Fig. 23A**), l'IL-6 (**Fig. 23B**), le TNF-α (**Fig. 23C**) et la MMP-9 (**Fig. 23D**). Pour les cellules « CTL », aucune cytokine n'est détectée, sauf de très légers niveaux de MMP-9. Pour les cellules traitées au NGF, la faible taille d'échantillons ne permet pas de ressortir des données significatives. Les tendances observées montrent un « pic » de concentration à 16h pour la majorité des cytokines, avec un niveau qui diminue légèrement à 24h pour l'IL-6 et le TNF-α. La concentration de MMP-9 suit une évolution différente et augmente progressivement entre 12h et 24h.

d) Chimioquinas libérées après l'exposition au NGF

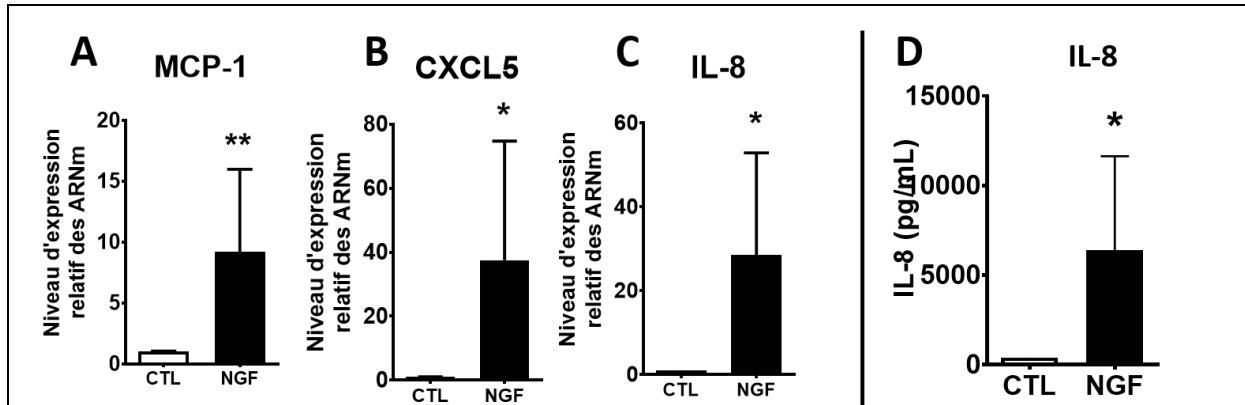
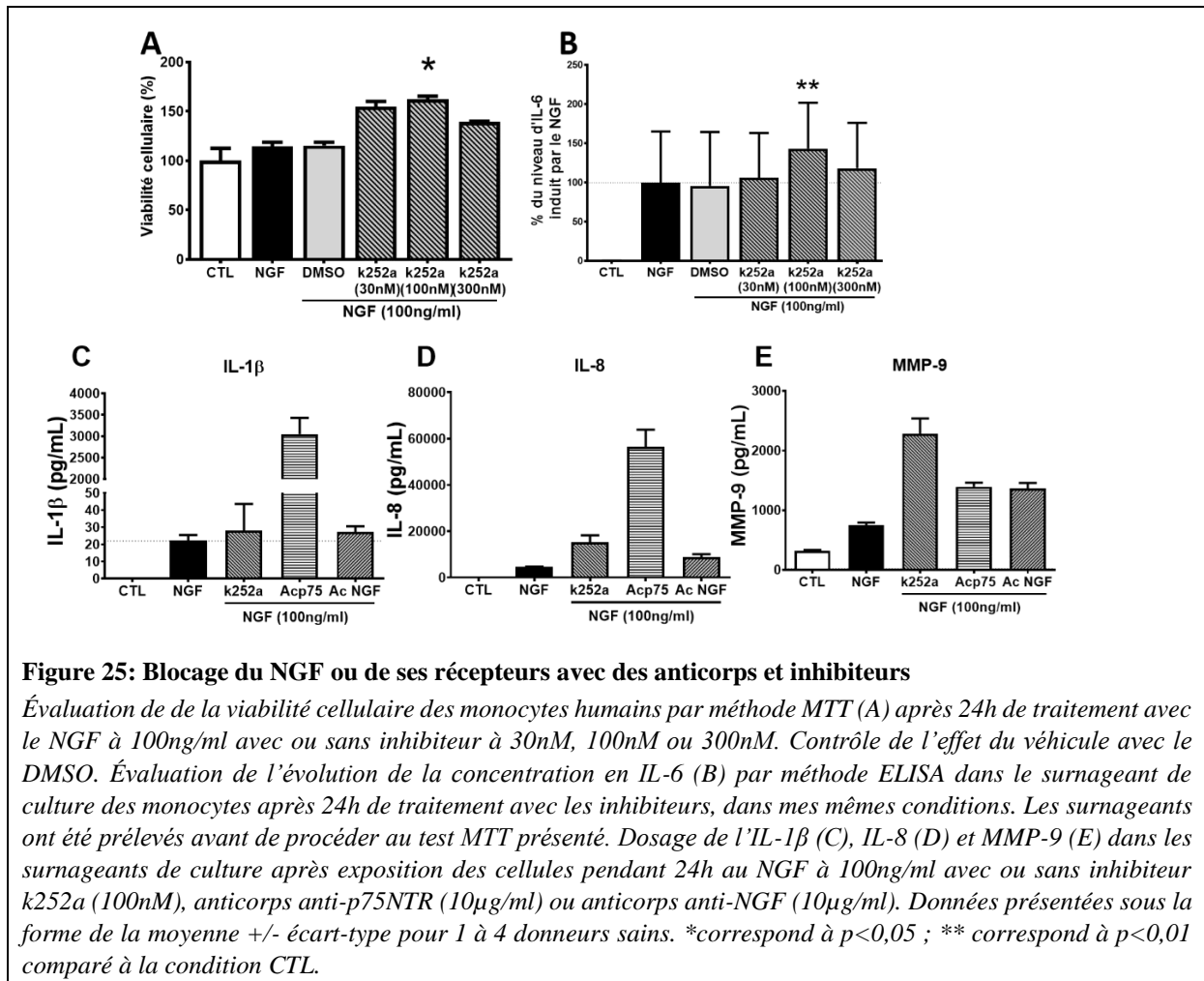


Figure 24 : Chimioquinas libérées par les monocytes humains exposés au NGF

Évaluation de l'expression relative des gènes par méthode RT-qPCR sur les ARNm de monocytes humains après extraction et rétrotranscription. ARNm extraits après 6h de traitement avec le NGF à 0ng/ml (CTL) et 100ng/ml (NGF). Quantification pour MCP-1 (A), CXCL5(B), IL-8 (C). Données normalisées selon le niveau d'expression du gène de ménage GAPDH. Dosage de cytokines par méthode ELISA dans le surnageant de culture des monocytes après 24h de traitement avec le NGF à 0ng/ml (CTL) et 100ng/ml (NGF). Dosage l'IL-8 (D). Données présentées sous la forme de la moyenne +/- écart-type pour 3 à 7 donneurs sains. *correspond à $p < 0,05$; ** correspond à $p < 0,01$ comparé à la condition CTL.

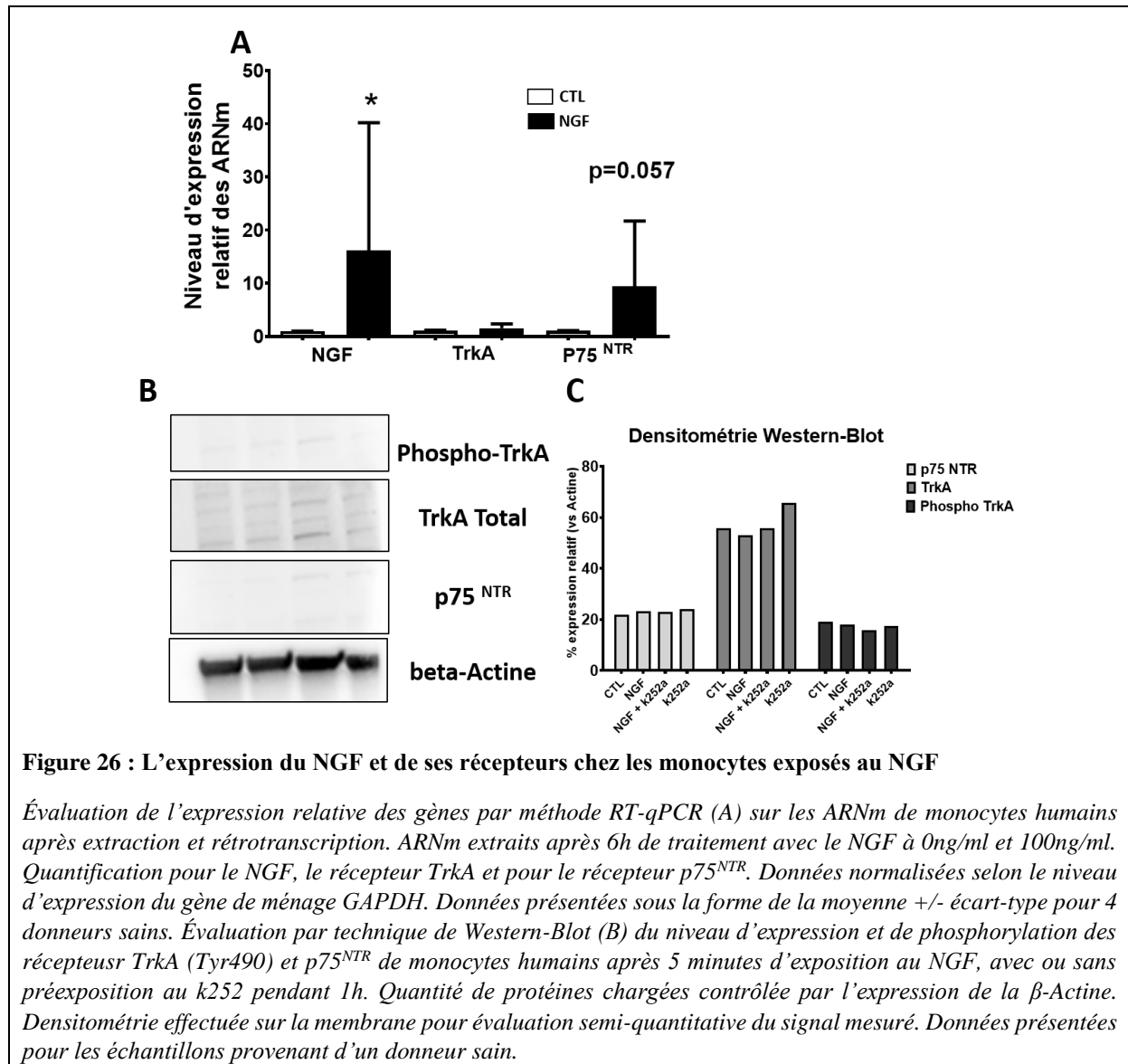
Dans le criblage effectué par puce à protéine, plusieurs chimioquinas semblaient induites par le NGF. Le niveau d'expression des ARNm de ces chimioquinas a été quantifié par RT-qPCR pour vérifier les données semi-quantitatives des puces à protéines. L'expression de plusieurs chimioquinas est effectivement augmentée. C'est le cas de la MCP-1/CCL2 (**Fig. 24A**), de ENA/CXCL5 (**Fig. 24B**) et de l'IL-8/CXCL8 (**Fig. 24C**) significativement augmentés par le NGF à 100ng/ml. L'augmentation de l'IL-8 a aussi été confirmée par ELISA dans les surnageants de culture (**Fig. 24D**).

e) Blocage des effets du NGF par ciblage du NGF, de TrkA ou de p75^{NTR}



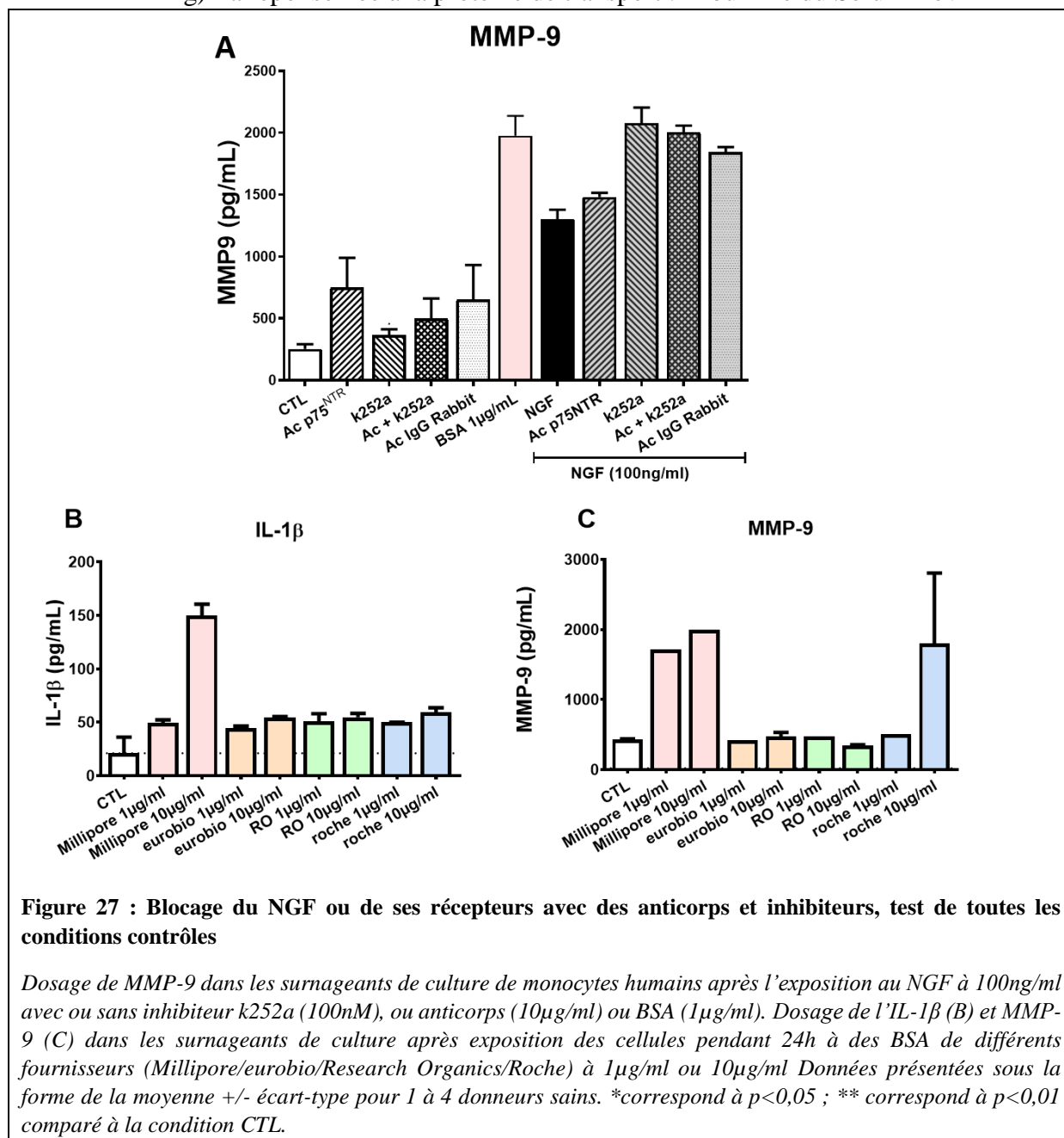
Pour apporter des précisions sur les récepteurs et voies de signalisation en jeu dans la réponse des monocytes exposés au NGF, nous avons tenté d'utiliser un inhibiteur du récepteur TrkA, le k252a. Son utilisation à différentes concentrations a légèrement augmenté la viabilité des monocytes exposés (**Fig. 25A**) et n'a pas permis de bloquer la réponse induite par le NGF. Contrairement à l'effet recherché, l'inhibiteur induit même une augmentation de la libération de l'IL-6 comparé à la condition traitée au NGF seul (**Fig. 25B**). Les anticorps bloquants dirigés contre le récepteur p75^{NTR} et contre le NGF ont aussi été utilisés. La réponse des monocytes au NGF n'a pas non plus été diminuée. De la même façon qu'avec le k252a, la production de cytokines est augmentée pour l'IL-1 β (**Fig. 25C**), l'IL-8 (**Fig. 25D**) et la MMP-9 (**Fig. 25E**).

f) Changements d'expression des récepteurs TrkA et p75^{NTR}



La difficulté à bloquer la réponse induite par le NGF nous a poussé à vérifier si ses récepteurs étaient bien exprimés chez les monocytes humains. Après une exposition au NGF à 100ng/ml, l'expression du NGF est augmentée (**Fig. 26A**). L'expression du récepteur TrkA ne semble pas varier et celle de p75^{NTR} s'approche d'une augmentation significative. Les protéines des récepteurs sont détectables en Western-Blot (**Fig. 26B et 26C**), mais à des niveaux relativement faibles. Le récepteur p75^{NTR} est quasiment indétectable. La phosphorylation du récepteur TrkA est observée, mais ne semble pas varier en présence du NGF, ni de l'inhibiteur k252a, censé bloquer sa phosphorylation.

g) La réponse liée à la protéine de transport : Albumine du Sérum Bovin



Les expériences de blocage du NGF ont été réitérées avec un maximum de conditions contrôle. Un dosage de MMP-9 dans le surnageant a été effectué pour suivre les conditions capables de stimuler les cellules, avec ou sans NGF (**Fig. 27A**). Il apparaît que les anticorps et inhibiteurs, utilisés seuls, sont capables d'induire une augmentation de la libération de MMP-9. Une des conditions contrôle est particulièrement importante ici, la condition traitée avec l'albumine de sérum bovin (BSA). La BSA est la protéine de transport présente dans la solution stock de NGF. Dans cette condition, une quantité équivalente de BSA a été injectée dans le

milieu de culture sans le NGF. Cette condition montre une capacité à induire une augmentation de MMP-9 du même ordre de grandeur, si ce n'est plus importante que la condition NGF. Nous avons vérifié que le problème ne venait pas d'un lot isolé ou du fournisseur. Quatre références de BSA ont été testées, montrant toutes une capacité à augmenter la libération d'IL-1 β (**Fig. 27B**). Deux de ces quatre références augmentent aussi la libération de MMP-9 (**Fig. 27C**).

Ce résultat qui remet en question la fiabilité des données préliminaires présentées, a été exploré plus précisément et décrit dans le manuscrit qui suit. Ce travail sera soumis prochainement dans le journal « *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* ».

Effects of the nerve growth factor (NGF) and its carrier protein, the bovine serum albumin (BSA), on human monocytes.

Yann Verres ¹, Aude Bodin ¹, Tatiana Victoni ², Véronique Freund-Michel ^{3,4}, Thomas Gicquel ¹, Vincent Lagente ¹

Affiliations ;

- 1- NuMeCan Institute (Nutrition, Metabolism and Cancer), INSERM, INRAE, CHU Rennes, Univ Rennes, France.
- 2- University of Lyon, VetAgro Sup, APCSE, Marcy l'Etoile, France.
- 3- INSERM, Centre de recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, U1045, 33000 Pessac, France
- 4- Univ. Bordeaux, Centre de recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, U1045, 33000, Bordeaux, France

Corresponding author: Yann Verres, NuMeCan institute, Rennes, France.

E-mail: yannverres@free.fr/yann.verres@univ-rennes1.fr; phone number : (+33) 7.80.04.34.29

Abstract

The nerve growth factor (NGF) has been previously shown to be involved in cellular proliferation, differentiation, survival or wound healing. The present study investigated the pro-inflammatory and remodeling effects of NGF and its carrier protein, the bovine serum albumin (BSA), on human blood monocytes. These cells were obtained from blood of healthy donors and treated with NGF at various concentrations. This treatment induced an increased expression of pro-inflammatory, chemotactic and remodeling genes: interleukin (IL)-1 β , IL-6, tumor necrosis factor (TNF)- α and IL-8/C-X-C motif ligand (CXCL)8 and also increased the protein levels of IL-8/CXCL8 and MMP-9 in the cell supernatants measured by ELISA. We then evidenced that a part of this response was induced by BSA, that could even induce a response if used alone without NGF, but with a weaker response. More precisely, it is likely the impurities contained in the “low grade” BSA used in our experiments that induced this response, as it completely vanished after using a high-purity BSA in the same conditions. In addition, with the high purity BSA, NGF did not display anymore the previously observed response. This suggest that NGF is able to enhance monocyte inflammatory responses once cells are stimulated with another signal but is not able to directly activate it. This work highlights the importance to find suitable vehicles and set up the right control conditions for treatments in research and can be helpful for anyone using BSA in cell culture.

Keywords: Bovine Serum Albumin, Inflammation, Monocytes, Nerve Growth Factor, Vehicle Control

List of abbreviations

- BSA: Bovine serum albumin
- CCL: C-C motif ligand
- CD: Cluster of differentiation
- CXCL: C-X-C motif ligand
- DMSO: Dimethyl sulfoxide
- DNA: Deoxyribonucleic acid
- EDTA: Ethylene diamine tetra acetic acid
- ELISA: Enzyme linked immunosorbent assay
- FBS: Fetal Bovine Serum
- IL: Interleukin
- LPS: Lipopolysaccharide
- MAPK: Mitogen-activated protein kinases
- MCP: Monocyte chemoattractant protein
- MMP: Matrix metalloproteinase
- NF- κ B: Nuclear factor-kappa B
- NGF: Nerve Growth Factor
- p75^{NTR}: p75 neurotrophin receptor
- PBS: Phosphate buffered saline
- RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium
- RT-qPCR: Real-time quantitative polymerase chained reaction
- TIMP: Tissue inhibitor of metalloproteinase
- TLR: Toll-like receptor
- TNF: Tumor necrosis factor
- TrkA: Tropomyosin-related kinase A

Introduction

The nerve growth factor (NGF) is a protein constituted of two homodimers of 13.5kDa that can bind two different receptors, the Tropomyosin-related kinase A (TrkA) and the p75 neurotrophin receptor (p75^{NTR}), respectively with high (picomolar) and low (nanomolar) affinity binding (Levi-Montalcini and Hamburger 1951; Sutter et al. 1979). NGF was first described for its action on differentiation, survival and proliferation of neural cells (Levi-Montalcini 1987; Levi-Montalcini et al. 1995). NGF was also linked to chronic pain, inflammation and wound healing (Norman and McDermott 2017; Caroleo et al. 2001; Schenck and al. 2017). Since the past years, it is also considered as a possible key factor in pulmonary inflammatory diseases such as asthma or pulmonary hypertension (Freund-Michel and al. 2015; Freund-Michel and Frossard 2008).

Circulating cells can play an important role in pulmonary inflammatory diseases and contribute to the progression of the pathology (Li and al. 2011; Frid and al. 2006; Florentin and al. 2018). In addition, since most of these cells express NGF receptors (Minnone, De Benedetti, and Bracci-Laudiero 2017), they may be able to respond to the circulating NGF and/or to the NGF produced locally by other cells. It was already shown that THP-1 monocytes can respond to NGF by increasing the liberation of interleukin (IL)-1 β , a potent pro-inflammatory cytokine (Datta-Mitra and al. 2015), but few data are available regarding the effects of NGF on undifferentiated human monocytes.

In order to bring more insight on the human monocyte response to NGF, we evaluated the expression of IL-1 β , IL-6 and tumor necrosis factor (TNF)- α , since the secretion of these cytokines is known to be frequently involved in pro-inflammatory responses (Rossol and al. 2011b; Guha and Mackman 2001; Chanput and al. 2010). We previously found that the chemokines IL-8/C-X-C motif ligand (CXCL)8 and monocyte chemoattractant protein (MCP)-1/C-C motif ligand (CCL)-2 are important factors in the inflammatory response of monocyte-derived macrophages (da Silva and al. 2020), the expression of these chemokines was also investigated. Finally, monocytes and macrophages often take part in tissue remodeling by regulating the matrix metalloproteinase (MMP)/ tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) balance, that can play a crucial role in the development of pathological conditions (Khokha, Murthy, and Weiss 2013; Duda et al. 2020; Lagente and al. 2005). In particular, since MMP-9 and TIMP-1 expressed by inflammatory cells can play a major role in pulmonary inflammation and remodeling (Lagente and al. 2005; Corbel and al. 2002), NGF-induced alterations of MMP-9 and TIMP-1 expression in human blood-extracted monocytes have also been investigated.

When used *in vitro*, NGF is required to be associated with a carrier protein that helps to maintain its stability in the cell culture media. Classically, the carrier used is the bovine serum albumin (BSA), a 66.5kDa protein extracted from cow plasma that is widely used for different applications in cellular and molecular biology. In our experiments, we will assess the importance of BSA and its purity, in the response of blood extracted monocytes treated with NGF in order to find *in vitro* results on inflammation, chemotaxis and remodeling, that might be relevant to *in vivo* physiological and/or pathophysiological conditions.

Methods

Materials

Bovine Serum albumin “Probumin” was purchased from Millipore (82-045-1), (Merck, Darmstadt, Germany); endotoxin low and fatty acid low Bovine Serum Albumin was purchased from Sigma, (Merck, Darmstadt, Germany); “DuoSet” Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kits and human recombinant Nerve Growth factor were supplied by R&D systems (Biotechne, Minneapolis, USA); CD14 magnetic microbeads kit was supplied by Miltenyi Biotec (Bergish, Germany); ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA) was purchased as “0.5M pH 8.0 Ultrapure EDTA” from Invitrogen (Waltham, USA); Phosphate buffered saline (PBS), RPMI 1640 medium, L-Glutamine and Penicillin-Streptomycin were purchased from Gibco (Life Technologies, USA); Fetal Bovine Serum (FBS) “Hyclone” came from Fischer scientific (USA); Ficoll centrifugation tubes are from eurobio scientific (France); RT-PCR kit “High-capacity cDNA Achieve Kit”, the “Power SYBR Green PCR MasterMix”, the thermocycler “QuantStudio™ 7 Flex System” bought from Applied Biosystems (USA)

Cell culture

Human monocytes were harvested from blood sample of healthy donors. The buffy coats donations were obtained from the French Blood Agency (*Etablissement Français du Sang*, Rennes, France). All experiments were conducted in compliance with the French legislation on blood transfusion safety (Act 93-5, January 4th, 1993). All samples are from donors that gave their informed and written agreement to participate in a research project.

Briefly, the buffy coat was diluted 1:1 in PBS with 2mM of EDTA and centrifuged using Ficoll to separate the peripheral blood mononuclear cells (PBMC). PBMC were then washed several

times with PBS-EDTA and sorted using the CD14 magnetic microbeads separation kit to target the CD14⁺ monocytes. These isolated cells were then resuspended in the culture medium (RPMI 1640 supplemented with 2% of FBS, 1% of L-Glutamine and 0.1% of Penicillin/Streptomycin), and seeded at 1.5×10^6 cells/ml in 6-well plates.

Treatments

As recommended by the manufacturer, NGF was reconstituted in PBS with 0.1% BSA. Two NGF stock solutions were prepared at 100 μ g/ml, reconstituted in PBS with either “low-grade purity” BSA (NGF-BSA) or “high-grade purity” BSA (NGF-BSA_{up}). Cells were then incubated in the absence or presence of NGF-BSA or NGF-BSA_{up}, at a final NGF concentration of either 10 or 100ng/ml, for 6h to perform mRNA quantification assays, or for 24h to perform protein quantification assays. In parallel, as controls, two PBS-BSA solutions were also prepared without NGF (PBS-BSA or PBS-BSA_{up}) to treat monocytes with a similar amount of BSA that the one found in the NGF treatments (10ng/ml of NGF contained 0.1 μ g/ml of BSA and 100ng/ml of NGF contained 1 μ g/ml of BSA).

mRNA quantification assays

Total mRNA was extracted from cells using the NucleoSpin RNA extraction kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany), following manufacturer recommendations and quantified using a NanodropTM Spectrophotometer (Nyxor Biotech, Paris, France). 300ng were used to proceed a retro-transcription. 5ng of cDNA of each sample were then used to proceed RT-qPCR quantification, using the SYBR-Green method. The mRNA levels were evaluated using the $2^{-(C_{ddCT})}$ formula, and were normalized using glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as a housekeeping gene.

Protein quantification assays

Levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-8, MMP-9 and TIMP-1 in the cell culture supernatants were quantified using ELISA assays, following the manufacturer’s protocol and using the “POLARstar Omega” plate reader (BMG Labtech, Ortenberg, Germany).

Statistical analysis

The data are presented as the mean \pm standard deviation (SD) of N =3 or 4 independent experiments. The data were assessed in a non-parametric one-way ANOVA followed by a Dunn post-hoc test. The significance threshold was set at the p-value of 0.05. All statistical analyses were conducted with the GraphPad Prism software (v8.0, GraphPad, USA).

Results

Effects of NGF and BSA on various gene expression in human monocytes

The primary focus of the study was to assess the inflammatory and remodeling response of the human monocytes after NGF exposure. For that, monocytes were exposed during 6 hours to NGF at two different concentrations (10 or 100ng/ml), initially using a low-grade purity BSA as protein carrier (NGF-BSA solution). Treatment with NGF-BSA (100ng/ml of NGF) significantly increased the mRNA levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α , and IL-8/CXCL8 (**Fig 1a, 1b, 1c, and 1d**). Increased expression was also observed for MCP-1/CCL2, MMP-9 and TIMP-1 (**Fig 1e, 1f and 1g**), but without reaching statistical significance. Treatment with NGF10-BSA (10ng/ml of NGF) showed no significant changes (**Fig 1**).

To verify the specificity of the monocyte response to NGF, monocytes were treated with the vehicle used in the previous NGF treatment (PBS-BSA solution) and results were compared to control untreated cells. PBS-BSA at 0.1 μ g/ml of BSA did not induce any significant effect. By contrast PBS-BSA at 1 μ g/ml of BSA was able by itself to significantly increase MMP-9 mRNA expression (**Fig 1f**). IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2, and TIMP-1 mRNA expression also tended to increase, although without reaching statistical significance (**Fig 1a, 1b, 1c, 1d, 1e and 1g**). However, except for MMP-9 gene expression, the increase in mRNA levels were greater with the NGF-BSA treatment than with the PBS-BSA treatment (**Fig 1**).

Effects of NGF and BSA on cytokine production from human monocytes

Cytokines in the monocyte supernatants were quantified after 24h of the same treatments, using NGF-BSA or PBS-BSA solutions. The levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α were too close to the limit of detection to be reliable. IL-8/CXCL8, MMP-9 and TIMP-1 levels could be measured within the range of detection in our experimental conditions. Treatment with NGF10-BSA

(10ng/ml of NGF) did not induce significant changes. By contrast, treatment with NGF100-BSA (100ng/ml of NGF) was able to significantly increase IL-8/CXCL8 and MMP-9 protein expression (**Fig 2a** and **2b**). TIMP-1 protein expression was slightly, but not significantly, increased (**Fig2c**).

Monocytes were also treated with the vehicle (PBS-BSA solution) and results were compared to control untreated cells. PBS-BSA at 0.1 µg/ml of BSA did not induce any changes (Fig 2). By contrast, PBS-BSA at 1 µg/ml of BSA was able by itself to significantly increase MMP-9 protein expression (**Fig 2b**). IL-8/CXCL8 and TIMP-1 levels also tended to increase, without reaching statistical significance (**Fig 2a** and **2c**). Except for MMP-9 protein expression, the changes observed with NGF-BSA treatment were greater than with PBS-BSA treatment.

Effects of NGF and ultrapure BSA on various gene expression in human monocytes

To identify potential effect of low grade BSA, we used an ultrapure BSA (BSA_{up}). This BSA was tested alone (PBS-BSA_{up}) and as a carrier protein of NGF (NGF-BSA_{up}). The monocyte response to these new treatments containing BSA_{up} was nearly null with both treatments for most of the gene expression studied (**Fig 3**). Only IL-8/CXCL8 mRNA expression was slightly but significantly reduced after treatment with PBS-BSA_{up} at 1 µg/ml of BSA_{up} (**Fig 3d**).

Effects of NGF and ultrapure BSA on cytokine production from human monocytes

The cytokines in the supernatant of monocytes treated with NGF-BSA_{up} or PBS-BSA_{up} were also quantified. IL-1β, IL-6 and TNF-α levels were still too close to the limit of detection to provide reliable data. The quantification of IL-8/CXCL8, MMP-9 and TIMP-1 did not show any significant modification (**Fig 4**).

Discussion

The primary aim of our study was to get a better understanding of the role of NGF in the inflammatory and remodeling processes of human monocytes, possibly linked to the development of pulmonary inflammatory diseases. In our experiments, fresh human monocytes were exposed to NGF, but because of the need of a carrier protein for NGF, monocytes were

also in contact with a certain quantity of BSA. Therefore, a “vehicle” control condition with BSA alone, was necessary.

We showed that the BSA alone (PBS-BSA) was able to significantly increase MMP-9 gene and protein expression. Increases in the gene expression of IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2 and TIMP-1 as well as in protein expression of IL-8/CXCL8 and TIMP-1 protein expression were observed, although not reaching statistical significance.

BSA is widely used in cell culture as a carrier protein for different growth factors or cytokines. To our knowledge, no data about a pro-inflammatory effect of BSA has been described, so it was unlikely that the pro-inflammatory effects observed in the PBS-BSA conditions really came from BSA itself. Thus, we investigated the possibility that these results were due to the use of a low grade BSA. Depending on the supplier and on the purity of the product, BSA can contain important amounts of endotoxins or fatty acids that may be able to stimulate fresh human monocytes. Indeed, due to their sensor role in the immune system, these cells are meant to easily respond to exogenous signals.

Endotoxins, also known as lipopolysaccharides (LPS), can activate the nuclear factor (NF)- κ B and mitogen-activated protein kinases (MAPK) pathways and induce the release of many pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α and many others (Guha and Mackman 2001; Rossol and al. 2011b). Even very low doses of LPS around 0,1-0,2ng/ml are able to prime or activate monocytes (Landmann and al. 1996; Monguió-Tortajada and al. 2018). Saturated fatty acids can also activate the production of IL-1 β and MCP-1/CCL2 through TLR stimulation and activation of the NF- κ B pathway (Han and al. 2010; Snodgrass and al. 2013). Meanwhile, polyunsaturated fatty acids have been described to decrease the production of pro-inflammatory cytokines by inhibition of the NF- κ B pathway (Zhao and al. 2005). It could therefore be interesting to determine what type of fatty acids are present in the low grade BSA used in order to possibly explain the observed inflammatory response. It is unlikely that fatty acids are the sole responsible for our observation, because in our treatments, we only used 1 μ g/ml of BSA with a 99% purity, in which we can expect a maximum of 0,01 μ g/ml of “impurities”, while these studies are using 1 to 100 μ M of fatty acids, which correspond to approximately 0,25 to 25 μ g/ml (Zhao and al. 2005; Snodgrass and al. 2013).

In order to know whether endotoxins and/or fatty acids contained in the BSA used may explain our results in the PBS-BSA condition, monocytes were also treated with another BSA, certified “ultrapure” (PBS-BSA_{up}) with a very low endotoxin and fatty acid levels. In these BSA_{up}

conditions, we did not observe any increase in the expression of the genes that were observed with the previous BSA. Despite not having done a quantification of the fatty acids and endotoxins in our cell supernatant to confirm this difference, the absence of pro-inflammatory response with BSA_{up} strongly suggests that the problem indeed came from the lower grade of the BSA initially used, and not the BSA itself.

Surprisingly, we noticed a significant decrease in IL-8/CXCL8 mRNA levels in the PBS-BSA_{up} condition. We observed previously that the impurities contained in low-grade BSA are potentially able to impact cytokine production, with pro-inflammatory, or anti-inflammatory effects. In our data, the low grade BSA showed to be on the pro-inflammatory side, which disappeared after using high-grade BSA. It is possible that removing the pro-inflammatory stimulation left more room for the anti-inflammatory counterpart, for example with the action of polyunsaturated fatty acids, able to down-regulated NF- κ B (Zhao and al. 2005), one of a pathways for IL-8/CXCL8 production (Hoffmann and al. 2002), explaining the observed decrease.

These differences in the grade of BSA used were impactful in our experiments with NGF. When associated with the “ultrapure” BSA (NGF-BSA_{up}), NGF did not induce any increase in mRNA expression of the genes we observed. By contrast, when associated to the “low-grade” BSA (NGF-BSA), NGF led to a greater increase in mRNA expression for IL-1 β , IL-6, TNF- α and IL-8 than the “low-grade” BSA alone. These results therefore suggest that fresh human monocytes are unable to respond to NGF alone, but are able to respond to NGF once they are primed by another signal, i.e. “low-grade” BSA here.

Another issue in our experiments is that the increased mRNA expression for IL-1 β , IL-6, TNF- α and IL-8 could not be confirmed at the protein level for all cytokines. Only the increase of IL-8/CXCL8 was confirmed at the protein level. A few optimizations could be done on the timing of the harvest of the supernatants to be able to quantify IL-1 β , IL-6 and TNF- α . Lapara et al (2020) exposed murine peritoneal macrophages to different stimulation and followed the evolution of the release of multiple cytokine up to 19 hours after stimulation. Among those cytokines, we can see that TNF- α was already decreasing at 19h when IL-6 levels were still going up at this time (Lapara and Kelly 2010). Even if the cellular model is slightly different than the one used in our study, it suggests that the dynamics of the searched cytokines are too different to be quantified with a single time point for all of it. Experiment with multiple time points between 0 to 48 hours could help find the best timing for every cytokine.

MCP-1 and TIMP-1 mRNA expression and TIMP-1 protein expression were not significantly modified by NGF, suggesting that NGF does not modulate their expression in fresh human monocytes. No induction of TIMP or MCP-1 expression by NGF seem to be described in the literature, but expression of TIMP-1 and NGF were found to be correlated in a group of asthma patients (Kim and al. 2013), mechanisms of interaction between the two proteins might still be undisclosed.

Finally, NGF does not seem to alter MMP-9 expression in fresh human monocytes in our conditions, since the increase in MMP-9 mRNA and protein expression already occurs when treating cells with “low grade” BSA alone. It was shown on differentiated macrophages that MMP-9 levels were decreased after 3 days of NGF stimulation, while MMP-1, MMP-7, MMP-8 and MMP-11 were increased (Williams and al. 2015). The differentiated model and the longer time of exposure makes the comparison difficult, as we only have the point after 3 days and don't know how the MMP-9 level could have changed during the 72 hours between stimulation and sampling. However, it was already shown by different teams that MMP-9 can be induced by LPS exposure on monocytes (Tian and al. 2018; Speidl and al. 2004). Fatty acids does not seem to be able to increase MMP-9 levels, their effect could in fact be opposite, as they have been described to regulate MMP in different models (Bonacci and al. 2011; Hong and al. 2018; Liuzzi and al. 2007). This suggest that fatty acids might not be responsible for the stimulation with low-grade BSA and that endotoxins are the most relevant suspect at the moment.

In conclusion, we have highlighted here the importance of testing BSA alone as a vehicle control when BSA is used as a carrier protein for the stimulus tested, i.e. NGF in our experiments. Our results also highlight the importance of the purity of BSA used, as it may alter the results observed, as in our experiments were “low grade” BSA was able to activate the cells unwillingly. This information can be of great use for anyone using BSA in cell culture, in order to properly start a new project on good basis, or to verify the foundations of an existing one.

Nevertheless, these experiments gave us the opportunity to discover that NGF is able to stimulate fresh human undifferentiated monocytes, but apparently only in the presence of a priming signal, possibly the LPS. These results, although deserving further investigation to better understand the precise mechanisms of this NGF-dependent effect, strengthen the knowledge of how NGF-activated monocytes may participate in pathophysiological conditions involving these inflammatory cells.

Funding statement

This study was supported by INSERM (France), Fondation pour la Recherche Médicale (FRM code DPC20171138954) and Région Bretagne (ARED project, Rennes, France)

Conflict of interest disclosure

The authors declare no conflicts of interest.

Ethics approval statement

All methods were carried out in accordance with the relevant guidelines and all subjects gave their written informed consent to participate in the study.

Patient consent statement

All methods were carried out in accordance with the relevant guidelines and all subjects gave their written informed consent to participate in the study

Permission to reproduce material from other sources

References

1. Levi-Montalcini R, Hamburger V. Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *J Exp Zool.* 1951 Mar;116(2):321–61.
2. Sutter A, Riopelle RJ, Harris-Warrick RM, Shooter EM. Nerve growth factor receptors. Characterization of two distinct classes of binding sites on chick embryo sensory ganglia cells. *J Biol Chem.* 1979 Aug 10;254(13):5972–82.
3. Levi-Montalcini R. The nerve growth factor 35 years later. *Science.* 1987 Sep 4;237(4819):1154–62.
4. Levi-Montalcini R, Dal Toso R, della Valle F, Skaper SD, Leon A. Update of the NGF saga. *J Neurol Sci.* 1995 Jun 1;130(2):119–27.
5. Norman BH, McDermott JS. Targeting the Nerve Growth Factor (NGF) Pathway in Drug Discovery. Potential Applications to New Therapies for Chronic Pain. *J Med Chem.* 2017 Jan 12;60(1):66–88.
6. Caroleo MC, Costa N, Bracci-Laudiero L, Aloe L. Human monocyte/macrophages activate by exposure to LPS overexpress NGF and NGF receptors. *J Neuroimmunol.* 2001 Feb;113(2):193–201.
7. Schenck K, Schreurs O, Hayashi K, Helgeland K. The Role of Nerve Growth Factor (NGF) and Its Precursor Forms in Oral Wound Healing. *Int J Mol Sci.* 2017 Feb 11;18(2):386.
8. Freund-Michel V, Cardoso Dos Santos M, Guignabert C, Montani D, Phan C, Coste F, et al. Role of Nerve Growth Factor in Development and Persistence of Experimental Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2015 Jun 3;192(3):342–55.
9. Freund-Michel V, Frossard N. The nerve growth factor and its receptors in airway inflammatory diseases. *Pharmacol Ther.* 2008 Jan;117(1):52–76.
10. Li M, Riddle SR, Frid MG, El Kasmi KC, McKinsey TA, Sokol RJ, et al. Emergence of Fibroblasts with a Proinflammatory Epigenetically Altered Phenotype in Severe Hypoxic Pulmonary Hypertension. *J Immunol.* 2011 Sep 1;187(5):2711–22.
11. Frid MG, Brunetti JA, Burke DL, Carpenter TC, Davie NJ, Reeves JT, et al. Hypoxia-Induced Pulmonary Vascular Remodeling Requires Recruitment of Circulating Mesenchymal Precursors of a Monocyte/Macrophage Lineage. *Am J Pathol.* 2006 Feb;168(2):659–69.
12. Florentin J, Coppin E, Vasamsetti SB, Zhao J, Tai Y-Y, Tang Y, et al. Inflammatory Macrophage Expansion in Pulmonary Hypertension Depends upon Mobilization of Blood-Borne Monocytes. *J Immunol.* 2018 May 15;200(10):3612–25.
13. Minnone G, De Benedetti F, Bracci-Laudiero L. NGF and Its Receptors in the Regulation of Inflammatory Response. *Int J Mol Sci.* 2017 May 11;18(5).
14. Datta-Mitra A, Kundu-Raychaudhuri S, Mitra A, Raychaudhuri SP. Cross Talk between Neuroregulatory Molecule and Monocyte: Nerve Growth Factor Activates the Inflammasome. Kanellopoulos J, editor. *PLOS ONE.* 2015 Apr 15;10(4):e0121626.

15. Rossol M, Heine H, Meusch U, Quandt D, Klein C, Sweet MJ, et al. LPS-induced Cytokine Production in Human Monocytes and Macrophages. *Crit Rev Immunol* [Internet]. 2011 [cited 2020 Apr 28];31(5). Available from: <http://www.dl.begellhouse.com/journals/2ff21abf44b19838,47d4cd1f0e2c889b,5453e7eb10564e78.html>
16. Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal*. 2001 Feb 1;13(2):85–94.
17. Chanput W, Mes J, M. Vreeburg RA, J. Savelkoul HF, J. Wichers H. Transcription profiles of LPS-stimulated THP-1 monocytes and macrophages : a tool to study inflammation modulating effects of food -derived compounds. *Food Funct*. 2010;1(3):254–61.
18. da Silva CO, Gicquel T, Daniel Y, Bártholo T, Vène E, Loyer P, et al. Alteration of immunophenotype of human macrophages and monocytes after exposure to cigarette smoke. *Sci Rep*. 2020 Jul 30;10:12796.
19. Khokha R, Murthy A, Weiss A. Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*. 2013 Sep;13(9):649–65.
20. Duda I, Krzych Ł, Jędrzejowska-Szypułka H, Lewin-Kowalik J. Plasma Matrix Metalloproteinase-9 and Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase-1 as Prognostic Biomarkers in Critically Ill Patients. *Open Med Wars Pol*. 2020;15:50–6.
21. Lagente V, Manoury B, Nénan S, Le Quément C, Martin-Chouly C, Boichot E. Role of matrix metalloproteinases in the development of airway inflammation and remodeling. *Braz J Med Biol Res Rev Bras Pesqui Medicas E Biol*. 2005 Oct;38(10):1521–30.
22. Corbel M, Belleguic C, Boichot E, Lagente V. Involvement of gelatinases (MMP-2 and MMP-9) in the development of airway inflammation and pulmonary fibrosis. *Cell Biol Toxicol*. 2002;18(1):51–61.
23. Landmann R, Knopf HP, Link S, Sansano S, Schumann R, Zimmerli W. Human monocyte CD14 is upregulated by lipopolysaccharide. *Infect Immun*. 1996 May;64(5):1762–9.
24. Monguió-Tortajada M, Franquesa M, Sarrias M-R, Borràs FE. Low doses of LPS exacerbate the inflammatory response and trigger death on TLR3-primed human monocytes. *Cell Death Dis*. 2018 May;9(5):499.
25. Han CY, Kargi AY, Omer M, Chan CK, Wabitsch M, O'Brien KD, et al. Differential Effect of Saturated and Unsaturated Free Fatty Acids on the Generation of Monocyte Adhesion and Chemotactic Factors by Adipocytes: Dissociation of Adipocyte Hypertrophy From Inflammation. *Diabetes*. 2010 Feb 1;59(2):386–96.
26. Snodgrass RG, Huang S, Choi I-W, Rutledge JC, Hwang DH. Inflammasome-Mediated Secretion of IL-1 β in Human Monocytes through TLR2 Activation; Modulation by Dietary Fatty Acids. *J Immunol*. 2013 Oct 15;191(8):4337–47.
27. Zhao G, Etherton TD, Martin KR, Vanden Heuvel JP, Gillies PJ, West SG, et al. Anti-inflammatory effects of polyunsaturated fatty acids in THP-1 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Oct 28;336(3):909–17.

28. Hoffmann E, Dittrich-Breiholz O, Holtmann H, Kracht M. Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol.* 2002;72(5):847–55.
29. Lapara NJ, Kelly BL. Suppression of LPS-induced inflammatory responses in macrophages infected with *Leishmania*. *J Inflamm Lond Engl.* 2010 Feb 2;7:8.
30. Kim JS, Kang JY, Ha JH, Lee HY, Kim SJ, Kim SC, et al. Expression of nerve growth factor and matrix metalloproteinase-9/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in asthmatic patients. *J Asthma.* 2013 Sep;50(7):712–7.
31. Williams KS, Killebrew DA, Clary GP, Seawell JA, Meeker RB. Differential regulation of macrophage phenotype by mature and pro-nerve growth factor. *J Neuroimmunol.* 2015 Aug 15;285:76–93.
32. Tian X, Xie G, Ding F, Zhou X. LPS-induced MMP-9 expression is mediated through the MAPKs-AP-1 dependent mechanism in BEAS-2B and U937 cells. *Exp Lung Res.* 2018 May 28;44(4–5):217–25.
33. Speidl WS, Toller WG, Kaun C, Weiss TW, Pfaffenberger S, Kastl SP, et al. Catecholamines potentiate LPS-induced expression of MMP-1 and MMP-9 in human monocytes and in the human monocytic cell line U937: possible implications for peri-operative plaque instability. *FASEB J.* 2004;18(3):603–5.
34. Bonacci G, Schopfer FJ, Batthyany CI, Rudolph TK, Rudolph V, Khoo NKH, et al. Electrophilic fatty acids regulate matrix metalloproteinase activity and expression. *J Biol Chem.* 2011 May 6;286(18):16074–81.
35. Hong Y-J, Ahn H-J, Shin J, Lee JH, Kim J-H, Park H-W, et al. Unsaturated fatty acids protect trophoblast cells from saturated fatty acid-induced autophagy defects. *J Reprod Immunol.* 2018 Feb;125:56–63.
36. Liuzzi GM, Latronico T, Rossano R, Viggiani S, Fasano A, Riccio P. Inhibitory effect of polyunsaturated fatty acids on MMP-9 release from microglial cells--implications for complementary multiple sclerosis treatment. *Neurochem Res.* 2007 Dec;32(12):2184–93.

Figures

Figure 1.

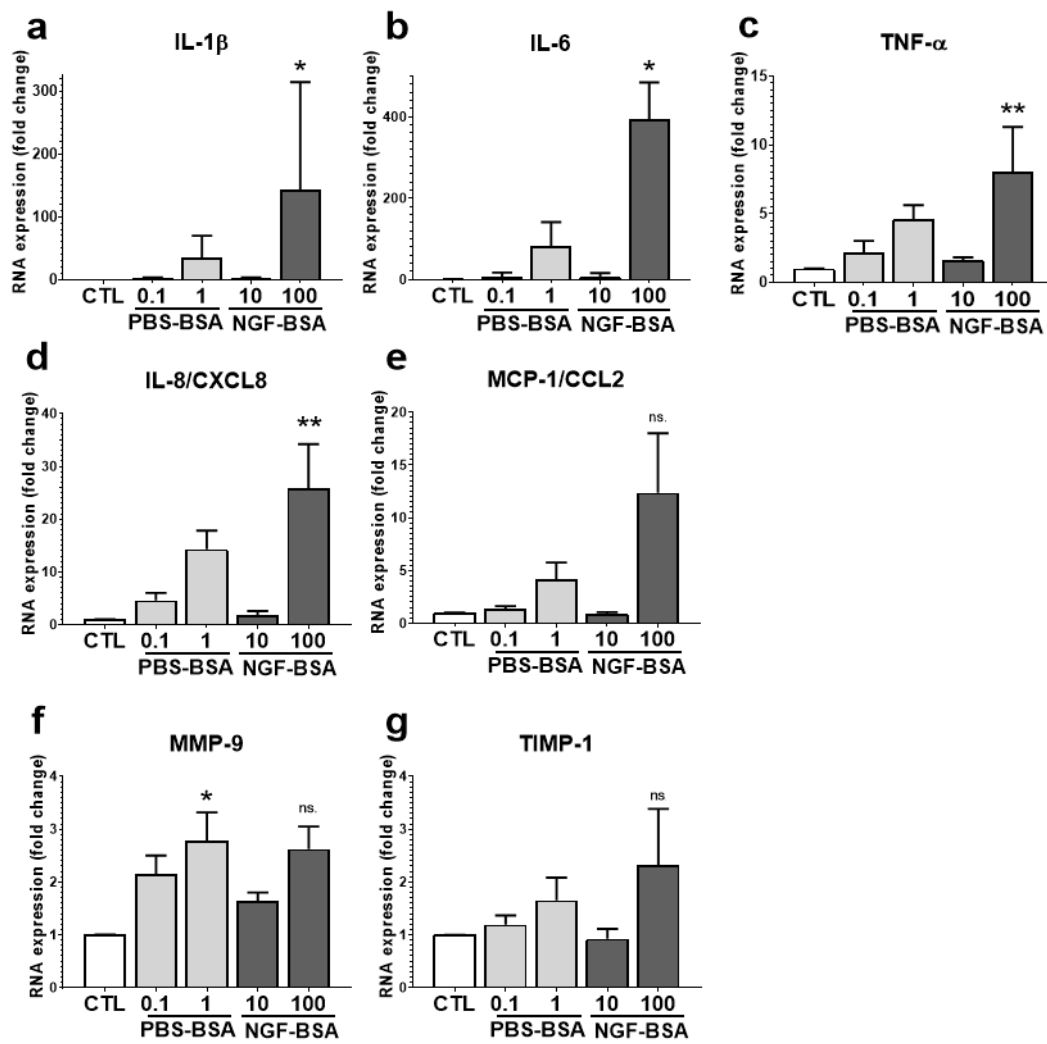


Figure 2.

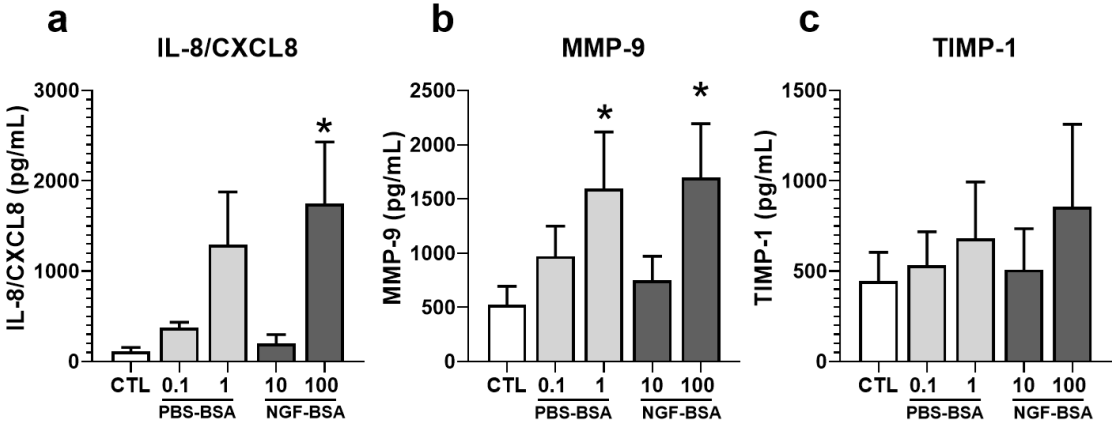


Figure 3.

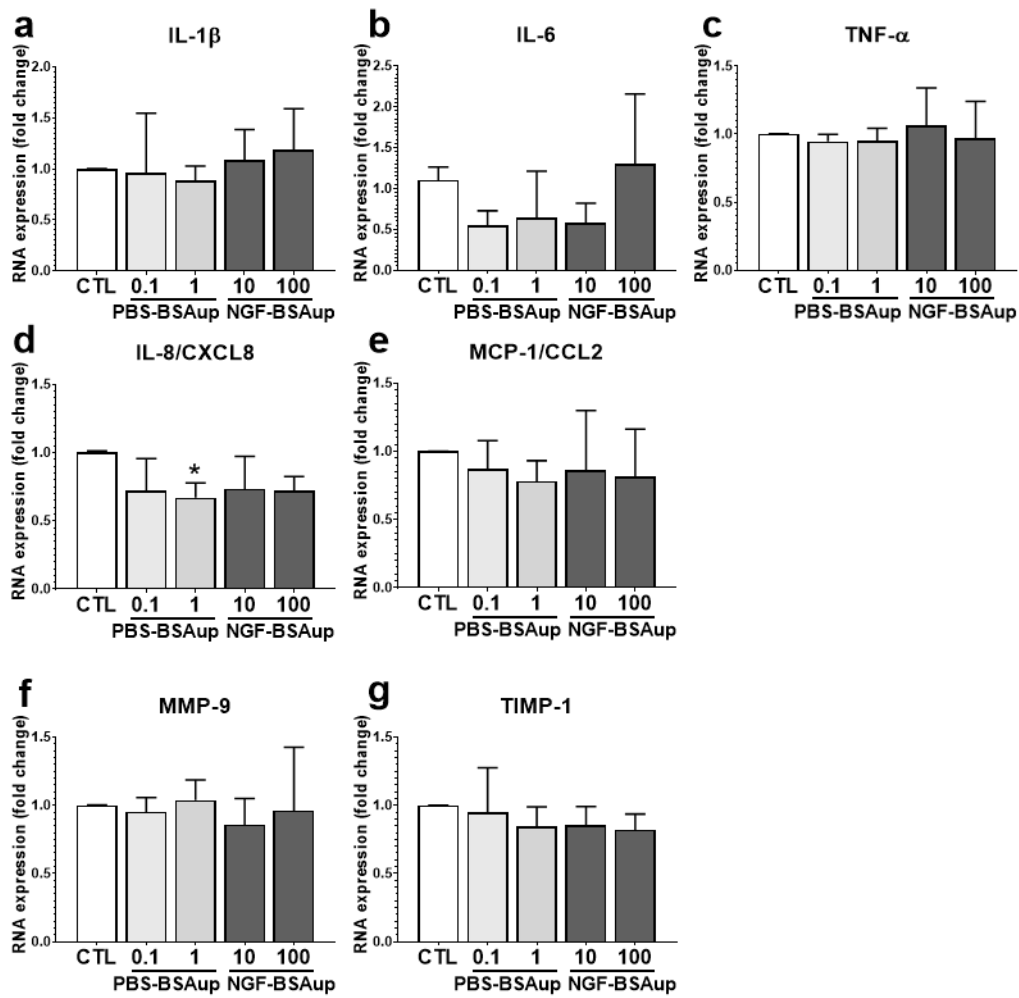
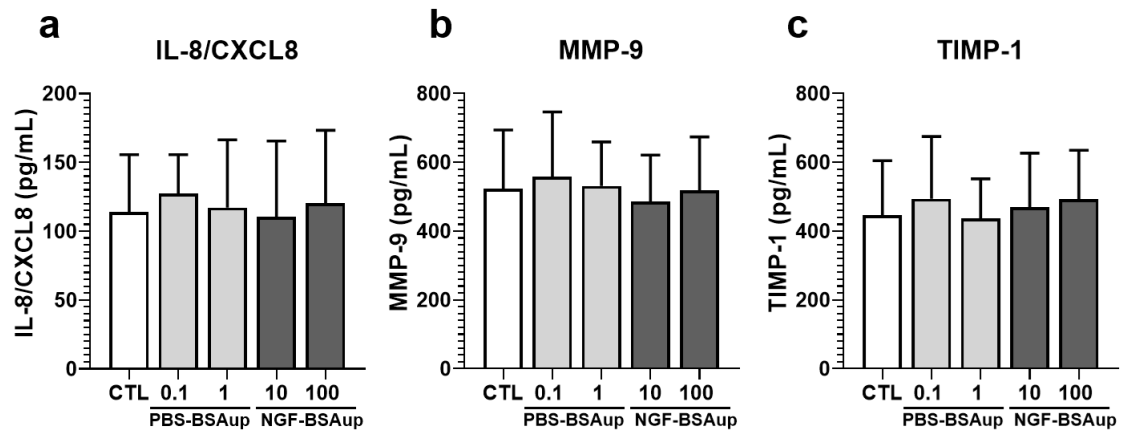


Figure 4.



Figures legends

Figure 1. Gene expression of human monocytes treated with nerve growth factor and/or bovine serum albumin

The monocytes were incubated with the control medium, with PBS-BSA ($\mu\text{g/ml}$) or BSA-NGF (ng/ml) for 6 hours. After the incubation the supernatant was discarded and the cell monolayer was frozen at -20°C before going through mRNA extraction, reverse transcription and finally RT-qPCR. The mRNA levels of expression of IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2, MMP-9 and TIMP-1 were evaluated, compared to the housing gene GAPDH.

The data were assessed in a non-parametric one-way ANOVA followed by Dunn post-test, and correspond to the mean \pm SD of 4 healthy donors.

A p-value of 0.05 or less was considered significant, when compared to the control condition.

« * » is used for comparison to the control condition

Figure 2. Cytokines levels in the supernatant of human monocytes treated with nerve growth factor and/or bovine serum albumin

The monocytes were incubated with the control medium, with PBS-BSA ($\mu\text{g/ml}$) or BSA-NGF (ng/ml) for 24 hours. After the incubation the supernatant was harvested and frozen at -20°C before going through ELISA to quantify the levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-8/CXCL8, MMP-9 and TIMP-1 in the supernatant.

The data were assessed in a non-parametric one-way ANOVA followed by Dunn post-test, and correspond to the mean \pm SD of 4 healthy donors.

A p-value of 0.05 or less was considered significant, when compared to the control condition.

« * » is used for comparison to the control condition

Figure 3. Gene expression of human monocytes treated with nerve growth factor and/or ultrapure bovine serum albumin

The monocytes were incubated with the control medium, with PBS-BSAup ($\mu\text{g/ml}$) or NGF-BSAup (ng/ml) for 6 hours. After the incubation the supernatant was discarded and the cell monolayer was frozen at -20°C before going through mRNA extraction, reverse transcription and finally RT-qPCR. The mRNA levels of expression of IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2, MMP-9 and TIMP-1 were evaluated, compared to the housing gene GAPDH.

The data were assessed in a non-parametric one-way ANOVA followed by Dunn post-test, and correspond to the mean \pm SD of 4 healthy donors.

A p-value of 0.05 or less was considered significant, when compared to the control condition.

« * » is used for comparison to the control condition

Figure 4. Cytokines levels in the supernatant of human monocytes treated with nerve growth factor and/or ultrapure bovine serum albumin

The monocytes were incubated with the control medium, with PBS-BSAup ($\mu\text{g/ml}$) or NGF-BSAup (ng/ml) for 24 hours. After the incubation the supernatant was harvested and frozen at -20°C before going through ELISA to quantify the levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-8/CXCL8, MMP-9 and TIMP-1 in the supernatant.

The data were assessed in a non-parametric one-way ANOVA followed by Dunn post-test, and correspond to the mean \pm SD of 4 healthy donors.

A p-value of 0.05 or less was considered significant, when compared to the control condition.

« * » is used for comparison to the control condition

C. Résumé des principaux résultats

Nous avons montré que les traitements au NGF induisent une augmentation d'expression de l'IL-1 β , de l'IL-6, du TNF- α et de l'IL-8/CXCL8 sur des monocytes non différenciés. La libération de l'IL-8/CXCL8 et de MMP-9 par les monocytes est aussi augmentée. Cette induction n'est pas due au seul effet du NGF, mais au moins en partie à la présence de sa protéine de transport, la BSA. Cette BSA, utilisée seule dans les quantités équivalentes à celles contenues dans les traitements avec le NGF, augmente l'expression de cytokines et notamment MMP-9.

Une autre référence de BSA dite « Ultrapure », certifiée avec un faible taux d'endotoxines et d'acides gras, n'induit pas les augmentations d'expression ou libération de cytokines comme précédemment observé. Cette BSA génère en revanche une faible diminution d'expression de l'IL-8/CXCL8. Avec cette BSA ultrapure, utilisée comme nouvelle protéine de transport, aucune réponse des monocytes n'a été détectée suite à leur exposition au NGF.

D. Discussion

Nous allons aborder dans un premier temps les résultats préliminaires sur le projet d'étude des effets physiopathologiques du NGF. Au vu de la problématique liée à l'utilisation de la BSA, ces résultats sont remis en question. Il est néanmoins intéressant de tout de même les discuter en ayant le recul vis-à-vis de l'action de la BSA dans les réponses observées.

Nous avons commencé par comparer la réponse des monocytes et des macrophages vis-à-vis du NGF. Les monocytes possèdent un meilleur potentiel de réponse au NGF que les macrophages (Ehrhard and al. 1993). Chez l'homme, les monocytes et macrophages n'expriment pas tous les récepteurs au NGF. Dans le sang d'un donneur sain, la proportion de monocytes exprimant les récepteurs TrkA et/ou p75^{NTR} est plus élevée celle observée chez les macrophages. De plus, les niveaux de co-expression de ces récepteurs sont aussi plus importants chez les monocytes que chez les macrophages (Williams and al. 2015).

Les monocytes non différenciés et les macrophages provenant d'un même donneur ont été traités avec du NGF pendant 24h (**Figure 17**). On observe que les surnageants des macrophages

contiennent plus de cytokine que ceux des monocytes. Même en condition non traitée, les macrophages produisent plus de cytokines que les monocytes stimulés.

Différentes études ont comparé la production de cytokines des monocytes et des macrophages. Des travaux sur la lignée THP-1 montrent que les macrophages différenciés expriment plus les TLR que les monocytes, permettant des productions de cytokines plus élevées (Eng, Hsu, and Lin 2018). A l'opposé, d'autres travaux réalisés sur des cellules humaines montrent que les monocytes produisent des quantités de cytokines plus importantes que les macrophages et que la lignée THP-1 (Daigneault and al. 2010). Dans leur étude, les macrophages ont été différenciés avec un protocole sensiblement différent du nôtre. Les cellules sont successivement exposées à du sérum humain, puis du sérum bovin, mais sans être stimulé avec une du GM-CSF ou du M-CSF comme nous l'avons fait. Aussi, cette différenciation dure 14 jours, contre les 7 jours que nous appliquons. Les macrophages obtenus suite à ce protocole sont sans doute sensiblement différents, la comparaison des résultats obtenus semble difficile.

D'autre part, nos résultats montrent que les macrophages ont une faible amplitude de réponse vis-à-vis du NGF, alors que les monocytes y sont plus sensibles, libérant des cytokines indétectables dans la condition contrôle. Ceci confirme l'idée que les monocytes aient un meilleur potentiel de réponse au NGF que les macrophages. La production variée de cytokines par des monocytes humain non différenciés en réponse au NGF n'est pas renseigné dans la littérature. Pour la suite de ces travaux nous nous sommes donc concentrés sur la réponse des cellules non différenciées.

L'expression des récepteurs au NGF diminue au cours de la différenciation des monocytes en macrophages, ceci suggère que le NGF puisse être impliqué dans ce processus. L'implication du NGF dans la maturation des cellules dendritiques a déjà été montrée (Jiang and al. 2007; Q. Xia and al. 2015) et pourrait donc aussi se produire pour les macrophages.

Nous avons cherché à évaluer ce potentiel de différenciation en exposant des monocytes à du NGF pendant 7 jours en substitution au GM-CSF habituellement utilisé. Dans les clichés microscopiques (**Figure 18**), les cellules non traitées pendant 7 jours montrent une faible survie. Elles sont peu adhérentes et facilement éliminées par les lavages et les changements de milieu. Ce résultat est attendu, du fait que la durée de vie des monocytes est courte. Leur population commence à décliner 4 jours après leur formation (Patel and al. 2017). En revanche, les cellules exposées aux plus faibles concentrations de NGF survivent. Les clichés microscopiques de ces

cellules montrent une apparence assez proche de ce qui est observé chez les monocytes différenciés « normalement » avec le GM-CSF qui donne aux cellules une apparence « d'œuf au plat ».

De plus, l'expression du marqueur de différenciation macrophagique CD68 a été évaluée par cytométrie en flux (**Figure 19**). L'expression de ce marqueur est augmentée chez les cellules traitées au NGF, mais sans atteindre le niveau des macrophages obtenus avec du GM-CSF. Nous noterons que même les cellules non traitées voient leur expression de CD68 légèrement augmentée. On peut suggérer qu'une partie des cellules se sont d'elles-mêmes engagées dans un processus de différenciation, leur permettant de se maintenir dans la culture. En revanche les cellules traitées avec 100ng/ml de NGF pendant 7 jours ne paraissent pas bien différenciées et leur expression de CD68 est faible. L'exposition durant plusieurs jours à cette concentration de NGF ne semble pas favorable au développement des cellules.

Ces données, suggèrent que le NGF influe sur la différenciation des cellules. Il serait néanmoins nécessaire de compléter ces données en utilisant une plus grande variété de marqueurs de différenciation. On peut penser à CD11c, CD68, CD169, CD206 et HLA-DR (l'antigène des leucocytes humains). Ce sont des marqueurs de macrophages alvéolaires qui donneraient une meilleure idée de l'état de différenciation des cellules (Byrne, Maher, and Lloyd 2016). Si les macrophages sont effectivement différenciés, il serait intéressant de quantifier les cytokines qu'ils produisent pour avoir une idée de leur profil de polarisation, vu que celle-ci peut se produire dans l'HTP.

Nous avons ensuite cherché à évaluer si l'action du NGF correspondait un signal de différenciation ou à une stimulation pro-inflammatoire. Dans le premier cas, il est envisageable qu'en différenciant les cellules, elles s'approchent du phénotype des macrophages qui expriment et produisent plus de cytokines. L'autre possibilité, sans différenciation est que les cellules réagissent au NGF comme à un stimulus inflammatoire. Le LPS, connu pour générer une réponse inflammatoire chez les monocytes/macrophages en est un bon exemple (Rossol and al. 2011a).

Les cellules ont été exposées au NGF, au LPS ou au GM-CSF et nous avons analysé les surnageants des monocytes après 24h de traitement (**Figure 20**). Dans cette expérience, les réponses induites par le LPS et par le NGF sont très similaires. Le profil de réponse entre le GM-CSF et le NGF est en revanche relativement différent. Cette observation suggère une

réponse inflammatoire des monocytes au NGF. Au vu de la similarité des réponses, il est possible que la voie d'activation soit la même que pour le LPS, c'est-à-dire la voie NF- κ B (Rossol and al. 2011a). Nous noterons que les traitements aux LPS et au NGF induisent chez les monocytes une légère production de GM-CSF. Ceci laisse à penser que dans un environnement inflammatoire, les cellules produisent d'elles-mêmes les facteurs dont elles ont besoin pour se différencier, expliquant les résultats de nos expériences précédentes sur la différenciation.

Connaissant maintenant les résultats à venir vis-à-vis de l'utilisation de la BSA, cette forte similarité le NGF et le LPS suggère que la réponse induite par la BSA est bien liée à la présence de LPS dans sa composition.

Les données des puces à protéines, qui sont semi-quantitatives, ont été confirmée en RT-qPCR et ELISA (**Figure 21**). L'expression et la libération des cytokines comme l'IL-1 β et l'IL-6 sont augmentées. Ces cytokines sont augmentées dans l'HTAP (El Chami and Hassoun 2012; Le Hires and al. 2015; Hu and al. 2020). Les traitements à 10ng et 30ng/ml de NGF n'induisent quasiment aucune réponse, alors que le traitement à 100ng/ml de NGF déclenche la libération de cytokines. Cette concentration de NGF correspond des concentrations de l'ordre du nano molaire. C'est à partir de ces concentrations que NGF est censé pouvoir se lier au récepteur p75^{NTR}, ce qui pourrait l'implication de ce récepteur dans la réponse observée.

Du LPS est potentiellement présent dans nos traitements via l'utilisation de la BSA. Cette concentration de « NGF » à partir de laquelle les monocytes répondent pourrait aussi informer sur les quantités de LPS dans nos conditions.

On note aussi une augmentation de la libération du TNF- α . Cette cytokine pro-inflammatoire est augmentée chez les patients de l'HTAP et est capable de déréguler la signalisation BMP2 un des principaux facteurs génétiques de cette maladie (Huertas and al. 2020; Hurst and al. 2017). Dans les macrophages murins, la production de TNF- α peut être régulée par le NGF (Barouch and al., 2001).

Nous nous sommes aussi intéressés aux variations des molécules agissant sur la matrice extracellulaire, comme les MMP et les TIMP. En réponse au NGF, nous observons une augmentation d'expression et de libération de MMP-9 et de son inhibiteur TIMP-1 (**Figure 22**).

Sur des macrophages humains, Williams and al (2015) montrent des résultats différents, où la production de MMP-9 diminue suite à 3 jours d'exposition au NGF. Dans le même temps, les niveaux de MMP-1, de MMP-7, de MMP-8 et de MMP-11 sont augmentés (Williams and al. 2015). Ces résultats suggèrent une implication du NGF dans la modulation de la balance MMP/TIMP. Ces protéines sont impliquées dans les processus de remodelage et un déséquilibre de leur expression peut conduire à la progression de multiples pathologies (Cabral-Pacheco et al. 2020).

Contrairement aux autres cytokines où le NGF a un rôle dans leur libération, les résultats de notre article montrent que la BSA est entièrement responsable de l'induction de MMP-9. Cette donnée vient invalider l'augmentation observée ici. Les différences relevées entre les travaux de Williams and al et les nôtres peuvent être dues au fait que l'expression des MMP détectés à 72h n'est pas encore présente à 24h.

Des cinétiques de stimulation nous ont permis de se renseigner sur la dynamique de libérations des cytokines. Ceci nous permet de s'assurer que prélever les surnageants après 24 heures de traitement permet bien de suivre la réponse des monocytes au NGF. Dans nos expériences (**Figure 23**), les cytokines pro-inflammatoires sont plus concentrées entre 12h et 16h, diminuant légèrement à 24h. La production de MMP-9 suit une dynamique différente, la concentration est faible après 12h de traitement mais augmente jusqu'à 24h. Le temps à 24h permet à la fois de suivre les changements relatifs aux cytokines et aux métalloprotéases.

L'écart entre la cinétique de la MMP-9 et celles des autres cytokines (IL-1 β , IL-6 et TNF- α), appuie la différence entre les effets liés uniquement à la BSA (qui sont plus tardifs) et les effets liés au NGF (déjà notables 12h après le début du traitement).

Les cellules immunitaires sont recrutées aux poumons lors de l'HTAP (Frid and al. 2006), il est donc important de rechercher la production par nos cellules de chimiokines pouvant expliquer ce recrutement. Les expressions de chimiokines telles que la MCP-1/CCL2, la ENA/CXCL5 et l'IL-8/CXCL8 sont augmentées après l'exposition des monocytes au NGF (**Figure 24**). La MCP-1/CCL2 exerce une activité chimiotactique dirigée vers les monocytes (Deshmane and al. 2009b) alors que l'IL-8/CXCL8 vise le recrutement des neutrophiles (Knall, Worthen, and Johnson 1997; Yoshimura 2015). Ces deux cytokines sont surexprimées dans l'HTAP (Rabinovitch and al. 2014; Mamazhakypov and al. 2021; El Chami and Hassoun 2012). La ENA/CXCL5, d'une manière similaire à l'IL-8/CXCL8, est capable de recruter les neutrophiles (Walz and al. 1991). Cette chimiokine n'a pas été liée à la maladie, mais a déjà été mise en cause dans le développement d'autres pathologies inflammatoires (Walz and al. 1997).

La BSA participe aussi à l'augmentation d'expression de ces chimiokines, mais nos données montrent que cette augmentation n'est pas attribuable uniquement à la BSA. Le NGF pourrait donc générer ces signaux chimiotactiques.

Après avoir décrit la réponse des monocytes au NGF, nous avons cherché à identifier les récepteurs impliqués dans cette réponse. Dans un premier temps, le récepteur TrkA a été ciblé en utilisant son inhibiteur, le k252a. Ce dernier l'inhibe en se fixant sur son site de liaison à l'ATP, empêchant la phosphorylation de la tyrosine 490, nécessaire à la transduction du signal. (**Figure 25**). L'inhibiteur n'a pas permis de réduire la libération de cytokine induite par le NGF et a même généré une légère augmentation. D'autres essais ont été menés avec les anticorps bloquant le récepteur p75^{NTR} et les anticorps dirigés contre le NGF. Ces derniers n'ont pas non plus permis de bloquer la réponse induite par le traitement NGF. Avec ces anticorps, on observe aussi l'augmentation de la réponse. A défaut de ne pas être diminuée, celle-ci ne devrait pas varier.

À ce stade, deux problèmes sont présents : la réponse observée avec le traitement NGF n'est pas bloquée spécifiquement et les outils utilisés pour bloquer cette réponse semblent même l'accentuer. L'absence des récepteurs en surface des cellules pourrait en partie justifier cette observation, mais comme évoqué dans les travaux de Williams and al (2015), ces récepteurs sont présents en surface des monocytes et macrophages. Nos résultats préliminaires en Western-Blot semblent le confirmer. Nous avons alors cherché à comprendre la raison de l'augmentation

de la réponse lors des tentatives de blocage. Les traitements ont été réitérés avec tout les contrôles seuls pour les inhibiteurs et anticorps utilisés (**Figure 27**). Il s'avère que même sans le traitement NGF, les différents inhibiteurs/anticorps induisent une réponse dans nos cellules. Il est difficile de savoir assurément comment le k252a induit la libération de cytokines, mais son action affectant les protéines kinase C (PKC) (Kase, Iwahashi, and Matsuda 1986) pourrait en être responsable. Les PKC régulent l'inflammation (Yang and al. 2019), leur inhibition pourrait donc contribuer à augmenter la libération de cytokines pro-inflammatoires. L'effet des anticorps pourrait s'expliquer par leur fragment constant, qui pourrait stimuler les monocytes via le récepteur Fc qu'ils expriment (Zhu and al. 2001; Olas and al. 2005).

Dans cette dernière expérience, une condition contrôle contenait le véhicule du NGF, c'est-à-dire la BSA. En effet, le NGF nécessite une protéine de transport pour être stabilisé en culture cellulaire, sans quoi il s'y dégrade trop rapidement. L'utilisation de cette BSA seule, dans des quantités équivalentes à celles utilisées pour le traitement NGF, a augmenté la libération de la MMP-9. Cette découverte a donc remis en question l'intégralité des résultats que nous avons produits antérieurement. Nous avons par la suite cherché à mieux comprendre le processus responsable de cette réponse inattendue.

Afin de comprendre l'effet de la BSA et du NGF sur les monocytes humains, nous avons repris ce travail avec des cellules extraites du sang de nouveaux donneurs.

Nous avons retrouvé les mêmes tendances que précédemment. Le traitement avec le NGF (NGF-BSA) induit une augmentation d'expression de l'IL-1 β , de l'IL-6, du TNF- α et de l'IL-8/CXCL8 (**Figure 1** de l'article). En revanche, la MCP-1/CCL2, la MMP-9 et le TIMP-1 ne sont pas significativement augmentés. Les cellules reçues de ces donneurs pas permis de quantification pour l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF- α dans les surnageants de culture. Les concentrations des cytokines étant trop faibles pour être détectés en ELISA. Néanmoins, l'IL-8/CXCL8, la MMP-9 et le TIMP-1 ont pu être quantifiées dans les surnageants. L'IL-8/CXCL8 et la MMP-9 augmentent après le traitement avec le NGF (NGF-BSA). Dans les grandes lignes, le traitement NGF-BSA permet bien de retrouver les effets pro-inflammatoires, chimiotactiques, et de remodelage précédemment décrit.

Le problème réside dans le fait que la BSA seule (PBS-BSA) augmente l'expression et la production de MMP-9 de façon aussi, sinon plus importante qu'avec le traitement NGF-BSA. Ceci confirme que nos observations ne sont pas uniquement liées à l'exposition au NGF et

doivent donc être remises en question. Pour les autres cytokines, la BSA n'induit pas d'augmentation significative de leur expression ou de leur libération. On observe néanmoins des variations non significatives qui laissent un doute sur la capacité de la BSA à induire leur expression.

La BSA est fréquemment utilisée en culture cellulaire en tant que protéine de transport pour divers facteurs de croissance, cytokines ou autres protéines. À notre connaissance, il n'est pas décrit dans la littérature que le BSA puisse induire une telle réponse. Il est donc peu probable que les effets que nous avons observés soit provoqués par notre protéine de transport en tant que telle.

Nous avons fini par envisager la possibilité que la moindre qualité du stock de BSA utilisé en soit responsable. En effet, selon la qualité du produit, les BSA commerciales peuvent contenir une certaine quantité « d'impuretés », par exemple des endotoxines, des acides gras, ou bien des immunoglobulines. Les monocytes, du fait de leur rôle de « sentinelles » dans le système immunitaire, sont facilement stimulés par ce type de signaux exogènes.

Les endotoxines proviennent de certaines bactéries à Gram négatif. Elles sont plus souvent reconnues sous le nom de lipopolysaccharide (LPS). Comme évoqué précédemment, les LPS activent la voie NF- κ B et MAPK et induisent la libération de nombreuses cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF- α (Guha and Mackman 2001; Chanput and al. 2010; Rossol and al. 2011a). Dans les monocytes, l'expression de MMP-9 est aussi induite par le LPS (Tian and al. 2018; Speidl and al. 2004). Même de très faibles concentrations sont capables d'activer les cellules. Des réponses sont détectées dès 0.1-0.2ng/ml de LPS (Landmann and al. 1996; Monguió-Tortajada and al. 2018). Les BSA utilisées affichent des puretés pouvant varier entre 98 et 100%, il y a donc potentiellement 2% d'impuretés dans le stock utilisé. Pour un traitement qui contenant 1 μ g/ml de BSA, cela représente jusqu'à 20ng/ml de composants inconnus qui se retrouvent au contact des cellules. La quantification des endotoxines n'est pas disponible pour le lot commercial utilisé, mais il n'est pas inenvisageable que les niveaux d'endotoxines atteignent effectivement un seuil permettant de stimuler les monocytes. Nous avons évoqué plus tôt la forte similarité entre le profil de réponse des monocytes au NGF et aux LPS (**Figure 20**). Ceci pourrait confirmer l'idée que la BSA utilisée contient suffisamment de LPS pour stimuler nos cellules.

Les acides gras sont aussi capables de déclencher des réponses venant des monocytes. Les acides gras saturés augmentent la production de l'IL-1 β et de la MCP-1/CCL2 via une

stimulation des TLR qui active la voie NF- κ B (Han and al. 2010; Snodgrass and al. 2013). Les acides gras insaturés ou polyinsaturés agissent différemment. Ils interfèrent avec la production de cytokines pro-inflammatoires en bloquant la voie de signalisation NF- κ B (Han and al. 2010; Zhao and al. 2005). Considérant cela, il y aurait plus de chances que les acides gras potentiellement présents dans notre BSA saturés. Le manque d'informations de la part du fournisseur ne nous permet pas de statuer à ce sujet. Nous noterons cependant que les concentrations nécessaires pour stimuler les cellules semblent plus importantes que ce qu'on pourrait retrouver dans notre BSA. Les stimulations effectuées le sont avec 1 à 100 μ M d'acides gras, ce qui correspond à 0,25 et 25 μ g/ml. Cette concentration est trop élevée pour correspondre notre quantité théorique de 20ng/ml d'impuretés et ne devrait donc pas pouvoir stimuler nos cellules. De plus, les acides gras ne semblent pas capables d'augmenter la production de MMP-9. Il ont même au contraire un rôle de régulation de l'expression des MMP (Bonacci and al. 2011; Hong and al. 2018; Liuzzi and al. 2007).

Enfin, les immunoglobulines potentiellement présentes dans la BSA sont aussi capables de stimuler les monocytes, via une liaison au récepteur Fc qui est exprimé en surface des cellules (Zhu and al. 2001). Selon le contexte, cette stimulation peut déclencher une réponse pro-inflammatoire avec induction d'IL-1 β et diminution de l'IL-10 et du TGF- β ; ou bien une diminution des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, la MCP-1/CCL2 ou le TNF- α (Olas and al. 2005). Parmi les trois catégories « d'impuretés » abordées, seules les immunoglobulines sont présentées dans les certificats d'analyses de la BSA et sont décrites comme indétectables. Elles ne devraient donc théoriquement pas être le composant qui pose problème ici.

Afin de vérifier si les endotoxines ou les acides gras sont responsables de l'effet observé, nous avons traité nos cellules avec une autre référence de BSA certifiée « Ultrapure ». Celle-ci contient normalement avec des quantités plus faibles d'endotoxines et d'acides gras. Avec cette BSA ultrapure (PBS-BSAup) (**Figures 3 et 4** de l'article), nous n'avons pas observé d'augmentation ni de l'expression, ni de libération de cytokines ou de MMP. Ceci semble confirmer que les endotoxines et/ou acides gras sont responsables des réponses induites par précédente BSA. Nous n'avons pas effectué de quantification de ces deux composés dans nos surnageants de culture. À l'avenir, il serait bénéfique de quantifier les endotoxines et les acides gras dans nos surnageants afin de valider quantitativement la diminution de leurs concentrations.

Étrangement, l'utilisation de cette référence de BSA ultrapure induit une légère diminution de l'expression de l'IL-8/CXCL8. Comme évoqué précédemment, il n'y a pas de données de littérature qui puisse expliquer une influence de la BSA elle-même sur nos cellules. Des « impuretés » sont peut-être encore présentes, même dans cette référence ultrapure. On peut suggérer qu'après avoir éliminé la composante inflammatoire due aux endotoxines, il puisse rester des composés comme les acides gras polyinsaturés avec une action anti-inflammatoire expliquant cette diminution. L'IL-8/CXCL8 est partiellement dépendante de la voie de signalisation NF- κ B (Hoffmann and al. 2002), son expression pourrait donc être affectée par des acides gras insaturés. On notera cependant que le changement d'expression de l'IL-8/CXCL8 ne s'est pas répercuté sur la libération de la cytokine dosée par ELISA.

Cette BSA ultrapure a été utilisée comme protéine de transport pour le NGF dans des traitements « NGF-BSAup » (**Figures 3 et 4** de l'article). Ces traitements n'ont permis l'augmentation ni de l'expression, ni de la production d'aucune de nos cytokines d'intérêt. Ceci suggère que les monocytes humains extraits, ne sont pas capables de répondre à une stimulation avec du NGF « seul ». Ils pourraient avoir besoin d'être co-stimulés par un autre composé, ici les « impuretés » de la BSA. Au vu de ces résultats, il serait intéressant de réitérer certaines de nos expériences préliminaires avec cette nouvelle protéine de transport « ultrapure ». Nous pourrions vérifier si le NGF n'induit aucun effet à lui seul, ou si certaines réponses seraient toujours visibles, particulièrement vis-à-vis de son potentiel de différenciation, qui n'a pas été réexploré dans cet article.

E. Conclusion

Cette étude montre l'importance capitale de la présence d'une condition contrôlée « véhicule BSA » qui n'est pourtant pas toujours présent dans la littérature. De plus, la qualité de la BSA utilisée est importante. L'écart de pureté entre les deux références de BSA génère une réponse significativement différente et peut changer du tout au tout le regard que l'on porte aux résultats.

Il semblerait que sur les monocytes humains non différenciés, le NGF ne soit pas capable d'induire de lui-même une réponse inflammatoire. Le NGF montre en revanche un potentiel de stimulation des monocytes lors d'une co-stimulation. En effet, la réponse des monocytes au NGF (qui contient de la BSA), est plus importante que la réponse à la même BSA seule.

PERSPECTIVES

Ces travaux sur la voie JAK/STAT ouvrent plusieurs perspectives de recherche :

Cette étude a été menée sur des macrophages différenciés, mais pourrait aussi être transposée sur des monocytes avant leur différenciation. Ils sont aussi capables de produire des cytokines, des chimiokines et peuvent être recrutés aux poumons s'ils rencontrent des signaux chimiotactiques. Pour une pathologie comme la BPCO avec un important influx de cellules immunitaires dans les poumons, leurs mécanismes de réponses seront certainement intéressants à explorer.

Aussi, afin d'enrichir notre modèle, nous pourrions étudier les interactions des monocytes/macrophages vis-à-vis cellules épithéliales alvéolaires en utilisant les lignées A549, NCI ou Calu3. Ces cellules pourraient être exposées à des milieux conditionnés de macrophages traités au CSE+LPS, ou être directement mises en culture ensemble. Il serait alors possible d'observer si l'interaction entre ces populations influence les productions des cytokines que nous avons déjà quantifiées (IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2, IL-6, GRO- α /CXCL1). En plus de quantifier les cytokines, nous pourrions quantifier les ERO produites par les macrophages et rechercher la présence de dégâts à l'ADN. Il est aussi possible que la capacité de migration des monocytes/macrophages soit différente au contact des cellules épithéliales. Complexifier le modèle en y incluant plusieurs types cellulaires pourrait permettre d'étendre notre étude à d'autres paramètres physiopathologiques de la BPCO.

L'utilisation des inhibiteurs de la voie JAK/STAT pourrait aussi être diversifiée en reproduisant nos expériences avec des inhibiteurs pour chacun des membres de la famille JAK. Ceci permettrait de trouver d'autres cibles dont l'inhibition affecte la réponse au CSE. Nous avons étudié le ruxolitinib, dont l'utilisation est déjà approuvée. Il est possible d'envisager le tofacitinib, inhibiteur de JAK3 et JAK1 ou l'ocacitinib, inhibiteur de JAK1, qui sont aussi approuvés. Parmi les molécules en phase de test, on peut trouver l'ASP015K, inhibiteur de JAK3/JAK1 qui possède aussi une affinité pour JAK2 et TYK2 ; le pacritinib, qui semble cibler JAK2 uniquement ; ou le decernotinib, qui cible uniquement JAK3. Les inhibiteurs de STAT sont moins nombreux et variés dans les protocoles d'études cliniques, du fait des homologies importantes entre les membres de cette famille, qui rendent difficile un ciblage spécifique (O'Shea and al. 2015).

On sait que les cigarettes contiennent de très nombreux composés, dont les quantités varient d'une marque à l'autre. Les quantités de nicotine, de goudron et de monoxyde de carbone dans une cigarette changent du simple au triple selon les marques (Calafat 2004). Reproduire ces

travaux avec différentes références de cigarettes pourrait aider à évaluer quels sont les composés les plus nocifs.

Aussi, du fait de l'émergence des approches analytiques en spectrométrie de masse, il serait possible d'analyser les surnageants de culture au cours du temps pour évaluer l'évolution de sa composition avant/pendant/après l'exposition au CSE. Ainsi nous pourrions savoir quels composés restent dans le surnageant, lesquels sont assimilés, dégradés, métabolisés, ou accumulés par les cellules. De nouveaux mécanismes d'action de la fumée de cigarette pourraient ainsi être découverts.

Cette approche est envisageable *in vitro* dans les surnageants des cellules et dans leurs lysats cellulaires, mais aussi *in vivo*, dans les modèles murins de BPCO (Huan and al. 2017; Wang and al. 2017). Les composés présents dans les cigarettes ne se contentent pas d'affecter les poumons et peuvent être retrouvés dans le sang et les urines (Jain 2019). Il serait donc intéressant de récupérer différentes matrices biologiques comme les LBA, le sang, les urines, la salive ou des tissus pulmonaires pour ensuite y chercher les composés venant de la fumée de cigarette et suivre leur évolution au cours du temps.

Une meilleure compréhension de la dangerosité des différents composés contenus dans les cigarettes et de leur impact sur la santé humaine aidera à faire évoluer les réglementations sur les quantités légales autorisées dans les cigarettes afin de réduire les conséquences de leur consommation. L'idéal reste évidemment de ne jamais y être exposé. Pour ceux qui n'auraient pas cette chance, les progrès effectués dans la compréhension des mécanismes de mise en place de la BPCO serviront à améliorer les thérapies actuelles en mettant à jour de nouvelles cibles thérapeutiques, comme la voie JAK/STAT.

Concernant le rôle du NGF dans le développement de l'HTP, les axes de recherche futurs devraient porter sur les interactions des monocytes-macrophages avec d'autres types cellulaires durant ou après l'exposition au NGF. On peut notamment penser aux CMLAP ou aux CEAP qui sont au contact des macrophages dans les artères pulmonaires. Leurs interactions pourraient être étudiées grâce à des milieux conditionnés ou des cocultures. Les cytokines et chimiokines produites par les monocytes-macrophages pourraient par exemple augmenter la prolifération de ces cellules, leur migration, leur différenciation ou leur contraction. Pour identifier les dysfonctionnements dans la réponse des monocytes-macrophages des patients, il serait nécessaire de comparer les réponses observées chez les cellules de ces patients, aux

réponses des donneurs sains. On peut envisager que les réponses inflammatoires soient plus importantes et durent plus longtemps, que les cellules aient une différenciation ou polarisation altérée. Il est aussi possible que les monocytes-macrophages des patients, une fois sortis de leur « environnement pathologique » ne montrent pas de différences avec les cellules des donneurs sains. Ceci suggérerait alors que ces cellules ne soient pas directement à l'origine de la pathologie.

Enfin, il serait possible de mettre à contribution dans un même projet, l'expérience acquise dans les deux axes de recherche sur la BPCO et l'HTP. La BPCO est le principal facteur de risque dans le développement de l'HTP du groupe III (Seeger and al. 2013; Hurdman and al. 2013). Nous pourrions donc chercher à savoir si dans un modèle de BPCO, des paramètres liés à l'HTP sont observables. Après une exposition au CSE+LPS, du NGF pourrait être produit par les monocytes-macrophages, les CEAP, ou les CMLAP. Ces cellules sont capables de libérer du NGF suite à des stimulus inflammatoires (Minnone, De Benedetti, and Bracci-Laudiero 2017). Nous pourrions doser le NGF par ELISA dans les surnageants de cultures des cellules traitées par CSE+LPS. Nous avons vu dans ces travaux que le NGF ne semblait pas capable d'induire de lui-même une réponse. Nous pourrions chercher à savoir si après une stimulation CSE+LPS, la réponse des cellules vis-à-vis du NGF est amplifiée. Le CSE et/ou le LPS pourraient constituer ce signal de « *priming* » nécessaire pour déclencher une réponse au NGF.

L'objectif est que l'ensemble des travaux décryptant les mécanismes d'action du NGF dans le contexte de l'HTP apportent suffisamment d'information pour construire une étude clinique sur le blocage du NGF. Le tanezumab et le tasinumab sont des anticorps bloquants du NGF déjà été utilisés dans le traitement de douleurs chroniques (Dakin and al. 2019; Tive and al. 2019). Ces anticorps, s'ils permettent effectivement de réduire le remodelage, l'hyperréactivité artérielle et/ou d'inflammation chez les patients, pourraient se montrer d'une aide précieuse dans le traitement des maladies respiratoires inflammatoires telle que l'hypertension pulmonaire.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Matériels

Lecteur d'absorbance, luminescence et de fluorescence : POLARstar Omega®, BMG Labtech® / **Cigarettes:** Marlboro Red (contiennent en moyenne 13mg de goudron, 10 mg de monoxyde de carbone et 1mg de nicotine) / **Diméthyl Sulfoxyde (DMSO) :** Sigma-Aldrich / **Microsphères :** yellow-greened carboxylate-modified FluoSpheres 100nm, Molecular Probes, Eugene, USA / **LPS :** LPS from E. coli 055:B5 (Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt, Allemagne) / **AG490 :** AG490 (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) / **Ruxolitinib :** Ruxolitinib (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) / **Milieu de culture :** RPMI 1640 (Gibco, Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) / **L-Glutamine :** L-Glutamine 200nM (Gibco, Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) / **Antibiotiques :** Pen Strep (10 000 U/ml), (Gibco, Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) / **Phosphate Buffered Saline (PBS) :** (Gibco, Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) / **Sérum de Veau Fœtal (SVF) :** FetalClone® II (Hyclone, Cytiva USA) / **Acide éthylènediamine tétraacétique (EDTA) :** 0,5M pH 8.0 Ultrapure EDTA (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) / **Tubes de centrifugation Ficoll :** Tubes Unisep Maxi (50ml/10ml) 18x50ml (avec 10ml MSL) (Eurobio Scientific, France) / **Billes magnétiques :** CD 14 MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergish, Allemagne) / **Filtre de Séparation :** Pre-Separation Filter (30µm) (Miltenyi Biotec, Bergish Allemagne) / **Colonne magnétique :** LS-Columns (Miltenyi Biotec, Bergish, Allemagne) / **Support magnétique :** MACS MultiStand (Miltenyi Biotec, Bergish, Allemagne) / **Équipement d'extraction ARN :** NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne) / **Équipement de RT-PCR :** High-capacity cDNA Achieve Kit (Applied Biosystems, Californie, USA) / **SYBR Green :** Power SYBR Green PCR MasterMix (Applied Biosystems, Californie, USA) / **Amorces :** H20-100µM SePOP Desalted primers (Eurogentec, Liège, Belgique) / **GM-CSF :** Recombinant Human GM-CSF Protein (R&D Systems, biotechnie, Minneapolis, USA) / **Nanodrop :** Nyxor Biotech, Paris, France) / **BSA « classique » :** Probumin [82-045-1] (Millipore, Merck, Darmstadt, Allemagne) / **BSA « ultrapure » :** Bovine Serum Albumin [A8806] (Merck, Darmstadt, Allemagne) / **NGF :** Recombinant Human beta-NGF protein (R&D Systems (biotechnie, Minneapolis, USA) / **Inhibiteur TrkA :** K-252a [K2015] (Merck, Darmstadt, Allemagne) / **Anticorps anti-NGF :** Anti-Nerve Growth Factor-β Antibody [AB1526] (Merck, Darmstadt, Allemagne) / **Anticorps anti-p75^{NTR} :** Anti-p75NTR (Neurotrophin Receptor) Antibody, clone [ME20.4] (Merck, Darmstadt, Allemagne) / **Anticorps anti-IgG de lapin :** Normal Rabbit IgG [12-370] / **Équipement ELISA :** Gamme « DuoSet », R&D Systems, biotechnie, Minneapolis, USA /

Puce à protéines (cytokines): Proteome Profiler Human XL Cytokine Array Kit (R&D Systems, biotechne, Minneapolis, USA) / **Puce à protéines (Voies de signalisation) :** Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Array Kit, (R&D Systems, biotechne, Minneapolis, USA) / **Appareil de révélation Western-Blot/Puces à protéines :** Fusion Fx (Vilbert Lourmat, Germany) / **Logiciel de traitement d'images Western/Puces :** FusionCapt Advance (Vilbert Lourmat, Germany) / **Anticorps Western-Blot anti-p75^{NTR} :** Anti p75^{NTR} [07-476] (Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt, Allemagne) / **Anticorps Western-Blot anti-TrkA :** Anti TrkA Antibody [06-574] (Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt, Allemagne) / **Anticorps Western-Blot anti Phospho-TrkA :** Anti Phospho-TrkA (Phosphotyrosine 490) [T9691- 1ML] (Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt, Allemagne) / **Anticorps secondaire anti-Rabbit :** Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP (Dako Products, Agilent, Santa Clara, USA) / **Anticorps secondaire anti-Goat :** Polyclonal Rabbit Anti-Goat Immunoglobulins/HRP (Dako Products, Agilent, Santa Clara, USA) / **Anticorps secondaire anti-Mouse :** Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP (Dako Products, Agilent, Santa Clara, USA) / **Tween :** Tween ® 20 [P1379-1L] (Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt, Allemagne) / **Réactifs de révélation chimioluminescence :** SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate [34075] (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) / **Tampon RIPA :** RIPA Lysis Buffer 10X 100ML (Merck, Darmstadt, Allemagne) / **Inhibiteur de phosphatases :** Phosphatase inhibitor cocktail 2 et Phosphatase inhibitor cocktail 3 (Merck, Darmstadt, Allemagne) / **Cocktail d'inhibiteurs de protéases :** cComplete [11697498001] (Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne) / **Réactif de dosage des protéines :** Protein Assay Dye Reagent Concentration [500-0006] (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) / **Gels d'électrophorèse :** iD PAGE Gel, 4-12% (Eurogentec, Liège, Belgique) / **Tampon de migration :** NuPAGE MOPS SDS Running Buffer (20X) (Novex, Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) / **Appareil de transfert :** iBlot™ Gel Transfer Device (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) / **Membrane de nitrocellulose :** iBlot™ Transfer Stacks, nitrocellulose, regular size (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) / **Tampon de charge :** Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) / **β-mercaptoéthanol :** 2-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt, Allemagne) / **Formaldéhyde :** 16% Formaldehyde Solution (w/v) Methanol Free [28908] (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) / **Trypsine :** Trypsin-EDTA (0.05%) phenol red (Gibco, Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) / **Anticorps CD68 :** FITC Mouse Anti-Human CD68 [562117] (Becton Dickinson Biosciences, Franklin Lakes, USA) / **Cytomètre :** LSR Fortessa X-20 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) .

Extraction des monocytes humains depuis une poche de sang

Les monocytes humains sont extraits à partir de concentrés leuco-plaquettaires venant de donneurs sains, préparés par l'établissement français du sang (EFS). Toutes les expériences sont réalisées dans le respect de la législation française sur l'utilisation des produits du sang (Article 93-5 du 4 Janvier 1993).

La veille de l'expérimentation, un tampon spécial « Miltenyi » est préparé avec 45ml de PBS + 2mM EDTA + 225µl de SVF. Le tampon est agité énergiquement et dégazé pendant la nuit à 4°C.

Le sang est d'abord dilué dans un volume équivalent de PBS + 2mM EDTA, puis centrifugé pendant 20 minutes à 1000g et 20°C, avec des pentes d'accélération et de frein les plus faibles possibles. Un anneau est formé par les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) pendant cette centrifugation. Il est aspiré et mis en suspension dans 45ml de PBS-EDTA, puis centrifugé à 500g pendant 10 minutes. Le surnageant est ensuite éliminé et le culot repris à nouveau dans 45ml de PBS-EDTA et centrifugé 15 minutes à 160g. Le culot est remis en suspension dans 10ml de PBS+EDTA et passé à travers le filtre de séparation. Une numération du total des PBMC isolées est effectuée et les cellules à nouveau centrifugées 10 minutes à 500g.

Le culot de cellules est repris dans un volume de 0.8ml du « Tampon Miltenyi » par tranche de 100 millions de PBMC. Les billes magnétiques sont ajoutées à cette suspension, à hauteur de 100µl par tranche de 100 millions de PBMC comptées, avec un maximum de 600µl. Après agitation, le mélange est incubé 15 minutes à 4°C avant d'être rincé avec 15ml de « Tampon Miltenyi » et centrifugé 10 minutes à 500g. Le culot est ensuite repris dans un volume 0.5ml de « Tampon Miltenyi » par tranche de 100 millions de PBMC comptées. La colonne magnétique est montée sur son support magnétique et est humidifiée avec 3ml de « Tampon Miltenyi » avant d'y faire passer la suspension cellulaire. La colonne est ensuite lavée à trois reprises avec 3 ml de « Tampon Miltenyi ». L'écoulement sortant de la colonne pendant les lavages contient les cellules CD14 négatives. Une fois les lavages terminés, la colonne est détachée du support magnétique et installée sur un tube de collecte propre. Un volume de 5 à 7 ml de « Tampon Miltenyi » est poussé à travers la colonne à l'aide du piston dédié afin de récupérer les cellules CD14 positives. Une numération cellulaire est réalisée pour déterminer le nombre de cellules récoltées.

Culture cellulaire

Les monocytes sont mis en culture dans du milieu RPMI 1640 (2% SVF, 1% L-Glutamine, 0.1% d'antibiotiques). Un ensemencement entre $2,5 - 5.10^5$ cellules/cm² est souhaitable. Les monocytes non différenciés ne sont pas gardés en culture plus de 48h. Les macrophages sont obtenus en 7 jours, par différenciation des monocytes dans du milieu RPMI supplémenté de 10% SVF, 1% L-Glutamine, 0.1% d'antibiotiques et 50ng/ml de GM-CSF. Un tiers du milieu doit être renouvelé après 3 jours d'incubation. Le milieu peut être intégralement renouvelé, après le septième jour, la veille des traitements.

Préparation du CSE

Le CSE est préparé en aspirant la fumée de deux cigarettes à l'aide d'une pompe péristaltique, cette fumée est bullée dans 20ml de milieu de culture et filtrée au travers d'une membrane de 0.2µm. Le pH du milieu est ensuite ajusté à 7.0 en utilisant du NaOH ou HCl et l'absorbance à 326nm est ajustée entre 1.5 et 2.0 par dilution dans du milieu de culture. Cette solution ajustée est considérée comme la solution mère à 100% de CSE et est utilisée pour préparer extemporanément les dilutions à 2%, 4%, 8% et 10%.

Traitements

Les traitements avec le NGF sont réalisés à partir d'une solution stock à 100µg/ml, reconstituée dans du PBS + 0,1% de BSA. Différentes BSA ont été utilisées à cet usage, notamment une BSA « classique » de basse qualité et une BSA « ultrapure » de haute qualité, spécifiée avec un faible taux d'endotoxines et acides gras. Les traitements avec le NGF sont effectués avec des concentrations allant de 1 à 100ng/ml. Les traitements durent quelques minutes pour l'étude de la phosphorylation des récepteurs, 6 heures pour l'étude des expressions d'ARNm, de 12 à 24 heures pour observer les libérations de cytokines dans les surnageants de culture et 7 jours pour l'étude de la différenciation des monocytes. Pour les traitements de 7 jours, le protocole de différenciation est suivi pour le NGF de la même façon qu'une différenciation classique avec le GM-CSF. Le milieu est renouvelé à 3 jours et à 7 jours. Pour les puces à protéines, le LPS ultrapur a été utilisé à 100ng/ml et le GM-CSF utilisé à 50ng/ml. Les traitements avec la BSA seule ont été réalisés sur des durées identiques aux traitements avec le NGF, avec des

concentrations calquées sur les quantités de BSA trouvées dans les traitements NGF. À noter qu'en suivant les recommandations du fournisseur de NGF, une concentration de NGF de 100ng/ml est nécessairement associée à 1µg/ml de BSA. Le blocage de l'activité du NGF est réalisé en suivant les traitements habituels, précédés d'une préexposition des cellules aux inhibiteurs/anticorps pendant 1 heure. L'inhibiteur k252 a été utilisé dans des concentrations allant de 30 à 300 nM, les anticorps anti-NGF, anti-p75^{NTR} et anti IgG de lapin ont été utilisés à 10µg/ml.

Les traitements avec le CSE ont été réalisés sur des concentrations allant de 4 à 10% de CSE associé ou non à du LPS à 0,1µg/ml, sur une durée de 24h. Les inhibiteurs de JAK/STAT (AG490 et Ruxolitinib) ont été utilisés à des concentrations allant de 0,5µM à 25µM. La condition contrôle du solvant des inhibiteurs, le DMSO, a été mise en place à 0,0125% et 0,025%. Les inhibiteurs sont utilisés 2h avant l'ajout des traitements CSE+LPS. La dexaméthasone a été utilisée comme traitement anti-inflammatoire de référence. Les traitements sont réalisés dans du milieu sans sérum, qui est retiré du milieu avant les traitements. Au terme de tous les traitements, les surnageants sont récoltés, les tapis cellulaires secs et les surnageants sont conservés à -80°C en attendant de procéder aux différentes analyses.

Test de viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire a été évaluée par un test au sel de tétrazolium (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium) (MTT). Après les traitements, le milieu de culture est aspiré et remplacé par du milieu contenant 0.5mg/ml de MTT. Après 1h d'incubation (37°C et 5% de CO₂ humidifié), le milieu est à nouveau aspiré et remplacé par du DMSO pour libérer le produit de la réaction. Après homogénéisation, l'absorbance à 540nm est mesurée. La viabilité est exprimée en fonction de la valeur d'absorbance de la condition contrôle, normalisée par la valeur d'absorbance d'un blanc ne contenant que du DMSO, sans cellules.

Dosage des cytokines par ELISA

La quantification ELISA est effectuée en se basant sur le protocole recommandé par le fournisseur. Du PBS + 1% BSA est utilisé comme agent de saturation et comme diluant pour les échantillons, les standards de gamme, les anticorps de détection, et pour la streptavidine-HRP. Du H₂SO₄ à 5% est utilisé comme solution « Stop ».

Les surnageants peuvent être dilués le cas échéant pour ne pas dépasser la fenêtre de détection. Cette fenêtre varie d'une cytokine à l'autre, les surnageant trop concentrés ont donc été dilués dans du PBS +1% BSA afin de permettre une quantification précise. Les intervalles de détection des cytokines étudiées sont les suivants : IL-1 β : 3.9-250pg/ml ; IL-6 : 18.7-600pg/ml ; TNF- α 15.6-1000pg/ml ; IL-8 : 31.2-2000pg/ml ; /MMP9 : 31.2-2000pg/ml ; TIMP1 : 31.2-2000pg/ml

Puces à protéines

Les criblages par puces à protéines ont été réalisés en suivant les instructions du fournisseur. Pour les puces à protéines permettant la quantification de cytokines 500 μ l de surnageant de culture a été utilisé comme matrice pour l'incubation des membranes. Pour les puces à protéines concernant les voies de signalisation, 500 μ g de protéines extraites du tapis cellulaire ont été utilisés comme matrice pour l'incubation des membranes. Les valeurs d'expression relatives des protéines/phosphorylations sont ensuite exprimées en fonction de la densité de pixels de chaque emplacement d'anticorps. La normalisation est faite en fonction des valeurs d'emplacements contrôles positifs non spécifiques et d'emplacements contrôles négatifs.

Western-Blot

Pour l'étude par Western-Blot de nos échantillons, les protéines sont extraites dans du tampon de lyse RIPA avec inhibiteur de protéases et inhibiteurs de phosphatases. Les cellules sont dissociées mécaniquement sur glace, dans le tampon de lyse. La suspension cellulaire est ensuite placée dans un microtube en agitation sur une roue pendant 30 minutes à 4°C et ensuite centrifugées 5 minutes à 20 000g. Le surnageant est transféré dans un nouveau micro tube.

Les protéines sont quantifiées à l'aide du réactif de Bradford selon les instructions du fournisseur et à l'aide d'une gamme de protéines avec un intervalle de quantification de 0.031mg/ml à 2mg/ml. Environ 40 μ g de chaque échantillon est préparé avec le tampon de charge +5% de β -mercaptoéthanol et chauffé à 95°C pendant 5 minutes, avec le dépôt sur le gel d'électrophorèse.

L'électrophorèse est réalisée pendant 1 heure à 150v et 400mA dans des gels d'acrylamide baignés dans un tampon NuPAGE MOPS SDS. Après la migration, le transfert sur une

membrane de nitrocellulose est réalisé à l'aide du dispositif de transfert rapide iBlot. Après la migration, la membrane est colorée au rouge ponceau pour vérifier la qualité de la migration et du transfert. Elle est ensuite lavée sous agitation dans du tampon TBST avant d'être saturée pendant 1 heure dans du TBS + 5% BSA. L'incubation avec l'anticorps primaire se déroule sur la nuit à 4°C, sous agitation. Trois lavages au TBST sont effectués avant de procéder à l'incubation de 1 heure avec l'anticorps secondaire. Après trois lavages supplémentaires, la membrane est exposée aux réactifs de révélation par chimioluminescence pendant 5 minutes. La membrane est ensuite disposée dans le lecteur UV et les clichés sont pris. L'évaluation semi-quantitative de l'expression des protéines ciblées est effectuée par analyse d'image de la densité de pixel sur les clichés effectués.

Cytométrie en flux

Après les traitements de différenciation, les cellules sont décollées avec de la Trypsine à 0.05%, puis centrifugées 5 minutes à 800g et re suspendues dans du Paraformaldéhyde à 4% et incubées 15 minutes à l'obscurité. Les cellules sont ensuite lavées au PBS et incubées 30 minutes, à l'obscurité, sur glace, avec le tampon de blocage (PBS 1X + 5% de SVF + 20µl d'anticorps CD68). Les cellules sont ensuite lavées 2 fois avec un nouveau tampon (PBS 1X, 2.5% SVF, 2mM EDTA) et reconstituées dans du PBS pour passer au FACS et être triées selon le signal de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) correspondant à l'anticorps CD68.

Quantification des ARN messagers

Les ARN messagers sont extraits des cellules au terme des traitements en culture cellulaire. L'extraction est réalisée en suivant les instructions de l'équipement commercial « NucleoSpin RNA ». Pour les modèles cellulaires contenant peu d'ARN comme les monocytes non différenciés, plusieurs puits d'une même condition sont rassemblés dans une même colonne d'extraction pour augmenter le rendement, la concentration et la pureté des ARN extraits. Aussi, le volume d'élution final est diminué de 50% afin de concentrer encore plus les ARN. Les ARNm sont quantifiés à l'aide d'un spectrophotomètre « Nanodrop ».

Les ARNm extraits sont ensuite rétro-transcrits en ADN complémentaire (ADNc) grâce aux produits fournis par biotechne. Le programme du thermocycleur comprend 10 minutes à 25°C, 2 heures à 37°C puis 5 minutes à 85°C. À la fin du programme, les ADNc obtenus sont dilués pour atteindre 2.5ng/μl.

La RT-qPCR est ensuite réalisée dans une plaque 384 puits avec un volume final de 10μl. Les ADNc sont d'abord déposés en triplicata technique pour un total de 5ng par puits. Le mélange réactionnel (5μl de SYBR Green ; 300nM d'amorce sens et 300nM d'amorce antisens ; qsp 8μl avec H₂O sans RNase) est déposé dans chaque puits. La plaque est ensuite centrifugée 1 minute à 150g avant d'être insérée dans le thermocycleur. Le détail du protocole est résumé dans la **Figure 28**. Les données obtenues sont normalisées avec le gène de ménage de la Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) selon la formule $2(-\delta\delta Ct)$.

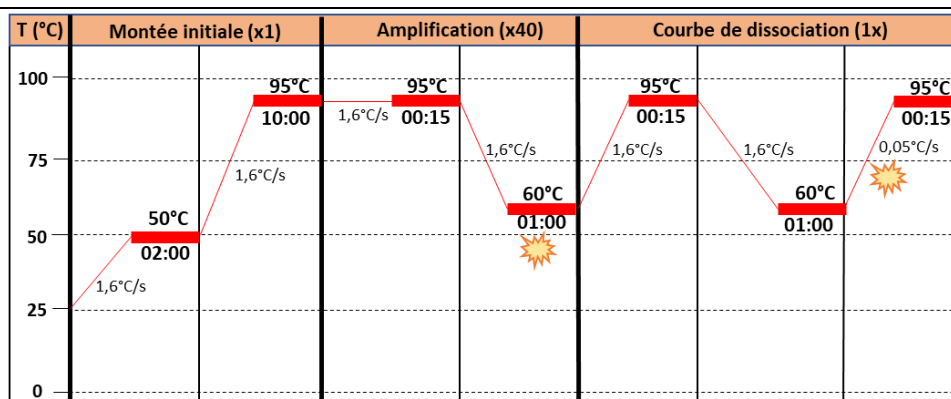


Figure 28 : Paramètres des cycles d'amplification de RT-qPCR

Le thermocycleur commence son protocole en montant de la température ambiante à 50°C, qu'il maintient 2 minutes, puis monte à 95°C et maintient 10 minutes. Viennent ensuite 40 cycles d'amplification qui alternent 15 secondes à 95°C, suivis de 1 minute à 60°C. Le protocole se finit avec un dernier cycle qui permet d'établir la courbe de dissociation de la cible amplifiée. Tous les changements de températures se font avec un gradient de 1.6°C/s, à l'exception du gradient de la courbe de dissociation, qui se fait à 0.05°C/s. Les mesures sont effectuées par l'appareil à la fin de chaque cycle d'amplification, et pendant la dissociation finale.

Liste des amorces

Nom	Séquence (5' – 3')	
	Sens	Antisens
IL1-β	ATGATGGCTTATTACAGTGGCAA	GTCGGAGATTCGTAGCTGGA
IL-6	AAAGAGGCACTGGCAGAAAA	TTTCACCAGGCAAGTCTCCT
IL-8	ACTGAGAGTGATTGAGAGTGGAC	AACCCTCTGCACCCAGTTTTTC
TNF-α	GAGGCCAAGCCCTGGTATG	CGGGCCGATTGATCTCAGC
CXCL-5	AGCTGCGTTGCGTTTGTTTAC	TGGCGAACACTTGCAGATTAC
CCL-2	CAGCCAGATGCAATCAATGCC	TGGAATCCTGAACCCACTTCT
MMP-9	AGACCTGGGCAGATTCCAAAC	CGGCAAGTCTTCCGAGTAGT
TIMP-1	CTTCTGCAATTCCGACCTCGT	ACGCTGGTATAAGGTGGTCTG
TIMP-2	GCTGCGAGTGCAAGATCAC	TGGTGCCCCTTGATGTTCTTC
TIMP-3	CAGGTCGCGTCTATGATGGC	AGGTGATACCGATAGTTCAGCC
TIMP-4	GCCAACAGCCAGAAGCAGTA	AGGGCTCGATGTAGTTGCAC
NGF	CCCAAGCCCACTGGACTAAA	TCCACAGTAATGTTGCGGCT
TrkA	TGGCTTGGCTGATACTGGCA	CAGATGCTGCTGGTTCTCGAT
p75^{NTR}	AAGCTTCTCAACGGCTCTGC	GAGTCTATGTGCTCGGGCTG
GAPDH	ACAACCTTTGGTATCGTGGAAGG	GCCATCACGCCACAGTTTC

Tableau 1 : Liste des amorces utilisées

Test de captation de microsphères

L'évaluation de la capacité de captation des microsphères a été réalisée en aspirant le milieu de culture au terme des traitements et en remplaçant par du milieu contenant 10µl/ml de microsphères pendant une nuit. Le milieu de culture est ensuite aspiré et lavé avec du PBS avant de mesurer la fluorescence 520 nm (excitation à 485nm). La capacité de captation est représentée par la moyenne de fluorescence.

Analyses statistiques

Les jeux de données contenant plus de 2 conditions ont été analysés par ANOVA 1 voie, non paramétrique (Kruskal-Wallis) suivie d'un post-test de Dunn. Les jeux de données ne contenant que 2 conditions à comparer ont été soumis à un t-test non paramétrique (Mann-Whitney). Le seuil de significativité a été placé à $p \leq 0.05$. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées sur le logiciel GraphPad Prism (version 8.0, GraphPad, USA).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- “A Clinical Practice Guideline for Treating Tobacco Use and Dependence: 2008 Update.” 2008. *American Journal of Preventive Medicine* 35 (2): 158–76. <https://doi.org/10.1016/j.amepre.2008.04.009>.
- Abe, Kohtaro, Masako Shinoda, Mariko Tanaka, Yukimitsu Kuwabara, Keimei Yoshida, Yoshitaka Hirooka, Ivan F. McMurtry, Masahiko Oka, and Kenji Sunagawa. 2016. “Haemodynamic Unloading Reverses Occlusive Vascular Lesions in Severe Pulmonary Hypertension.” *Cardiovascular Research* 111 (1): 16–25. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvw070>.
- Abid, Shariq, Elisabeth Marcos, Aurélien Parpaleix, Valérie Amsellem, Marielle Breau, Amal Houssaini, Nora Vienney, et al. 2019. “CCR2/CCR5-Mediated Macrophage–Smooth Muscle Cell Crosstalk in Pulmonary Hypertension.” *European Respiratory Journal* 54 (4). <https://doi.org/10.1183/13993003.02308-2018>.
- Aggarwal, Neil R., Kenji Tsushima, Yoshiki Eto, Ashutosh Tripathi, Pooja Mandke, Jason R. Mock, Brian T. Garibaldi, et al. 2014. “Immunological Priming Requires Tregs and Interleukin-10-Producing Macrophages to Accelerate Resolution from Severe Lung Inflammation.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 192 (9): 4453–64. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400146>.
- Ahmad, K, J F Cordier, and V Cottin. n.d. “Le syndrome emphysème-fibrose.” *MISE AU POINT*, 5.
- Albert, Richard K., John Connett, William C. Bailey, Richard Casaburi, J. Allen D. Cooper, Gerard J. Criner, Jeffrey L. Curtis, et al. 2011. “Azithromycin for Prevention of Exacerbations of COPD.” *The New England Journal of Medicine* 365 (8): 689–98. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1104623>.
- Alenghat, Elizabeth, and John R. Esterly. 1984. “Alveolar Macrophages in Perinatal Infants.” *Pediatrics* 74 (2): 221–23.
- Alexander, Warren S., and Douglas J. Hilton. 2004. “The Role of Suppressors of Cytokine Signaling (SOCS) Proteins in Regulation of the Immune Response.” *Annual Review of Immunology* 22: 503–29. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.091003.090312>.
- Anthonisen, Nicholas R., John E. Connett, Paul L. Enright, and Jure Manfreda. 2002. “Hospitalizations and Mortality in the Lung Health Study.” *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 166 (3): 333–39. <https://doi.org/10.1164/rccm.2110093>.
- Ariel, Amiram, and Charles N. Serhan. 2012. “New Lives Given by Cell Death: Macrophage Differentiation Following Their Encounter with Apoptotic Leukocytes during the Resolution of Inflammation.” *Frontiers in Immunology* 3 (January): 4. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00004>.
- Aslam, Shahila, Johnathan Man, Jason Behary, John Riskallah, Saidul Ansary, and Benjamin CH Kwan. 2016. “Outcomes and Cost Effectiveness of a Respiratory Coordinated Care Program in Patients with Severe or Very Severe COPD.” *Open Journal of Respiratory Diseases* 06 (03): 52–57. <https://doi.org/10.4236/ojrd.2016.63008>.
- Atkinson, Carl, Susan Stewart, Paul D. Upton, Rajiv Machado, Jennifer R. Thomson, Richard C. Trembath, and Nicholas W. Morrell. 2002. “Primary Pulmonary Hypertension Is Associated With Reduced Pulmonary Vascular Expression of Type II Bone Morphogenetic Protein Receptor.” *Circulation* 105 (14): 1672–78. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000012754.72951.3D>.
- Aurora, Arin B., and Eric N. Olson. 2014. “Immune Modulation of Stem Cells and Regeneration.” *Cell Stem Cell* 15 (1): 14–25. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.06.009>.

- Badesch, David B., Hunter C. Champion, Miguel Angel Gomez Sanchez, Marius M. Hoeser, James E. Loyd, Alessandra Manes, Michael McGoon, et al. 2009. "Diagnosis and Assessment of Pulmonary Arterial Hypertension." *Journal of the American College of Cardiology*, Proceedings of the 4th World Symposium on Pulmonary Hypertension, 54 (1, Supplement): S55–66. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.04.011>.
- Bai, Jiu-Wu, Xiao-xin Chen, Shengsheng Liu, Li Yu, and Jin-Fu Xu. 2017. "Smoking Cessation Affects the Natural History of COPD." *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease* 12 (November): 3323–28. <https://doi.org/10.2147/COPD.S150243>.
- Barnes, Peter J. 2008. "The Cytokine Network in Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease." *The Journal of Clinical Investigation* 118 (11): 3546–56. <https://doi.org/10.1172/JCI36130>.
- . 2010. "Inhaled Corticosteroids." *Pharmaceuticals* 3 (3): 514–40. <https://doi.org/10.3390/ph3030514>.
- . 2013. "Corticosteroid Resistance in Patients with Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 131 (3): 636–45. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.12.1564>.
- . 2016. "Inflammatory Mechanisms in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 138 (1): 16–27. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.05.011>.
- Barnes, Peter J, and Ian M Adcock. 2009. "Glucocorticoid Resistance in Inflammatory Diseases." *The Lancet* 373 (9678): 1905–17. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60326-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60326-3).
- Barnes, Peter J., Peter G. J. Burney, Edwin K. Silverman, Bartolome R. Celli, Jørgen Vestbo, Jadwiga A. Wedzicha, and Emiel F. M. Wouters. 2015. "Chronic Obstructive Pulmonary Disease." *Nature Reviews Disease Primers* 1 (1): 1–21. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.76>.
- Barouch, Rina, Gila Kazimirsky, Elena Appel, and Chaya Brodie. n.d. "Nerve Growth Factor Regulates TNF- α Production in Mouse Macrophages via MAP Kinase Activation," 8.
- Berger, Edward A., and Eric M. Shooter. 1977. "Evidence for Pro- β -Nerve Growth Factor, a Biosynthetic Precursor to β -Nerve Growth Factor." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74 (9): 3647–51.
- Bhatt, Surya P., Pallavi P. Balte, Joseph E. Schwartz, Patricia A. Cassano, David Couper, David R. Jacobs, Ravi Kalhan, et al. 2019. "Discriminative Accuracy of FEV1:FVC Thresholds for COPD-Related Hospitalization and Mortality." *JAMA* 321 (24): 2438–47. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.7233>.
- Bissonnette, Elyse Y., Jean-François Lauzon-Joset, Jason S. Debley, and Steven F. Ziegler. 2020. "Cross-Talk Between Alveolar Macrophages and Lung Epithelial Cells Is Essential to Maintain Lung Homeostasis." *Frontiers in Immunology* 11 (October): 583042. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.583042>.
- Blackwell, Timothy S., Ashley N. Hipps, Yasutoshi Yamamoto, Wei Han, Whitney J. Barham, Michael C. Ostrowski, Fiona E. Yull, and Lawrence S. Prince. 2011. "NF- κ B Signaling in Fetal Lung Macrophages Disrupts Airway Morphogenesis." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 187 (5): 2740–47. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101495>.
- Bonacci, Gustavo, Francisco J. Schopfer, Carlos I. Batthyany, Tanja K. Rudolph, Volker Rudolph, Nicholas K. H. Khoo, Eric E. Kelley, and Bruce A. Freeman. 2011. "Electrophilic Fatty Acids Regulate Matrix Metalloproteinase Activity and Expression." *The Journal of Biological Chemistry* 286 (18): 16074–81. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.225029>.

- Bonnet, Sébastien, Evangelos D. Michelakis, Christopher J. Porter, Miguel A. Andrade-Navarro, Bernard Thébaud, Sandra Bonnet, Alois Haromy, et al. 2006. "An Abnormal Mitochondrial–Hypoxia Inducible Factor-1 α –Kv Channel Pathway Disrupts Oxygen Sensing and Triggers Pulmonary Arterial Hypertension in Fawn Hooded Rats." *Circulation* 113 (22): 2630–41. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.609008>.
- Bonten, Marc J. M., Susanne M. Huijts, Marieke Bolkenbaas, Chris Webber, Scott Patterson, Samantha Gault, Cornelis H. van Werkhoven, et al. 2015. "Polysaccharide Conjugate Vaccine against Pneumococcal Pneumonia in Adults." Research-article. <Http://Dx.Doi.Org/10.1056/NEJMoa1408544>. Massachusetts Medical Society. World. March 18, 2015. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1408544>.
- Boucly, Athénaïs, Jason Weatherald, Laurent Savale, Xavier Jaïs, Vincent Cottin, Grégoire Prevot, François Picard, et al. 2017. "Risk Assessment, Prognosis and Guideline Implementation in Pulmonary Arterial Hypertension." *European Respiratory Journal* 50 (2): 1700889. <https://doi.org/10.1183/13993003.00889-2017>.
- Bradshaw, R. A., J. Murray-Rust, C. F. Ibáñez, N. Q. McDonald, R. Lapatto, and T. L. Blundell. 1994. "Nerve Growth Factor: Structure/Function Relationships." *Protein Science : A Publication of the Protein Society* 3 (11): 1901–13.
- Bratton, Donna L., and Peter M. Henson. 2011. "Neutrophil Clearance: When the Party's over, Cleanup Begins." *Trends in Immunology* 32 (8): 350–57. <https://doi.org/10.1016/j.it.2011.04.009>.
- Brouckaert, Janne, Stijn E. Verleden, Tom Verbelen, Willy Coosemans, Herbert Decaluwé, Paul De Leyn, Lieven Depypere, et al. 2019. "Double-Lung versus Heart-Lung Transplantation for Precapillary Pulmonary Arterial Hypertension: A 24-Year Single-Center Retrospective Study." *Transplant International* 32 (7): 717–29. <https://doi.org/10.1111/tri.13409>.
- Bullen, Christopher, Colin Howe, Murray Laugesen, Hayden McRobbie, Varsha Parag, Jonathan Williman, and Natalie Walker. 2013. "Electronic Cigarettes for Smoking Cessation: A Randomised Controlled Trial." *The Lancet* 382 (9905): 1629–37. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61842-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61842-5).
- Burrows, Benjamin, Ronald J Knudson, Martha G Cline, and Michael D Lebowitz. n.d. "Quantitative Relationships between Cigarette Smoking and Ventilatory Function," 11.
- Bussone, Guillaume, Mathieu C. Tamby, Cynthia Calzas, Nada Kherbeck, Younes Sahbatou, Claire Sanson, Khaldoun Ghazal, et al. 2012. "IgG from Patients with Pulmonary Arterial Hypertension and/or Systemic Sclerosis Binds to Vascular Smooth Muscle Cells and Induces Cell Contraction." *Annals of the Rheumatic Diseases* 71 (4): 596–605. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2011-200195>.
- Byrne, Adam J., Toby M. Maher, and Clare M. Lloyd. 2016. "Pulmonary Macrophages: A New Therapeutic Pathway in Fibrosing Lung Disease?" *Trends in Molecular Medicine* 22 (4): 303–16. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.02.004>.
- Cabral-Pacheco, Griselda A., Idalia Garza-Veloz, Claudia Castruita-De la Rosa, Jesús M. Ramirez-Acuña, Braulio A. Perez-Romero, Jesús F. Guerrero-Rodriguez, Nadia Martinez-Avila, and Margarita L. Martinez-Fierro. 2020. "The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases." *International Journal of Molecular Sciences* 21 (24): E9739. <https://doi.org/10.3390/ijms21249739>.
- Cai, Yanhui, Chie Sugimoto, Mariluz Arainga, Xavier Alvarez-Hernandez, Elizabeth S. Didier, and Marcelo J. Kuroda. 2014. "In Vivo Characterization of Alveolar and Interstitial Lung Macrophages in Rhesus Macaques: Implications for Understanding

- Lung Disease in Humans.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 192 (6): 2821–29. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302269>.
- Calafat, A M. 2004. “Determination of Tar, Nicotine, and Carbon Monoxide Yields in the Mainstream Smoke of Selected International Cigarettes.” *Tobacco Control* 13 (1): 45–51. <https://doi.org/10.1136/tc.2003.003673>.
- Caramori, Gaetano, Ian M. Adcock, Paolo Casolari, Kazuhiro Ito, Elen Jazrawi, Loukia Tsaprouni, Gino Villetti, et al. 2011. “Unbalanced Oxidant-Induced DNA Damage and Repair in COPD: A Link towards Lung Cancer.” *Thorax* 66 (6): 521–27. <https://doi.org/10.1136/thx.2010.156448>.
- Cardouat, G., C. Guibert, and V. Freund-Michel. 2020. “Expression et rôle du facteur de croissance des nerfs NGF dans l’hypertension pulmonaire.” *Revue des Maladies Respiratoires* 37 (3): 205–9. <https://doi.org/10.1016/j.rmr.2020.02.002>.
- Caroleo, Maria Cristina, Nicola Costa, Luisa Bracci-Laudiero, and Luigi Aloe. 2001. “Human Monocyte/Macrophages Activate by Exposure to LPS Overexpress NGF and NGF Receptors.” *Journal of Neuroimmunology* 113 (2): 193–201. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(00\)00441-0](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(00)00441-0).
- Cero, Fadila Telarevic, Vigdis Hillestad, Ivar Sjaastad, Arne Yndestad, Pål Aukrust, Trine Ranheim, Ida Gjervold Lunde, et al. 2015. “Absence of the Inflammasome Adaptor ASC Reduces Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension in Mice.” *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 309 (4): L378–87. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00342.2014>.
- Chakarov, Svetoslav, Hwee Ying Lim, Leonard Tan, Sheau Yng Lim, Peter See, Josephine Lum, Xiao-Meng Zhang, et al. 2019. “Two Distinct Interstitial Macrophage Populations Coexist across Tissues in Specific Subtissular Niches.” *Science (New York, N.Y.)* 363 (6432): eaau0964. <https://doi.org/10.1126/science.aau0964>.
- Chanput, Wasaporn, Jurriaan Mes, Robert A. M. Vreeburg, Huub F. J. Savelkoul, and Harry J. Wichers. 2010. “Transcription Profiles of LPS-Stimulated THP-1 Monocytes and Macrophages : A Tool to Study Inflammation Modulating Effects of Food -Derived Compounds.” *Food & Function* 1 (3): 254–61. <https://doi.org/10.1039/C0FO00113A>.
- Chatila, Wissam M., Byron M. Thomashow, Omar A. Minai, Gerard J. Criner, and Barry J. Make. 2008. “Comorbidities in Chronic Obstructive Pulmonary Disease.” *Proceedings of the American Thoracic Society* 5 (4): 549–55. <https://doi.org/10.1513/pats.200709-148ET>.
- Chelladurai, Prakash, Werner Seeger, and Soni Savai Pullamsetti. 2012. “Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Pulmonary Hypertension.” *European Respiratory Journal* 40 (3): 766–82. <https://doi.org/10.1183/09031936.00209911>.
- Chen, Xueyu, Mar Orriols, Frans J. Walther, El Houari Laghmani, Annemarie M. Hoogeboom, Anne C. B. Hogen-Esch, Pieter S. Hiemstra, et al. 2017. “Bone Morphogenetic Protein 9 Protects against Neonatal Hyperoxia-Induced Impairment of Alveolarization and Pulmonary Inflammation.” *Frontiers in Physiology* 8 (July): 486. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00486>.
- Chester, Adrian H., Magdi H. Yacoub, and Salvador Moncada. n.d. “Nitric Oxide and Pulmonary Arterial Hypertension.” *Global Cardiology Science & Practice* 2017 (2): 14. <https://doi.org/10.21542/gcsp.2017.14>.
- Christman, Brian W., Charles D. McPherson, John H. Newman, Gayle A. King, Gordon R. Bernard, Bertron M. Groves, and James E. Loyd. 2010. “An Imbalance between the Excretion of Thromboxane and Prostacyclin Metabolites in Pulmonary Hypertension.” Research-article. [Http://Dx.Doi.Org/10.1056/NEJM199207093270202](http://Dx.Doi.Org/10.1056/NEJM199207093270202). Massachusetts Medical Society. World. January 19, 2010. <https://doi.org/10.1056/NEJM199207093270202>.

- Chung, K. F. 2001. "Cytokines in Chronic Obstructive Pulmonary Disease." *European Respiratory Journal* 18 (1): 50–59. <https://doi.org/10.1183/09031936.01.00229701>.
- Churg, Andrew, Steven Zhou, Xiaoshan Wang, Rona Wang, and Joanne L. Wright. 2009. "The Role of Interleukin-1 β in Murine Cigarette Smoke-Induced Emphysema and Small Airway Remodeling." *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 40 (4): 482–90. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2008-0038OC>.
- Cicko, Sanja, Monica Lucattelli, Tobias Müller, Marek Lommatzsch, Giovanna De Cunto, Silvia Cardini, William Sundas, et al. 2010. "Purinergic Receptor Inhibition Prevents the Development of Smoke-Induced Lung Injury and Emphysema." *The Journal of Immunology* 185 (1): 688–97. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0904042>.
- Corbel, M., C. Belleguic, E. Boichot, and V. Lagente. 2002. "Involvement of Gelatinases (MMP-2 and MMP-9) in the Development of Airway Inflammation and Pulmonary Fibrosis." *Cell Biology and Toxicology* 18 (1): 51–61. <https://doi.org/10.1023/a:1014471213371>.
- Cottin, V., H. Nunes, P.-Y. Brillet, P. Delaval, G. Devouassoux, I. Tillie-Leblond, D. Israel-Biet, I. Court-Fortune, D. Valeyre, and J.-F. Cordier. 2005. "Combined Pulmonary Fibrosis and Emphysema: A Distinct Underrecognised Entity." *European Respiratory Journal* 26 (4): 586–93. <https://doi.org/10.1183/09031936.05.00021005>.
- Criner, Gerard, Francis C. Cordova, Vadim Leyenson, Bruce Roy, John Travaline, Shrivasa Sudarshan, Gerald O'brien, Anne Marie Kuzma, and Satoshi Furukawa. 1998. "Effect of Lung Volume Reduction Surgery on Diaphragm Strength." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 157 (5): 1578–85. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.157.5.9607081>.
- Cui, Wen-Yan, Shufang Zhao, Renata Polanowska-Grabowska, Ju Wang, Jinxue Wei, Bhagirathi Dash, Sulie L. Chang, Jeffrey J. Saucerman, Jun Gu, and Ming D. Li. 2013. "Identification and Characterization of Poly(I:C)-Induced Molecular Responses Attenuated by Nicotine in Mouse Macrophages." *Molecular Pharmacology* 83 (1): 61–72. <https://doi.org/10.1124/mol.112.081497>.
- Dagnell, Charlotta, Cecilia Kemi, Julius Klominek, Per Eriksson, C. Magnus Sköld, Anders Eklund, Johan Grunewald, and Caroline Olgart Höglund. 2007. "Effects of Neurotrophins on Human Bronchial Smooth Muscle Cell Migration and Matrix Metalloproteinase-9 Secretion." *Translational Research* 150 (5): 303–10. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2007.05.001>.
- Daigneault, Marc, Julie A. Preston, Helen M. Marriott, Moira K. B. Whyte, and David H. Dockrell. 2010. "The Identification of Markers of Macrophage Differentiation in PMA-Stimulated THP-1 Cells and Monocyte-Derived Macrophages." *PLoS ONE* 5 (1): e8668. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008668>.
- Dakin, Paula, Stephen J. DiMartino, Haitao Gao, Jennifer Maloney, Alan J. Kivitz, Thomas J. Schnitzer, Neil Stahl, George D. Yancopoulos, and Gregory P. Geba. 2019. "The Efficacy, Tolerability, and Joint Safety of Fasinumab in Osteoarthritis Pain: A Phase IIb/III Double-Blind, Placebo-Controlled, Randomized Clinical Trial." *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.j.)* 71 (11): 1824–34. <https://doi.org/10.1002/art.41012>.
- D'Alonzo, Gilbert E., Robyn J. Barst, Stephen M. Ayres, Edward H. Bergofsky, Bruce H. Brundage, Katherine M. Detre, Alfred P. Fishman, et al. 1991. "Survival in Patients with Primary Pulmonary Hypertension." *Annals of Internal Medicine* 115 (5): 343–49. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-115-5-343>.
- Datta-Mitra, Ananya, Smriti Kundu-Raychaudhuri, Anupam Mitra, and Siba P. Raychaudhuri. 2015. "Cross Talk between Neuroregulatory Molecule and Monocyte: Nerve Growth Factor Activates the Inflammasome." Edited by Jean Kanellopoulos. *PLoS ONE* 10 (4): e0121626. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121626>.

- Davenport, A. P., R. E. Kuc, C. Southan, and J. J. Maguire. 2018. “New Drugs and Emerging Therapeutic Targets in the Endothelin Signaling Pathway and Prospects for Personalized Precision Medicine.” *Physiological Research*, May, S37–54. <https://doi.org/10.33549/physiolres.933872>.
- Davenport, Anthony P., Kelly A. Hyndman, Neeraj Dhaun, Christopher Southan, Donald E. Kohan, Jennifer S. Pollock, David M. Pollock, David J. Webb, and Janet J. Maguire. 2016. “Endothelin.” *Pharmacological Reviews* 68 (2): 357–418. <https://doi.org/10.1124/pr.115.011833>.
- Davidson, Kevin R., Duc M. Ha, Marvin I. Schwarz, and Edward D. Chan. 2020. “Bronchoalveolar Lavage as a Diagnostic Procedure: A Review of Known Cellular and Molecular Findings in Various Lung Diseases.” *Journal of Thoracic Disease* 12 (9): 4991–5019. <https://doi.org/10.21037/jtd-20-651>.
- De Filippo, Katia, Anne Dudeck, Mike Hasenberg, Emma Nye, Nico van Rooijen, Karin Hartmann, Matthias Gunzer, Axel Roers, and Nancy Hogg. 2013. “Mast Cell and Macrophage Chemokines CXCL1/CXCL2 Control the Early Stage of Neutrophil Recruitment during Tissue Inflammation.” *Blood* 121 (24): 4930–37. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-02-486217>.
- De Nardo, Dominic, Christine M. De Nardo, and Eicke Latz. 2014. “New Insights into Mechanisms Controlling the NLRP3 Inflammasome and Its Role in Lung Disease.” *The American Journal of Pathology* 184 (1): 42–54. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.09.007>.
- Dechant, Georg, and Harald Neumann. 2002. “Neurotrophins.” In *Molecular and Cellular Biology of Neuroprotection in the CNS*, edited by Christian Alzheimer, 303–34. Advances in Experimental Medicine and Biology. Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0123-7_11.
- Del Pozo, R, I Hernandez Gonzalez, and P Escribano-Subias. 2017. “The Prostacyclin Pathway in Pulmonary Arterial Hypertension: A Clinical Review.” *Expert Review of Respiratory Medicine* 11 (6): 491–503. <https://doi.org/10.1080/17476348.2017.1317599>.
- Deshmane, Satish L., Sergey Kremlev, Shohreh Amini, and Bassel E. Sawaya. 2009a. “Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview.” *Journal of Interferon & Cytokine Research* 29 (6): 313–26. <https://doi.org/10.1089/jir.2008.0027>.
- . 2009b. “Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview.” *Journal of Interferon & Cytokine Research: The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 29 (6): 313–26. <https://doi.org/10.1089/jir.2008.0027>.
- Dib, Hanadi, Mathieu C. Tamby, Guillaume Bussone, Alexis Regent, Alice Berezné, Claudine Lafine, Cédric Broussard, et al. 2012. “Targets of Anti-Endothelial Cell Antibodies in Pulmonary Hypertension and Scleroderma.” *European Respiratory Journal* 39 (6): 1405–14. <https://doi.org/10.1183/09031936.00181410>.
- Diebold, Isabel, Jan K. Hennigs, Kazuya Miyagawa, Caiyun G. Li, Nils P. Nickel, Mark Kaschwich, Aiqin Cao, et al. 2015. “BMP2 Preserves Mitochondrial Function and DNA Integrity During Reoxygenation to Promote Endothelial Survival and Reverse Pulmonary Hypertension.” *Cell Metabolism* 21 (4): 596–608. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.03.010>.
- Docherty, Craig K., Katie Yates Harvey, Kirsty M. Mair, Sinead Griffin, Nina Denver, and Margaret R. MacLean. 2018. “The Role of Sex in the Pathophysiology of Pulmonary Hypertension.” In *Sex-Specific Analysis of Cardiovascular Function*, edited by Peter L. M. Kerkhof and Virginia M. Miller, 1065:511–28. Advances in Experimental

- Medicine and Biology. Cham: Springer International Publishing.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-77932-4_31.
- Donnelly, Louise E., and Peter J. Barnes. 2012. "Defective Phagocytosis in Airways Disease." *CHEST* 141 (4): 1055–62. <https://doi.org/10.1378/chest.11-2348>.
- Dorfmüller, Peter, Véronique Zarka, Ingrid Durand-Gasselín, Gianpaola Monti, Karl Balabanian, Gilles Garcia, Frédérique Capron, et al. 2002. "Chemokine RANTES in Severe Pulmonary Arterial Hypertension." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 165 (4): 534–39.
<https://doi.org/10.1164/ajrccm.165.4.2012112>.
- Dransfield, M. T., S. M. Rowe, J. E. Johnson, W. C. Bailey, and L. B. Gerald. 2008. "Use of Beta Blockers and the Risk of Death in Hospitalised Patients with Acute Exacerbations of COPD." *Thorax* 63 (4): 301–5.
<https://doi.org/10.1136/thx.2007.081893>.
- Duda, Izabela, Łukasz Krzych, Halina Jędrzejowska-Szypułka, and Joana Lewin-Kowalik. 2020. "Plasma Matrix Metalloproteinase-9 and Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase-1 as Prognostic Biomarkers in Critically Ill Patients." *Open Medicine (Warsaw, Poland)* 15: 50–56. <https://doi.org/10.1515/med-2020-0008>.
- Eddahibi, Saadia, Ari Chaouat, Nicholas Morrell, Elie Fadel, Claire Fuhrman, Anne-Sophie Bugnet, Philippe Darteville, et al. 2003. "Polymorphism of the Serotonin Transporter Gene and Pulmonary Hypertension in Chronic Obstructive Pulmonary Disease." *Circulation* 108 (15): 1839–44. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000091409.53101.E8>.
- Eguíluz-Gracia, Ibon, Hans Henrik Lawaetz Schultz, Liv I. B. Sikkeland, Elena Danilova, Are M. Holm, Cornelis J. H. Pronk, William W. Agace, et al. 2016. "Long-Term Persistence of Human Donor Alveolar Macrophages in Lung Transplant Recipients." *Thorax* 71 (11): 1006–11. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2016-208292>.
- Ehrhard, Patricia B, URSULA GANTERT, JOACHIM BAUERT, and UWE ORRÉN. n.d. "Expression of Functional Trk Protooncogene in Human Monocytes," 5.
- Eickmeier, Olaf, Marisa Huebner, Eva Herrmann, Ulrich Zissler, Martin Rosewich, Patrick C. Baer, Roland Buhl, Sabina Schmitt-Grohé, Stefan Zielen, and Ralf Schubert. 2010. "Sputum Biomarker Profiles in Cystic Fibrosis (CF) and Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) and Association between Pulmonary Function." *Cytokine* 50 (2): 152–57. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2010.02.004>.
- Eisner, Mark D., Nicholas Anthonisen, David Coultas, Nino Kuenzli, Rogelio Perez-Padilla, Dirkje Postma, Isabelle Romieu, Edwin K. Silverman, and John R. Balmes. 2010. "An Official American Thoracic Society Public Policy Statement: Novel Risk Factors and the Global Burden of Chronic Obstructive Pulmonary Disease." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 182 (5): 693–718.
<https://doi.org/10.1164/rccm.200811-1757ST>.
- El Chami, Hala, and Paul M. Hassoun. 2012. "Immune and Inflammatory Mechanisms in Pulmonary Arterial Hypertension." *Progress in Cardiovascular Diseases, Pulmonary Vascular Disease and the Right Ventricle*, 55 (2): 218–28.
<https://doi.org/10.1016/j.pcad.2012.07.006>.
- El Kasmi, Karim C., Steven C. Pugliese, Suzette R. Riddle, Jens M. Poth, Aimee L. Anderson, Maria G. Frid, Min Li, et al. 2014. "Adventitial Fibroblasts Induce a Distinct Proinflammatory/Profibrotic Macrophage Phenotype in Pulmonary Hypertension." *The Journal of Immunology* 193 (2): 597–609.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1303048>.
- El-Shimy, Wafaa S., Ayman S. El-Dib, Hala M. Nagy, and Wael Sabry. 2014. "A Study of IL-6, IL-8, and TNF- α as Inflammatory Markers in COPD Patients." *Egyptian Journal of Bronchology* 8 (2): 91–99. <https://doi.org/10.4103/1687-8426.145698>.

- Eng, Hock-Liew, Yuan-Ying Hsu, and Tsun-Mei Lin. 2018. "Differences in TLR7/8 Activation between Monocytes and Macrophages." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 497 (1): 319–25. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.02.079>.
- Evren, Elza, Emma Ringqvist, and Tim Willinger. 2020. "Origin and Ontogeny of Lung Macrophages: From Mice to Humans." *Immunology* 160 (2): 126–38. <https://doi.org/10.1111/imm.13154>.
- Fadok, V A, D L Bratton, A Konowal, P W Freed, J Y Westcott, and P M Henson. 1998. "Macrophages That Have Ingested Apoptotic Cells in Vitro Inhibit Proinflammatory Cytokine Production through Autocrine/Paracrine Mechanisms Involving TGF-Beta, PGE2, and PAF." *Journal of Clinical Investigation* 101 (4): 890–98.
- Fahy, John V., and Burton F. Dickey. 2010. "Airway Mucus Function and Dysfunction." *The New England Journal of Medicine* 363 (23): 2233–47. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0910061>.
- Ferhani, Nassima, Séverine Letuve, Alexander Kozhich, Olivier Thibaudeau, Martine Grandsaigne, Marielle Maret, Marie-Christine Dombret, et al. 2010. "Expression of High-Mobility Group Box 1 and of Receptor for Advanced Glycation End Products in Chronic Obstructive Pulmonary Disease." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 181 (9): 917–27. <https://doi.org/10.1164/rccm.200903-0340OC>.
- Fijalkowska, Iwona, Weiling Xu, Suzy A.A. Comhair, Allison J. Janocha, Lori A. Mavrikis, Balaji Krishnamachary, Lijie Zhen, et al. 2010. "Hypoxia Inducible-Factor1 α Regulates the Metabolic Shift of Pulmonary Hypertensive Endothelial Cells." *The American Journal of Pathology* 176 (3): 1130–38. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090832>.
- Florentin, Jonathan, Emilie Coppin, Sathish Babu Vasamsetti, Jingsi Zhao, Yi-Yin Tai, Ying Tang, Yingze Zhang, et al. 2018. "Inflammatory Macrophage Expansion in Pulmonary Hypertension Depends upon Mobilization of Blood-Borne Monocytes." *The Journal of Immunology* 200 (10): 3612–25. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701287>.
- Fox, Alyson J, Hema J Patel, Peter J Barnes, and Maria G Belvisi. 2001. "Release of Nerve Growth Factor by Human Pulmonary Epithelial Cells: Role in Airway Inflammatory Diseases." *European Journal of Pharmacology* 424 (2): 159–62. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(01\)01138-4](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(01)01138-4).
- Freund, V., F. Pons, V. Joly, E. Mathieu, N. Martinet, and N. Frossard. 2002. "Upregulation of Nerve Growth Factor Expression by Human Airway Smooth Muscle Cells in Inflammatory Conditions." *European Respiratory Journal* 20 (2): 458–63. <https://doi.org/10.1183/09031936.02.00269202>.
- Freund-Michel, V., and N. Frossard. 2008. "The Nerve Growth Factor and Its Receptors in Airway Inflammatory Diseases." *Pharmacology & Therapeutics* 117 (1): 52–76. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.07.003>.
- Freund-Michel, Véronique, Claude Bertrand, and Nelly Frossard. 2006. "TrkA Signalling Pathways in Human Airway Smooth Muscle Cell Proliferation." *Cellular Signalling* 18 (5): 621–27. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2005.06.007>.
- Freund-Michel, Véronique, Marcelina Cardoso Dos Santos, Christophe Guignabert, David Montani, Carole Phan, Florence Coste, Ly Tu, et al. 2015. "Role of Nerve Growth Factor in Development and Persistence of Experimental Pulmonary Hypertension." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 192 (3): 342–55. <https://doi.org/10.1164/rccm.201410-1851OC>.

- Fricker, Michael, and Peter G. Gibson. 2017. "Macrophage Dysfunction in the Pathogenesis and Treatment of Asthma." *European Respiratory Journal* 50 (3). <https://doi.org/10.1183/13993003.00196-2017>.
- Frid, Maria G., Jacqueline A. Brunetti, Danielle L. Burke, Todd C. Carpenter, Neil J. Davie, John T. Reeves, Mark T. Roedersheimer, Nico van Rooijen, and Kurt R. Stenmark. 2006. "Hypoxia-Induced Pulmonary Vascular Remodeling Requires Recruitment of Circulating Mesenchymal Precursors of a Monocyte/Macrophage Lineage." *The American Journal of Pathology* 168 (2): 659–69. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.050599>.
- Frossard, N., E. Naline, C. Olgart Höglund, O. Georges, and C. Advenier. 2005. "Nerve Growth Factor Is Released by IL-1 β and Induces Hyperresponsiveness of the Human Isolated Bronchus." *European Respiratory Journal* 26 (1): 15–20. <https://doi.org/10.1183/09031936.05.00047804>.
- Frost, Adaani, David Badesch, J. Simon R. Gibbs, Deepa Gopalan, Dinesh Khanna, Alessandra Manes, Ronald Oudiz, Toru Satoh, Fernando Torres, and Adam Torbicki. 2019. "Diagnosis of Pulmonary Hypertension." *European Respiratory Journal* 53 (1): 1801904. <https://doi.org/10.1183/13993003.01904-2018>.
- Furth, R Van, Z A Cohn, J G Hirsch, J H Humphrey, W G Specior, and H L Langevoort. n.d. "The Mononuclear Phagocyte System: A New Classification of Macrophages, Monocytes, and Their Precursor Cells," 8.
- Galiè, Nazzareno, Richard N. Channick, Robert P. Frantz, Ekkehard Grünig, Zhi Cheng Jing, Olga Moiseeva, Ioana R. Preston, et al. 2019. "Risk Stratification and Medical Therapy of Pulmonary Arterial Hypertension." *European Respiratory Journal* 53 (1): 1801889. <https://doi.org/10.1183/13993003.01889-2018>.
- Galiè, Nazzareno, Marc Humbert, Jean-Luc Vachiery, Simon Gibbs, Irene Lang, Adam Torbicki, Gérald Simonneau, et al. 2015. "2015 ESC/ERS Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS) Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT)." *European Respiratory Journal* 46 (4): 903–75. <https://doi.org/10.1183/13993003.01032-2015>.
- Gaschler, Gordon J., Caleb C. J. Zavitz, Carla M. T. Bauer, Marko Skrtic, Maria Lindahl, Clinton S. Robbins, Biao Chen, and Martin R. Stämpfli. 2008. "Cigarette Smoke Exposure Attenuates Cytokine Production by Mouse Alveolar Macrophages." *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 38 (2): 218–26. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2007-0053OC>.
- Geraghty, Patrick Ph D., Anne Elizabeth M. D. Wyman, Itsaso Ph D. Garcia-Arcos, Abdoulaye Jules M. S. Dabo, Sonya M. D. Gadhvi, and Robert M. D. Foronjy. 2013. "STAT3 Modulates Cigarette Smoke-Induced Inflammation and Protease Expression." *Frontiers in Physiology* 0. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00267>.
- Giaid, Adel, and Dina Saleh. 1995. "Reduced Expression of Endothelial Nitric Oxide Synthase in the Lungs of Patients with Pulmonary Hypertension." *New England Journal of Medicine* 333 (4): 214–21. <https://doi.org/10.1056/NEJM199507273330403>.
- Gibbings, Sophie L., Stacey M. Thomas, Shaikh M. Atif, Alexandra L. McCubbrey, A. Nicole Desch, Thomas Danhorn, Sonia M. Leach, et al. 2017. "Three Unique Interstitial Macrophages in the Murine Lung at Steady State." *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 57 (1): 66–76. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2016-0361OC>.

- Ginhoux, Florent, and Martin Williams. 2016. "Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis." *Immunity* 44 (3): 439–49. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.024>.
- Ginhoux, Florent, and Steffen Jung. 2014. "Monocytes and Macrophages: Developmental Pathways and Tissue Homeostasis." *Nature Reviews Immunology* 14 (6): 392–404. <https://doi.org/10.1038/nri3671>.
- Golde, David W., Liskin A. Byers, and Theodore N. Finley. 1974. "Proliferative Capacity of Human Alveolar Macrophage." *Nature* 247 (5440): 373–75. <https://doi.org/10.1038/247373a0>.
- Gomberg-Maitland, M, ML Maitland, RJ Barst, L Sugeng, S Coslet, TJ Perrino, L Bond, ME LaCouture, SL Archer, and MJ Ratain. 2010. "A Dosing/Cross-Development Study of the Multikinase Inhibitor Sorafenib in Patients With Pulmonary Arterial Hypertension." *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 87 (3): 303–10. <https://doi.org/10.1038/clpt.2009.217>.
- Gomez Perdiguero, Elisa, Kay Klapproth, Christian Schulz, Katrin Busch, Emanuele Azzoni, Lucile Crozet, Hannah Garner, et al. 2015. "Tissue-Resident Macrophages Originate from Yolk Sac-Derived Erythro-Myeloid Progenitors." *Nature* 518 (7540): 547–51. <https://doi.org/10.1038/nature13989>.
- Good, Robert B., Adrian J. Gilbane, Sarah L. Trinder, Christopher P. Denton, Gerry Coghlan, David J. Abraham, and Alan M. Holmes. 2015. "Endothelial to Mesenchymal Transition Contributes to Endothelial Dysfunction in Pulmonary Arterial Hypertension." *The American Journal of Pathology* 185 (7): 1850–58. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.03.019>.
- Gordon, S B, and R C Read. 2002. "Macrophage Defences against Respiratory Tract Infections: The Immunology of Childhood Respiratory Infections." *British Medical Bulletin* 61 (1): 45–61. <https://doi.org/10.1093/bmb/61.1.45>.
- Gr, Washko, Fan Vs, Ramsey Sd, Mohsenifar Z, Martinez F, Make Bj, Scirba Fc, et al. 2007. "The Effect of Lung Volume Reduction Surgery on Chronic Obstructive Pulmonary Disease Exacerbations." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 177 (2): 164–69. <https://doi.org/10.1164/rccm.200708-1194oc>.
- Grumelli, Sandra, David B Corry, Li-Zhen Song, Ling Song, Linda Green, Joseph Huh, Joan Hacken, et al. 2004. "An Immune Basis for Lung Parenchymal Destruction in Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Emphysema." *PLoS Medicine* 1 (1): e8. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0010008>.
- Guarda, Greta, Manuel Zenger, Amir S. Yazdi, Kate Schroder, Isabel Ferrero, Philippe Menu, Aubry Tardivel, Chantal Mattmann, and Jürg Tschopp. 2011. "Differential Expression of NLRP3 among Hematopoietic Cells." *The Journal of Immunology* 186 (4): 2529–34. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002720>.
- Guha, Mausumee, and Nigel Mackman. 2001. "LPS Induction of Gene Expression in Human Monocytes." *Cellular Signalling* 13 (2): 85–94. [https://doi.org/10.1016/S0898-6568\(00\)00149-2](https://doi.org/10.1016/S0898-6568(00)00149-2).
- Guignabert, Christophe, Carole Phan, Andrei Seferian, Alice Huertas, Ly Tu, Raphaël Thuillet, Caroline Sattler, et al. n.d. "Dasatinib Induces Lung Vascular Toxicity and Predisposes to Pulmonary Hypertension." *The Journal of Clinical Investigation* 126 (9): 3207–18. <https://doi.org/10.1172/JCI86249>.
- Williams, Martin, Ismé De Kleer, Sandrine Henri, Sijranke Post, Leen Vanhoutte, Sofie De Prijck, Kim Deswarte, Bernard Malissen, Hamida Hammad, and Bart N. Lambrecht. 2013. "Alveolar Macrophages Develop from Fetal Monocytes That Differentiate into Long-Lived Cells in the First Week of Life via GM-CSF." *Journal of Experimental Medicine* 210 (10): 1977–92. <https://doi.org/10.1084/jem.20131199>.

- Guilliams, Martin, and Charlotte L. Scott. 2017. "Does Niche Competition Determine the Origin of Tissue-Resident Macrophages?" *Nature Reviews Immunology* 17 (7): 451–60. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.42>.
- Gurtner, Geoffrey C., Sabine Werner, Yann Barrandon, and Michael T. Longaker. 2008. "Wound Repair and Regeneration." *Nature* 453 (7193): 314–21. <https://doi.org/10.1038/nature07039>.
- Haan, Claude, Stephanie Kreis, Christiane Margue, and Iris Behrmann. 2006. "Jaks and Cytokine Receptors—An Intimate Relationship." *Biochemical Pharmacology*, Special Issue: Cell Signalling, Transcription and Translation as Therapeutic Targets, 72 (11): 1538–46. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.04.013>.
- Hamon, Rhys, Hai B. Tran, Eugene Roscioli, Miranda Ween, Hubertus Jersmann, and Sandra Hodge. 2018. "Bushfire Smoke Is Pro-Inflammatory and Suppresses Macrophage Phagocytic Function." *Scientific Reports* 8 (1): 13424. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31459-6>.
- Han, Chang Yeop, Atil Y. Kargi, Mohamed Omer, Christina K. Chan, Martin Wabitsch, Kevin D. O'Brien, Thomas N. Wight, and Alan Chait. 2010. "Differential Effect of Saturated and Unsaturated Free Fatty Acids on the Generation of Monocyte Adhesion and Chemotactic Factors by Adipocytes: Dissociation of Adipocyte Hypertrophy From Inflammation." *Diabetes* 59 (2): 386–96. <https://doi.org/10.2337/db09-0925>.
- Hansen, James E., Xing-Guo Sun, and Karlman Wasserman. 2007. "Spirometric Criteria for Airway Obstruction: Use Percentage of FEV1/FVC Ratio Below the Fifth Percentile, Not < 70%." *CHEST* 131 (2): 349–55. <https://doi.org/10.1378/chest.06-1349>.
- Hara, Hiromichi, Jun Araya, Saburo Ito, Kenji Kobayashi, Naoki Takasaka, Yutaka Yoshii, Hiroshi Wakui, et al. 2013. "Mitochondrial Fragmentation in Cigarette Smoke-Induced Bronchial Epithelial Cell Senescence." *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 305 (10): L737–46. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00146.2013>.
- Hashimoto, Daigo, Andrew Chow, Clara Noizat, Pearlina Teo, Mary Beth Beasley, Marylene Leboeuf, Christian D. Becker, et al. 2013. "Tissue Resident Macrophages Self-Maintain Locally throughout Adult Life with Minimal Contribution from Circulating Monocytes." *Immunity* 38 (4): 10.1016/j.immuni.2013.04.004. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.04.004>.
- Hashimoto-Kataoka, Takahiro, Naoki Hosen, Takashi Sonobe, Yoh Arita, Taku Yasui, Takeshi Masaki, Masato Minami, et al. 2015. "Interleukin-6/Interleukin-21 Signaling Axis Is Critical in the Pathogenesis of Pulmonary Arterial Hypertension." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (20): E2677–86. <https://doi.org/10.1073/pnas.1424774112>.
- He, Shengyang, Lihua Xie, Junjuan Lu, and Shenghua Sun. 2017. "Characteristics and Potential Role of M2 Macrophages in COPD." *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease* 12 (October): 3029–39. <https://doi.org/10.2147/COPD.S147144>.
- Henson, Peter M. 2017. "Cell Removal: Efferocytosis." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 33 (1): 127–44. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-111315-125315>.
- Henson, Peter M., and Donna L. Bratton. 2013. "Antiinflammatory Effects of Apoptotic Cells." *The Journal of Clinical Investigation* 123 (7): 2773–74. <https://doi.org/10.1172/JCI69344>.
- Herr, C, C Beisswenger, C Hess, K Kandler, N Suttorp, T Welte, J-M Schroeder, C Vogelmeier, and R B. f. t. C. S. Group. 2009. "Suppression of Pulmonary Innate Host

- Defence in Smokers.” *Thorax* 64 (2): 144–49.
<https://doi.org/10.1136/thx.2008.102681>.
- Hoepfer, Marius M., Robyn J. Barst, Robert C. Bourge, Jeremy Feldman, Adaani E. Frost, Nazzareno Galié, Miguel Angel Gómez-Sánchez, et al. 2013. “Imatinib Mesylate as Add-on Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension.” *Circulation* 127 (10): 1128–38. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.000765>.
- Hoepfer, Marius M., Harm Jan Bogaard, Robin Condliffe, Robert Frantz, Dinesh Khanna, Marcin Kurzyna, David Langleben, et al. 2013. “Definitions and Diagnosis of Pulmonary Hypertension.” *Journal of the American College of Cardiology* 62 (25): D42–50. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.10.032>.
- Hoffmann, Elke, Oliver Dittrich-Breiholz, Helmut Holtmann, and Michael Kracht. 2002. “Multiple Control of Interleukin-8 Gene Expression.” *Journal of Leukocyte Biology* 72 (5): 847–55. <https://doi.org/10.1189/jlb.72.5.847>.
- Hong, Ye-Ji, Hyo-Ju Ahn, Jongdae Shin, Joon H. Lee, Jin-Hoi Kim, Hwan-Woo Park, and Sung Ki Lee. 2018. “Unsaturated Fatty Acids Protect Trophoblast Cells from Saturated Fatty Acid-Induced Autophagy Defects.” *Journal of Reproductive Immunology* 125 (February): 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2017.12.001>.
- Hottz, Eugenio D., Juliana F. Lopes, Carla Freitas, Rogério Valls-de-Souza, Marcus F. Oliveira, Marcelo T. Bozza, Andrea T. Da Poian, et al. 2013. “Platelets Mediate Increased Endothelium Permeability in Dengue through NLRP3-Inflammasome Activation.” *Blood* 122 (20): 3405–14. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-05-504449>.
- Hu, Yijie, Leon Chi, Wolfgang M. Kuebler, and Neil M. Goldenberg. 2020. “Perivascular Inflammation in Pulmonary Arterial Hypertension.” *Cells* 9 (11): 2338. <https://doi.org/10.3390/cells9112338>.
- Huan, Wang, Zhang Tianzhu, Li Yu, and Wang Shumin. 2017. “Effects of Ergosterol on COPD in Mice via JAK3/STAT3/NF-KB Pathway.” *Inflammation* 40 (3): 884–93. <https://doi.org/10.1007/s10753-017-0533-5>.
- Huertas, Alice, Ly Tu, Marc Humbert, and Christophe Guignabert. 2020. “Chronic Inflammation within the Vascular Wall in Pulmonary Arterial Hypertension: More than a Spectator.” *Cardiovascular Research* 116 (5): 885–93. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvz308>.
- Hugbart, Chloé, Yann Verres, Brendan Le Daré, Simon Bucher, Elise Vène, Aude Bodin, Vincent Lagente, et al. 2020. “Non-Oxidative Ethanol Metabolism in Human Hepatic Cells in Vitro: Involvement of Uridine Diphospho-Glucuronosyltransferase 1A9 in Ethylglucuronide Production.” *Toxicology in Vitro* 66 (August): 104842. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104842>.
- Humbert, M, G Monti, F Brenot, O Sitbon, A Portier, L Grangeot-Keros, P Duroux, P Galanaud, G Simonneau, and D Emilie. 1995. “Increased Interleukin-1 and Interleukin-6 Serum Concentrations in Severe Primary Pulmonary Hypertension.” *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 151 (5): 1628–31. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.151.5.7735624>.
- Humbert, Marc, Christophe Guignabert, Sébastien Bonnet, Peter Dorfmueller, James R. Klinger, Mark R. Nicolls, Andrea J. Olschewski, et al. 2019. “Pathology and Pathobiology of Pulmonary Hypertension: State of the Art and Research Perspectives.” *European Respiratory Journal* 53 (1). <https://doi.org/10.1183/13993003.01887-2018>.
- Humbert, Marc, Olivier Sitbon, Ari Chaouat, Michèle Bertocchi, Gilbert Habib, Virginie Gressin, Azzedine Yaici, et al. 2006. “Pulmonary Arterial Hypertension in France.” *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 173 (9): 1023–30. <https://doi.org/10.1164/rccm.200510-1668OC>.

- Hurdman, Judith, Robin Condliffe, Charlie A. Elliot, Andrew Swift, Smitha Rajaram, Christine Davies, Catherine Hill, et al. 2013. "Pulmonary Hypertension in COPD: Results from the ASPIRE Registry." *European Respiratory Journal* 41 (6): 1292–1301. <https://doi.org/10.1183/09031936.00079512>.
- Hurst, Liam A., Benjamin J. Dunmore, Lu Long, Alexi Crosby, Rafia Al-Lamki, John Deighton, Mark Southwood, et al. 2017. "TNF α Drives Pulmonary Arterial Hypertension by Suppressing the BMP Type-II Receptor and Altering NOTCH Signalling." *Nature Communications* 8 (January): 14079. <https://doi.org/10.1038/ncomms14079>.
- Hussell, Tracy, and Thomas J. Bell. 2014. "Alveolar Macrophages: Plasticity in a Tissue-Specific Context." *Nature Reviews Immunology* 14 (2): 81–93. <https://doi.org/10.1038/nri3600>.
- Huynh, Mai-Lan N., Valerie A. Fadok, and Peter M. Henson. 2002. "Phosphatidylserine-Dependent Ingestion of Apoptotic Cells Promotes TGF-B1 Secretion and the Resolution of Inflammation." *The Journal of Clinical Investigation* 109 (1): 41–50. <https://doi.org/10.1172/JCI11638>.
- Ingebrigtsen, Truls, Simon F. Thomsen, Jørgen Vestbo, Sophie van der Sluis, Kirsten O. Kyvik, Edwin K. Silverman, Magnus Svartengren, and Vibeke Backer. 2010. "Genetic Influences on Chronic Obstructive Pulmonary Disease – A Twin Study." *Respiratory Medicine* 104 (12): 1890–95. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2010.05.004>.
- Ito, Kazuhiro, and Peter J. Barnes. 2009. "COPD as a Disease of Accelerated Lung Aging." *Chest* 135 (1): 173–80. <https://doi.org/10.1378/chest.08-1419>.
- Ito, Kazuhiro, Misako Ito, W. Mark Elliott, Borja Cosio, Gaetano Caramori, Onn Min Kon, Adam Barczyk, et al. 2005. "Decreased Histone Deacetylase Activity in Chronic Obstructive Pulmonary Disease." *New England Journal of Medicine* 352 (19): 1967–76. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa041892>.
- Ivashkiv, Lionel B. 2013. "Epigenetic Regulation of Macrophage Polarization and Function." *Trends in Immunology* 34 (5): 216–23. <https://doi.org/10.1016/j.it.2012.11.001>.
- Ivy, D. Dunbar, Steven H. Abman, Robyn J. Barst, Rolf M. F. Berger, Damien Bonnet, Thomas R. Fleming, Sheila G. Haworth, et al. 2013. "Pediatric Pulmonary Hypertension." *Journal of the American College of Cardiology, Updates in Pulmonary Hypertension*, 62 (25, Supplement): D117–26. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.10.028>.
- Jain, Ram B. 2019. "Concentrations of Cadmium, Lead, and Mercury in Blood among US Cigarettes, Cigars, Electronic Cigarettes, and Dual Cigarette-e-Cigarette Users." *Environmental Pollution* 251 (August): 970–74. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.05.041>.
- Janssen, William J, Lea Barthel, Alaina Muldrow, Rebecca E Oberley-Deegan, Mark T Kearns, Claudia Jakubzick, and Peter M Henson. 2011. "Fas Determines Differential Fates of Resident and Recruited Macrophages during Resolution of Acute Lung Injury." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 184 (5): 547–60. <https://doi.org/10.1164/rccm.201011-1891OC>.
- Jiang, Yingming, Guoyou Chen, Yi Zhang, Lin Lu, Shuxun Liu, and Xuetao Cao. 2007. "Nerve Growth Factor Promotes TLR4 Signaling-Induced Maturation of Human Dendritic Cells In Vitro through Inducible P75NTR 1." *The Journal of Immunology* 179 (9): 6297–6304. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.9.6297>.
- Kasahara, Kazuki, Yoko Matsumura, Kouji Ui, Kei Kasahara, Yuko Komatsu, Keiichi Mikasa, and Eiji Kita. 2012. "Intranasal Priming of Newborn Mice with Microbial Extracts Increases Opsonic Factors and Mature CD11c⁺ Cells in the Airway."

- American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 303 (9): L834–43. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00031.2012>.
- Kase, Hiroshi, Kazuyuki Iwahashi, and Yuzuru Matsuda. 1986. “K-252a, A POTENT INHIBITOR OF PROTEIN KINASE C FROM MICROBIAL ORIGIN.” *The Journal of Antibiotics* 39 (8): 1059–65. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.39.1059>.
- Khokha, Rama, Aditya Murthy, and Ashley Weiss. 2013. “Metalloproteinases and Their Natural Inhibitors in Inflammation and Immunity.” *Nature Reviews Immunology* 13 (9): 649–65. <https://doi.org/10.1038/nri3499>.
- Kim, Ju Sang, Ji Young Kang, Jick Hwan Ha, Hea Yeon Lee, Seung Joon Kim, Seok Chan Kim, Joong Hyun Ahn, Soon Seog Kwon, Young Kyoon Kim, and Sook Young Lee. 2013. “Expression of Nerve Growth Factor and Matrix Metalloproteinase-9/Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 in Asthmatic Patients.” *Journal of Asthma* 50 (7): 712–17. <https://doi.org/10.3109/02770903.2013.808664>.
- Kim, Jung-whan, Irina Tchernyshyov, Gregg L. Semenza, and Chi V. Dang. 2006. “HIF-1-Mediated Expression of Pyruvate Dehydrogenase Kinase: A Metabolic Switch Required for Cellular Adaptation to Hypoxia.” *Cell Metabolism* 3 (3): 177–85. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.02.002>.
- Kirkham, Paul A., and Peter J. Barnes. 2013. “Oxidative Stress in COPD.” *Chest* 144 (1): 266–73. <https://doi.org/10.1378/chest.12-2664>.
- Kirkham, Paul A., Gaetano Caramori, Paolo Casolari, Alberto A. Papi, Matt Edwards, Betty Shamji, Kostas Triantaphyllopoulos, et al. 2011. “Oxidative Stress–Induced Antibodies to Carbonyl-Modified Protein Correlate with Severity of Chronic Obstructive Pulmonary Disease.” *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 184 (7): 796–802. <https://doi.org/10.1164/rccm.201010-1605OC>.
- Knall, Cindy, G. Scott Worthen, and Gary L. Johnson. 1997. “Interleukin 8-Stimulated Phosphatidylinositol-3-Kinase Activity Regulates the Migration of Human Neutrophils Independent of Extracellular Signal-Regulated Kinase and P38 Mitogen-Activated Protein Kinases.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (7): 3052–57. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.7.3052>.
- Kobayashi, H., and A. P. Mizisin. 2001. “Nerve Growth Factor and Neurotrophin-3 Promote Chemotaxis of Mouse Macrophages in Vitro.” *Neuroscience Letters* 305 (3): 157–60. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(01\)01854-7](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(01)01854-7).
- Kohri, Kazuhiro, Iris F. Ueki, and Jay A. Nadel. 2002. “Neutrophil Elastase Induces Mucin Production by Ligand-Dependent Epidermal Growth Factor Receptor Activation.” *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 283 (3): L531–40. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00455.2001>.
- Kumar, Sandeep, Chuanyu Wei, Candice M. Thomas, Il-Kwon Kim, Rachid Seqqat, Rajesh Kumar, Kenneth M. Baker, W. Keith Jones, and Sudhiranjan Gupta. 2012. “Cardiac-Specific Genetic Inhibition of Nuclear Factor-κB Prevents Right Ventricular Hypertrophy Induced by Monocrotaline.” *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 302 (8): H1655–66. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00756.2011>.
- Labouyrie, Eric, Marie Parrens, Antoine de Mascarel, Bertrand Bloch, and Jean-Philippe Merlio. 1997. “Distribution of NGF Receptors in Normal and Pathologic Human Lymphoid Tissues.” *Journal of Neuroimmunology* 77 (2): 161–73. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(97\)00055-6](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(97)00055-6).
- Lagente, V., B. Manoury, S. Nénan, C. Le Quément, C. Martin-Chouly, and E. Boichot. 2005. “Role of Matrix Metalloproteinases in the Development of Airway Inflammation and Remodeling.” *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista*

- Brasileira De Pesquisas Medicas E Biologicas* 38 (10): 1521–30.
<https://doi.org/10.1590/s0100-879x2005001000009>.
- Lajoie, Annie C., Charles-Antoine Guay, Jean-Christophe Lega, Gabriel Lauzière, Serge Simard, Caroline Lambert, Yves Lacasse, Sebastien Bonnet, and Steeve Provencher. 2018. “Trial Duration and Risk Reduction in Combination Therapy Trials for Pulmonary Arterial Hypertension: A Systematic Review.” *CHEST* 153 (5): 1142–52.
<https://doi.org/10.1016/j.chest.2017.11.014>.
- Lajoie, Annie Christine, Gabriel Lauzière, Jean-Christophe Lega, Yves Lacasse, Sylvie Martin, Serge Simard, Sebastien Bonnet, and Steeve Provencher. 2016. “Combination Therapy versus Monotherapy for Pulmonary Arterial Hypertension: A Meta-Analysis.” *The Lancet Respiratory Medicine* 4 (4): 291–305.
[https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(16\)00027-8](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(16)00027-8).
- Landis, Sarah H, Hana Muellerova, David M Mannino, Ana M Menezes, MeiLan K Han, Thys van der Molen, Masakazu Ichinose, Zaurbek Aisanov, Yeon-Mok Oh, and Kourtney J Davis. 2014. “Continuing to Confront COPD International Patient Survey: Methods, COPD Prevalence, and Disease Burden in 2012–2013.” *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease* 9 (June): 597–611.
<https://doi.org/10.2147/COPD.S61854>.
- Landmann, R, H P Knopf, S Link, S Sansano, R Schumann, and W Zimmerli. 1996. “Human Monocyte CD14 Is Upregulated by Lipopolysaccharide.” *Infection and Immunity* 64 (5): 1762–69. <https://doi.org/10.1128/iai.64.5.1762-1769.1996>.
- Lapara, Nicholas J, and Ben L Kelly. 2010. “Suppression of LPS-Induced Inflammatory Responses in Macrophages Infected with Leishmania.” *Journal of Inflammation (London, England)* 7 (February): 8. <https://doi.org/10.1186/1476-9255-7-8>.
- Lavoie, Jessie R., Mark L. Ormiston, Carol Perez-Iratxeta, David W. Courtman, Baohua Jiang, Elisabet Ferrer, Paola Caruso, et al. 2014. “Proteomic Analysis Implicates Translationally Controlled Tumor Protein as a Novel Mediator of Occlusive Vascular Remodeling in Pulmonary Arterial Hypertension.” *Circulation* 129 (21): 2125–35.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.008777>.
- Le Hirsch, Morane, Ly Tu, Nicolas Ricard, Carole Phan, Raphaël Thuillet, Elie Fadel, Peter Dorfmueller, et al. 2015. “Proinflammatory Signature of the Dysfunctional Endothelium in Pulmonary Hypertension. Role of the Macrophage Migration Inhibitory Factor/CD74 Complex.” *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 192 (8): 983–97. <https://doi.org/10.1164/rccm.201402-0322OC>.
- Leiva-Juárez, Miguel M., Jay K. Kolls, and Scott E. Evans. 2018. “Lung Epithelial Cells: Therapeutically Inducible Effectors of Antimicrobial Defense.” *Mucosal Immunology* 11 (1): 21–34. <https://doi.org/10.1038/mi.2017.71>.
- Levi-Montalcini, R. 1987. “The Nerve Growth Factor 35 Years Later.” *Science (New York, N.Y.)* 237 (4819): 1154–62. <https://doi.org/10.1126/science.3306916>.
- Levi-Montalcini, Rita, Roberto Dal Toso, Federica della Valle, Stephen D. Skaper, and Alberta Leon. 1995. “Update of the NGF Saga.” *Journal of the Neurological Sciences* 130 (2): 119–27. [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(95\)00007-O](https://doi.org/10.1016/0022-510X(95)00007-O).
- Levi-Montalcini, Rita, and Viktor Hamburger. 1951. “Selective Growth Stimulating Effects of Mouse Sarcoma on the Sensory and Sympathetic Nervous System of the Chick Embryo.” *Journal of Experimental Zoology* 116 (2): 321–61.
<https://doi.org/10.1002/jez.1401160206>.
- Li, Min, Suzette R. Riddle, Maria G. Frid, Karim C. El Kasmi, Timothy A. McKinsey, Ronald J. Sokol, Derek Strassheim, et al. 2011. “Emergence of Fibroblasts with a Proinflammatory Epigenetically Altered Phenotype in Severe Hypoxic Pulmonary

- Hypertension.” *The Journal of Immunology* 187 (5): 2711–22.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100479>.
- Li, Min, Suzette Riddle, Hui Zhang, Angelo D’Alessandro, Amanda Flockton, Natalie J. Serkova, Kirk C. Hansen, et al. 2016. “Metabolic Reprogramming Regulates the Proliferative and Inflammatory Phenotype of Adventitial Fibroblasts in Pulmonary Hypertension Through the Transcriptional Co-Repressor C-Terminal Binding Protein-1.” *Circulation* 134 (15): 1105–21.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.023171>.
- Lindman, Brian R, and Murali M Chakinala. 2010. “MODULATING THE NITRIC OXIDE – CYCLIC GMP PATHWAY IN THE PRESSURE OVERLOADED LEFT VENTRICLE AND GROUP II PULMONARY HYPERTENSION.” *International Journal of Clinical Practice. Supplement* 64 (168): 15–22.
<https://doi.org/10.1111/j.1742-1241.2010.02524.x>.
- Liu, Cui Hua, Haiying Liu, and Baoxue Ge. 2017. “Innate Immunity in Tuberculosis: Host Defense vs Pathogen Evasion.” *Cellular and Molecular Immunology* 14 (12): 963–75.
<https://doi.org/10.1038/cmi.2017.88>.
- Liu, Zhaoyuan, Yaqi Gu, Svetoslav Chakarov, Camille Bleriot, Immanuel Kwok, Xin Chen, Amanda Shin, et al. 2019. “Fate Mapping via Ms4a3-Expression History Traces Monocyte-Derived Cells.” *Cell* 178 (6): 1509-1525.e19.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.08.009>.
- Liuzzi, Grazia Maria, Tiziana Latronico, Rocco Rossano, Sandra Viggiani, Anna Fasano, and Paolo Riccio. 2007. “Inhibitory Effect of Polyunsaturated Fatty Acids on MMP-9 Release from Microglial Cells--Implications for Complementary Multiple Sclerosis Treatment.” *Neurochemical Research* 32 (12): 2184–93.
<https://doi.org/10.1007/s11064-007-9415-9>.
- Lo Bello, Federica, Philip M. Hansbro, Chantal Donovan, Irene Coppolino, Sharon Mumby, Ian M. Adcock, and Gaetano Caramori. 2020. “New Drugs under Development for COPD.” *Expert Opinion on Emerging Drugs* 25 (4): 419–31.
<https://doi.org/10.1080/14728214.2020.1819982>.
- Lommatzsch, Marek, Sanja Cicko, Tobias Müller, Monica Lucattelli, Kai Bratke, Paul Stoll, Melanie Grimm, et al. 2010. “Extracellular Adenosine Triphosphate and Chronic Obstructive Pulmonary Disease.” *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 181 (9): 928–34. <https://doi.org/10.1164/rccm.200910-1506OC>.
- Long, Lu, Mark L. Ormiston, Xudong Yang, Mark Southwood, Stefan Gräf, Rajiv D. Machado, Matthias Mueller, et al. 2015. “Selective Enhancement of Endothelial BMPR-II with BMP9 Reverses Pulmonary Arterial Hypertension.” *Nature Medicine* 21 (7): 777–85. <https://doi.org/10.1038/nm.3877>.
- Ma, Lijiang, Danilo Roman-Campos, Eric D. Austin, Mélanie Eyries, Kevin S. Sampson, Florent Soubrier, Marine Germain, et al. 2013. “A Novel Channelopathy in Pulmonary Arterial Hypertension.” *The New England Journal of Medicine* 369 (4): 351–61.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1211097>.
- Machiels, Bénédicte, Mickael Dourcy, Xue Xiao, Justine Javaux, Claire Mesnil, Catherine Sabatel, Daniel Desmecht, et al. 2017. “A Gammaherpesvirus Provides Protection against Allergic Asthma by Inducing the Replacement of Resident Alveolar Macrophages with Regulatory Monocytes.” *Nature Immunology* 18 (12): 1310–20.
<https://doi.org/10.1038/ni.3857>.
- Mamazhakypov, Argen, Gayathri Viswanathan, Allan Lawrie, Ralph Theo Schermuly, and Sudarshan Rajagopal. 2021. “The Role of Chemokines and Chemokine Receptors in Pulmonary Arterial Hypertension.” *British Journal of Pharmacology* 178 (1): 72–89.
<https://doi.org/10.1111/bph.14826>.

- Mannino, David M., and A. Sonia Buist. 2007. "Global Burden of COPD: Risk Factors, Prevalence, and Future Trends." *Lancet (London, England)* 370 (9589): 765–73. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61380-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61380-4).
- Marchetti, Nathaniel, and Gerard J Criner. 2015. "Surgical Approaches to Treating Emphysema: Lung Volume Reduction Surgery, Bullectomy, and Lung Transplantation." *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* 36 (4): 592–608. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1556064>.
- Marsboom, Glenn, Peter T Toth, John J. Ryan, Zhigang Hong, Xichen Wu, Yong-Hu Fang, Thenappan Thenappan, et al. 2012. "Dynamin-Related Protein 1 (DRP1)-Mediated Mitochondrial Mitotic Fission Permits Hyperproliferation of Vascular Smooth Muscle Cells and Offers a Novel Therapeutic Target in Pulmonary Hypertension." *Circulation Research* 110 (11): 1484–97. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.263848>.
- Martinez, Elisa C., Ravendra Garg, and Sylvia van Drunen Littel-van den Hurk. 2019. "Innate Immune Protection from Pneumonia Virus of Mice Induced by a Novel Immunomodulator Is Prolonged by Dual Treatment and Mediated by Macrophages." *Antiviral Research* 171 (November): 104594. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.104594>.
- Martinez, F J, M M de Oca, R I Whyte, J Stetz, S E Gay, and B R Celli. 1997. "Lung-Volume Reduction Improves Dyspnea, Dynamic Hyperinflation, and Respiratory Muscle Function." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 155 (6): 1984–90. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.155.6.9196106>.
- Maruyama, Hidekazu, Céline Dewachter, Asmae Belhaj, Benoit Rondelet, Satoshi Sakai, Myriam Rimmelink, Jean-Luc Vachery, Robert Naeije, and Laurence Dewachter. 2015. "Endothelin-Bone Morphogenetic Protein Type 2 Receptor Interaction Induces Pulmonary Artery Smooth Muscle Cell Hyperplasia in Pulmonary Arterial Hypertension." *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 34 (3): 468–78. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2014.09.011>.
- Matsubara, Hiromi, and Aiko Ogawa. 2014. "Treatment of Idiopathic/Hereditary Pulmonary Arterial Hypertension." *Journal of Cardiology* 64 (4): 243–49. <https://doi.org/10.1016/j.jjcc.2014.06.009>.
- Maus, Ulrich A., Simeon Janzen, Gerhard Wall, Mrigank Srivastava, Timothy S. Blackwell, John W. Christman, Werner Seeger, Tobias Welte, and Jürgen Lohmeyer. 2006. "Resident Alveolar Macrophages Are Replaced by Recruited Monocytes in Response to Endotoxin-Induced Lung Inflammation." *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 35 (2): 227–35. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2005-0241OC>.
- McBride, Kevin M., and Nancy C. Reich. 2003. "The Ins and Outs of STAT1 Nuclear Transport." *Science's STKE: Signal Transduction Knowledge Environment* 2003 (195): RE13. <https://doi.org/10.1126/stke.2003.195.re13>.
- McCLOSKEY, Sean C., Bipen D. Patel, Susan J. Hinchliffe, Elaine D. Reid, Nicholas J. Wareham, and David A. Lomas. 2001. "Siblings of Patients With Severe Chronic Obstructive Pulmonary Disease Have a Significant Risk of Airflow Obstruction." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 164 (8): 1419–24. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.164.8.2105002>.
- McDonald, Neil Q., and Moses V. Chao. 1995. "Structural Determinants of Neurotrophin Action (*)." *Journal of Biological Chemistry* 270 (34): 19669–72. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.34.19669>.
- Meer, Regina M van der, Edwin Wagena, Raymond WJG Ostelo, Annelies JE Jacobs, and Onno CP van Schayck. 2003. "Smoking Cessation for Chronic Obstructive Pulmonary Disease." Edited by Cochrane Airways Group. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2016 (10). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD002999>.

- Melani, Andrea S. 2015. “Long-Acting Muscarinic Antagonists.” *Expert Review of Clinical Pharmacology* 8 (4): 479–501. <https://doi.org/10.1586/17512433.2015.1058154>.
- Meloche, Jolyane, Aude Pflieger, Mylène Vaillancourt, Roxane Paulin, François Potus, Sotirios Zervopoulos, Colin Graydon, et al. 2014. “Role for DNA Damage Signaling in Pulmonary Arterial Hypertension.” *Circulation* 129 (7): 786–97. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.006167>.
- Ménard, G, V Turmel, and E Y Bissonnette. 2007. “Serotonin Modulates the Cytokine Network in the Lung: Involvement of Prostaglandin E2.” *Clinical and Experimental Immunology* 150 (2): 340–48. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2007.03492.x>.
- Mercado, Nicolas, Kazuhiro Ito, and Peter J. Barnes. 2015. “Accelerated Ageing of the Lung in COPD: New Concepts.” *Thorax* 70 (5): 482–89. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2014-206084>.
- Mercado, Nicolas, Rajesh Thimmulappa, Catherine M. R. Thomas, Peter S. Fenwick, Kirandeep K. Chana, Louise E. Donnelly, Shyam Biswal, Kazuhiro Ito, and Peter J. Barnes. 2011. “Decreased Histone Deacetylase 2 Impairs Nrf2 Activation by Oxidative Stress.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 406 (2): 292–98. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.02.035>.
- Mescher, Anthony L., and Anton W. Neff. 2005. “Regenerative Capacity and the Developing Immune System.” In *Regenerative Medicine I: Theories, Models and Methods*, edited by Ioannis V. Yannas, 39–66. Advances in Biochemical Engineering. Berlin, Heidelberg: Springer. <https://doi.org/10.1007/b99966>.
- Metcalf, H J, S Lea, D Hughes, R Khalaf, K Abbott-Banner, and D Singh. 2014. “Effects of Cigarette Smoke on Toll-like Receptor (TLR) Activation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) Macrophages.” *Clinical and Experimental Immunology* 176 (3): 461–72. <https://doi.org/10.1111/cei.12289>.
- Micera, A., E. Vigneti, D. Pickholtz, R. Reich, O. Pappo, S. Bonini, F. X. Maquart, L. Aloe, and F. Levi-Schaffer. 2001. “Nerve Growth Factor Displays Stimulatory Effects on Human Skin and Lung Fibroblasts, Demonstrating a Direct Role for This Factor in Tissue Repair.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (11): 6162–67. <https://doi.org/10.1073/pnas.101130898>.
- Minnone, Gaetana, Fabrizio De Benedetti, and Luisa Bracci-Laudiero. 2017. “NGF and Its Receptors in the Regulation of Inflammatory Response.” *International Journal of Molecular Sciences* 18 (5). <https://doi.org/10.3390/ijms18051028>.
- Mirza, Shireen, Ryan D. Clay, Matthew A. Koslow, and Paul D. Scanlon. 2018. “COPD Guidelines: A Review of the 2018 GOLD Report.” *Mayo Clinic Proceedings* 93 (10): 1488–1502. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2018.05.026>.
- Miyagi, Masayuki, Kentaro Uchida, Shotaro Takano, Hisako Fujimaki, Jun Aikawa, Hiroyuki Sekiguchi, Naoshige Nagura, Seiji Ohtori, Gen Inoue, and Masashi Takaso. 2018. “Macrophage-Derived Inflammatory Cytokines Regulate Growth Factors and Pain-Related Molecules in Mice with Intervertebral Disc Injury.” *Journal of Orthopaedic Research* 36 (8): 2274–79. <https://doi.org/10.1002/jor.23888>.
- Miyata, Masayuki, Fumitaka Sakuma, Masayuki Ito, Hiromasa Ohira, Yukio Sato, and Reiji Kasukawa. 2000. “Athymic Nude Rats Develop Severe Pulmonary Hypertension Following Monocrotaline Administration.” *International Archives of Allergy and Immunology* 121 (3): 246–52. <https://doi.org/10.1159/000024324>.
- Mizumura, Kenji, Suzanne M. Cloonan, Kiichi Nakahira, Abhiram R. Bhashyam, Morgan Cervo, Tohru Kitada, Kimberly Glass, et al. 2014. “Mitophagy-Dependent Necroptosis Contributes to the Pathogenesis of COPD.” *The Journal of Clinical Investigation* 124 (9): 3987–4003. <https://doi.org/10.1172/JCI74985>.

- Monguió-Tortajada, Marta, Marcella Franquesa, Maria-Rosa Sarrias, and Francesc E. Borràs. 2018. “Low Doses of LPS Exacerbate the Inflammatory Response and Trigger Death on TLR3-Primed Human Monocytes.” *Cell Death & Disease* 9 (5): 499. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0520-2>.
- Montani, David, Emmanuel Bergot, Sven Günther, Laurent Savale, Anne Bergeron, Arnaud Bourdin, Helene Bouvaist, et al. 2012. “Pulmonary Arterial Hypertension in Patients Treated by Dasatinib.” *Circulation* 125 (17): 2128–37. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.079921>.
- Montani, David, Rogerio Souza, Christoph Binkert, Walter Fischli, Gerald Simonneau, Martine Clozel, and Marc Humbert. 2007. “Endothelin-1/Endothelin-3 Ratio: A Potential Prognostic Factor of Pulmonary Arterial Hypertension.” *CHEST* 131 (1): 101–8. <https://doi.org/10.1378/chest.06-0682>.
- Montuschi, Paolo, John V. Collins, Giovanni Ciabattini, Nicola Lazzeri, Massimo Corradi, Sergei A. Kharitonov, and Peter J. Barnes. 2000. “Exhaled 8-Isoprostane as an In Vivo Biomarker of Lung Oxidative Stress in Patients with COPD and Healthy Smokers.” *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 162 (3): 1175–77. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.162.3.2001063>.
- Morisawa, Daisuke, Shinichi Hirotsu, Makiko Oboshi, Koichi Nishimura, Hisashi Sawada, Akiyo Eguchi, Yoshitaka Okuhara, et al. 2016. “Interleukin-18 Disruption Suppresses Hypoxia-Induced Pulmonary Artery Hypertension in Mice.” *International Journal of Cardiology* 202 (January): 522–24. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2015.09.118>.
- Morrell, Nicholas W., Micheala A. Aldred, Wendy K. Chung, C. Gregory Elliott, William C. Nichols, Florent Soubrier, Richard C. Trembath, and James E. Loyd. 2019. “Genetics and Genomics of Pulmonary Arterial Hypertension.” *European Respiratory Journal* 53 (1): 1801899. <https://doi.org/10.1183/13993003.01899-2018>.
- Morris, Claudia R., Gregory J. Kato, Mirjana Poljakovic, Xunde Wang, William C. Blackwelder, Vandana Sanchdev, Stanley L. Hazen, Elliott P. Vichinsky, Sidney M. Morris, and Mark T. Gladwin. 2005. “Dysregulated Arginine Metabolism, Hemolysis-Associated Pulmonary Hypertension and Mortality in Sickle Cell Disease.” *JAMA : The Journal of the American Medical Association* 294 (1): 81–90. <https://doi.org/10.1001/jama.294.1.81>.
- Mukaro, V., and S. Hodge. 2011. “Airway Clearance of Apoptotic Cells in COPD.” *Current Drug Targets*. <https://doi.org/10.2174/138945011794751609>.
- Murray, Peter J. 2007. “The JAK-STAT Signaling Pathway: Input and Output Integration.” *The Journal of Immunology* 178 (5): 2623–29. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.5.2623>.
- . 2017. “Macrophage Polarization.” *Annual Review of Physiology* 79 (1): 541–66. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034339>.
- Mustelin, Tomas, Torkel Vang, and Nunzio Bottini. 2005. “Protein Tyrosine Phosphatases and the Immune Response.” *Nature Reviews Immunology* 5 (1): 43–57. <https://doi.org/10.1038/nri1530>.
- Nakahira, Masakiyo, Takashi Tanaka, Bryanne E. Robson, Joseph P. Mizgerd, and Michael J. Grusby. 2007. “Regulation of Signal Transducer and Activator of Transcription Signaling by the Tyrosine Phosphatase PTP-BL.” *Immunity* 26 (2): 163–76. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.01.010>.
- Norman, Bryan H., and Jeff S. McDermott. 2017. “Targeting the Nerve Growth Factor (NGF) Pathway in Drug Discovery. Potential Applications to New Therapies for Chronic Pain.” *Journal of Medicinal Chemistry* 60 (1): 66–88. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00964>.

- Ogawa, Aiko, Kentaro Ejiri, and Hiromi Matsubara. 2014. "Long-Term Patient Survival with Idiopathic/Heritable Pulmonary Arterial Hypertension Treated at a Single Center in Japan." *Life Sciences*, Endothelin XIII - Proceedings of the Thirteenth International Conference on Endothelin, University of Tsukuba, Tokyo Campus, Tokyo, Japan, September 8-11, 2013, 118 (2): 414–19. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.01.077>.
- Oishi, Yumiko, and Ichiro Manabe. 2018. "Macrophages in Inflammation, Repair and Regeneration." *International Immunology* 30 (11): 511–28. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxy054>.
- Olas, K., H. Butterweck, W. Teschner, H. P. Schwarz, and B. Reipert. 2005. "Immunomodulatory Properties of Human Serum Immunoglobulin A: Anti-Inflammatory and pro-Inflammatory Activities in Human Monocytes and Peripheral Blood Mononuclear Cells." *Clinical & Experimental Immunology* 140 (3): 478–90. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2005.02779.x>.
- Olgart, C., and N. Frossard. 2001. "Human Lung Fibroblasts Secrete Nerve Growth Factor: Effect of Inflammatory Cytokines and Glucocorticoids." *European Respiratory Journal* 18 (1): 115–21. <https://doi.org/10.1183/09031936.01.00069901>.
- Oliveira da Silva, Camila, Andréa Monte-Alto-Costa, Mariana Renovato-Martins, Filipe Viana Nascimento, Samuel dos Santos Valença, Vincent Lagente, Luís Pôrto, and Tatiana Victoni. 2017. "Time Course of the Phenotype of Blood and Bone Marrow Monocytes and Macrophages in the Lung after Cigarette Smoke Exposure In Vivo." *International Journal of Molecular Sciences* 18 (9): 1940. <https://doi.org/10.3390/ijms18091940>.
- Opitz, Bastian, Vincent van Laak, Julia Eitel, and Norbert Suttrop. 2010. "Innate Immune Recognition in Infectious and Noninfectious Diseases of the Lung." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 181 (12): 1294–1309. <https://doi.org/10.1164/rccm.200909-1427SO>.
- Orecchioni, Marco, Yanal Ghosheh, Akula Bala Pramod, and Klaus Ley. 2019. "Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively Activated Macrophages." *Frontiers in Immunology* 10 (May): 1084. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01084>.
- Ortega-Gómez, Almudena, Mauro Perretti, and Oliver Soehnlein. 2013. "Resolution of Inflammation: An Integrated View." *EMBO Molecular Medicine* 5 (5): 661–74. <https://doi.org/10.1002/emmm.201202382>.
- O'Shea, John J., Daniella M. Schwartz, Alejandro V. Villarino, Massimo Gadina, Iain B. McInnes, and Arian Laurence. 2015. "The JAK-STAT Pathway: Impact on Human Disease and Therapeutic Intervention." *Annual Review of Medicine* 66: 311–28. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-051113-024537>.
- Oudiz, Ronald J. 2007. "Pulmonary Hypertension Associated with Left-Sided Heart Disease." *Clinics in Chest Medicine*, Pulmonary Arterial Hypertension, 28 (1): 233–41. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2006.12.001>.
- Papi, Alberto, Cinzia Maria Bellettato, Fausto Braccioni, Micaela Romagnoli, Paolo Casolari, Gaetano Caramori, Leonardo M. Fabbri, and Sebastian L. Johnston. 2006. "Infections and Airway Inflammation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Severe Exacerbations." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 173 (10): 1114–21. <https://doi.org/10.1164/rccm.200506-859OC>.
- Paschalaki, Koralia E, Richard D Starke, Yanhua HU, Nicolas Mercado, Andriana Margariti, Vassilis G Gorgoulis, Anna M Randi, and Peter J Barnes. 2013. "Dysfunction of Endothelial Progenitor Cells from Smokers and Chronic Obstructive Pulmonary Disease Patients Due to Increased DNA Damage and Senescence." *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 31 (12): 2813–26. <https://doi.org/10.1002/stem.1488>.

- Pasquereau, Anne. 2020. "CONSOMMATION DE TABAC PARMIS LES ADULTES : BILAN DE CINQ ANNÉES DE PROGRAMME NATIONAL CONTRE LE TABAGISME, 2014-2019 / TOBACCO USE AMONG ADULTS: FIVE-YEAR REVIEW OF THE NATIONAL TOBACCO CONTROL PROGRAMME, 2014-2019," 8.
- Patel, Amit A., Yan Zhang, James N. Fullerton, Lies Boelen, Anthony Rongvaux, Alexander A. Maini, Venetia Bigley, et al. 2017. "The Fate and Lifespan of Human Monocyte Subsets in Steady State and Systemic Inflammation." *The Journal of Experimental Medicine* 214 (7): 1913–23. <https://doi.org/10.1084/jem.20170355>.
- Paulin, Laura M., Gregory B. Diette, Paul D. Blanc, Nirupama Putcha, Mark D. Eisner, Richard E. Kanner, Andrew J. Belli, et al. 2015. "Occupational Exposures Are Associated with Worse Morbidity in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 191 (5): 557–65. <https://doi.org/10.1164/rccm.201408-1407OC>.
- Pauwels, Romain A., A. Sonia Buist, Peter M. A. Calverley, Christine R. Jenkins, and Suzanne S. Hurd. 2001. "Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 163 (5): 1256–76. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.163.5.2101039>.
- Peacock, A. J., N. F. Murphy, J. J. V. McMurray, L. Caballero, and S. Stewart. 2007. "An Epidemiological Study of Pulmonary Arterial Hypertension." *European Respiratory Journal* 30 (1): 104–9. <https://doi.org/10.1183/09031936.00092306>.
- Pengo, Vittorio, Anthonie W. A. Lensing, Martin H. Prins, Antonio Marchiori, Bruce L. Davidson, Francesca Tiozzo, Paolo Albanese, et al. 2004. "Incidence of Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension after Pulmonary Embolism." *The New England Journal of Medicine* 350 (22): 2257–64. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa032274>.
- Perdiguerro, Elisa Gomez, and Frederic Geissmann. 2016. "The Development and Maintenance of Resident Macrophages." *Nature Immunology* 17 (1): 2–8. <https://doi.org/10.1038/ni.3341>.
- Perrone, Lorena, Simona Paladino, Marialuisa Mazzone, Lucio Nitsch, Massimo Gulisano, and Chiara Zurzolo. 2005. "Functional Interaction between P75NTR and TrkA: The Endocytic Trafficking of P75NTR Is Driven by TrkA and Regulates TrkA-Mediated Signalling." *Biochemical Journal* 385 (Pt 1): 233–41. <https://doi.org/10.1042/BJ20041155>.
- Perros, F., P. Dorfmüller, R. Souza, I. Durand-Gasselin, V. Godot, F. Capel, S. Adnot, et al. 2007. "Fractalkine-Induced Smooth Muscle Cell Proliferation in Pulmonary Hypertension." *European Respiratory Journal* 29 (5): 937–43. <https://doi.org/10.1183/09031936.00104706>.
- Piao, Lin, Yong-Hu Fang, Virgilio J. J. Cadete, Christian Wietholt, Dalia Urboniene, Peter T. Toth, Glenn Marsboom, et al. 2010. "The Inhibition of Pyruvate Dehydrogenase Kinase Improves Impaired Cardiac Function and Electrical Remodeling in Two Models of Right Ventricular Hypertrophy: Resuscitating the Hibernating Right Ventricle." *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* 88 (1): 47–60. <https://doi.org/10.1007/s00109-009-0524-6>.
- Pons, Françoise, Véronique Freund, Hélène Kuissu, Eric Mathieu, Caroline Olgart, and Nelly Frossard. 2001. "Nerve Growth Factor Secretion by Human Lung Epithelial A549 Cells in Pro- and Anti-Inflammatory Conditions." *European Journal of Pharmacology* 428 (3): 365–69. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(01\)01280-8](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(01)01280-8).

- Poole, Phillippa, Emme E. Chacko, Richard Wood-Baker, and Christopher J. Cates. 2006. "Influenza Vaccine for Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease." *Cochrane Database of Systematic Reviews*, no. 1. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD002733.pub2>.
- Pugliese, Steven C, Sushil Kumar, William J Janssen, Brian B Graham, Maria G Frid, Suzette R Riddle, Karim C. El Kasmi, and Kurt R. Stenmark. 2017. "A Time and Compartment Specific Activation of Lung Macrophages in Hypoxic Pulmonary Hypertension." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 198 (12): 4802–12. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601692>.
- Purnama, Christina, See Liang Ng, Piotr Tetlak, Yolanda Aphrilia Setiagani, Matheswaran Kandasamy, Sivasankar Baalasubramanian, Klaus Karjalainen, and Christiane Ruedl. 2014. "Transient Ablation of Alveolar Macrophages Leads to Massive Pathology of Influenza Infection without Affecting Cellular Adaptive Immunity." <https://doi.org/10.1002/eji.201344359>.
- Qian, Jin, Wen Tian, Xinguo Jiang, Rasa Tamosiuniene, Yon K. Sung, Eric M. Shuffle, Allen B. Tu, et al. 2015. "LTB4 Activates Pulmonary Artery Adventitial Fibroblasts in Pulmonary Hypertension." *Hypertension* 66 (6): 1227–39. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.06370>.
- Rabinovitch, Marlene, Christophe Guignabert, Marc Humbert, and Mark R Nicolls. 2014. "Inflammation and Immunity in the Pathogenesis of Pulmonary Arterial Hypertension." *Circulation Research* 115 (1): 165–75. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.301141>.
- Ranchoux, Benoît, Jolyane Meloche, Roxane Paulin, Olivier Boucherat, Steeve Provencher, and Sébastien Bonnet. 2016. "DNA Damage and Pulmonary Hypertension." *International Journal of Molecular Sciences* 17 (6): 990. <https://doi.org/10.3390/ijms17060990>.
- Renda, T., S. Baraldo, G. Pelaia, E. Bazzan, G. Turato, A. Papi, P. Maestrelli, et al. 2008. "Increased Activation of P38 MAPK in COPD." *European Respiratory Journal* 31 (1): 62–69. <https://doi.org/10.1183/09031936.00036707>.
- Ribatti, Domenico, Beatrice Nico, and Enrico Crivellato. 2011. "The Role of Pericytes in Angiogenesis." *The International Journal of Developmental Biology* 55 (3): 261–68. <https://doi.org/10.1387/ijdb.103167dr>.
- Ricard, Nicolas, Ly Tu, Morane Le Hiress, Alice Huertas, Carole Phan, Raphaël Thuillet, Caroline Sattler, et al. 2014. "Increased Pericyte Coverage Mediated by Endothelial-Derived Fibroblast Growth Factor-2 and Interleukin-6 Is a Source of Smooth Muscle-Like Cells in Pulmonary Hypertension." *Circulation* 129 (15): 1586–97. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.007469>.
- Ricci, Alberto, Laura Felici, Salvatore Mariotta, Francesco Mannino, Giovanni Schmid, Claudio Terzano, Giuseppe Cardillo, Francesco Amenta, and Elena Bronzetti. 2004. "Neurotrophin and Neurotrophin Receptor Protein Expression in the Human Lung." *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 30 (1): 12–19. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2002-0110OC>.
- Rieder, Florian, Sean P. Kessler, Gail A. West, Shardul Bhilocha, Carol de la Motte, Tammy M. Sadler, Banu Gopalan, Eleni Stylianou, and Claudio Fiocchi. 2011. "Inflammation-Induced Endothelial-to-Mesenchymal Transition." *The American Journal of Pathology* 179 (5): 2660–73. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.07.042>.
- Rocco, Maria Luisa, Marzia Soligo, Luigi Manni, and Luigi Aloe. 2018. "Nerve Growth Factor: Early Studies and Recent Clinical Trials." *Current Neuropharmacology* 16 (10): 1455–65. <https://doi.org/10.2174/1570159X16666180412092859>.

- Rohani, Maryam G., Ryan S. McMahan, Maria V. Razumova, Angie L. Hertz, Maryelise Cieslewicz, Suzie H. Pun, Michael Regnier, Ying Wang, Timothy P. Birkland, and William C. Parks. 2015. "MMP-10 Regulates Collagenolytic Activity of Alternatively Activated Resident Macrophages." *The Journal of Investigative Dermatology* 135 (10): 2377–84. <https://doi.org/10.1038/jid.2015.167>.
- Rosales, Carlos, and Eileen Uribe-Querol. 2017. "Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity." *BioMed Research International* 2017: 9042851. <https://doi.org/10.1155/2017/9042851>.
- Rossol, Manuela, Holger Heine, Undine Meusch, Dagmar Quandt, Carina Klein, Matthew J. Sweet, and Sunna Hauschildt. 2011a. "LPS-Induced Cytokine Production in Human Monocytes and Macrophages." *Critical ReviewsTM in Immunology* 31 (5): 379–446. <https://doi.org/10.1615/CritRevImmunol.v31.i5.20>.
- . 2011b. "LPS-Induced Cytokine Production in Human Monocytes and Macrophages." *Critical Reviews & Trade; in Immunology* 31 (5). <https://doi.org/10.1615/CritRevImmunol.v31.i5.20>.
- Rubens, Christoph, Ralf Ewert, Michael Halank, Roland Wensel, Hans-Dieter Orzechowski, Heinz-Peter Schultheiss, and Gert Hoeffken. 2001. "Big Endothelin-1 and Endothelin-1 Plasma Levels Are Correlated With the Severity of Primary Pulmonary Hypertension." *CHEST* 120 (5): 1562–69. <https://doi.org/10.1378/chest.120.5.1562>.
- Rudziak, Paulina, Christopher G. Ellis, and Paulina M. Kowalewska. 2019. "Role and Molecular Mechanisms of Pericytes in Regulation of Leukocyte Diapedesis in Inflamed Tissues." *Mediators of Inflammation* 2019 (May): 4123605. <https://doi.org/10.1155/2019/4123605>.
- Russell, Richard E. K., Andrew Thorley, Sarah V. Culpitt, Sara Dodd, Louise E. Donnelly, Carmen Demattos, Mary Fitzgerald, and Peter J. Barnes. 2002. "Alveolar Macrophage-Mediated Elastolysis: Roles of Matrix Metalloproteinases, Cysteine, and Serine Proteases." *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 283 (4): L867–73. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00020.2002>.
- Sabatel, Catherine, Coraline Radermecker, Laurence Fievez, Genevieve Paulissen, Svetoslav Chakarov, Claudia Fernandes, Sabine Olivier, et al. 2017. "Exposure to Bacterial CpG DNA Protects from Airway Allergic Inflammation by Expanding Regulatory Lung Interstitial Macrophages." *Immunity* 46 (3): 457–73. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.02.016>.
- Salvi, Sundeep S, and Peter J Barnes. 2009. "Chronic Obstructive Pulmonary Disease in Non-Smokers." *The Lancet* 374 (9691): 733–43. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61303-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61303-9).
- Samah, B, F Porcheray, and G Gras. 2008. "Neurotrophins Modulate Monocyte Chemotaxis without Affecting Macrophage Function." *Clinical and Experimental Immunology* 151 (3): 476–86. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2007.03578.x>.
- Sanchez, Olivier, Elisabeth Marcos, Frédéric Perros, Elie Fadel, Ly Tu, Marc Humbert, Philippe Darteville, Gérald Simonneau, Serge Adnot, and Saadia Eddahibi. 2007. "Role of Endothelium-Derived CC Chemokine Ligand 2 in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 176 (10): 1041–47. <https://doi.org/10.1164/rccm.200610-1559OC>.
- Savai, Rajkumar, Soni S. Pullamsetti, Julia Kolbe, Ewa Bieniek, Robert Voswinckel, Ludger Fink, Axel Scheed, et al. 2012. "Immune and Inflammatory Cell Involvement in the Pathology of Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 186 (9): 897–908. <https://doi.org/10.1164/rccm.201202-0335OC>.

- Savale, Laurent, Marie-Camille Chaumais, Vincent Cottin, Emmanuel Bergot, Irène Frachon, Grégoire Prevot, Christophe Pison, et al. 2012. “Pulmonary Hypertension Associated with Benfluorex Exposure.” *European Respiratory Journal* 40 (5): 1164–72. <https://doi.org/10.1183/09031936.00188611>.
- Savale, Laurent, Caroline Sattler, Sven Günther, David Montani, Marie-Camille Chaumais, Swanny Perrin, Xavier Jaïs, et al. 2014. “Pulmonary Arterial Hypertension in Patients Treated with Interferon.” *European Respiratory Journal* 44 (6): 1627–34. <https://doi.org/10.1183/09031936.00057914>.
- Savale, Laurent, Ly Tu, Dominique Rideau, Mohamed Izziki, Bernard Maitre, Serge Adnot, and Saadia Eddahibi. 2009. “Impact of Interleukin-6 on Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension and Lung Inflammation in Mice.” *Respiratory Research* 10 (1): 6. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-10-6>.
- Sawada, Hirofumi, Toshie Saito, Nils P. Nickel, Tero-Pekka Alastalo, Jason P. Glotzbach, Roshelle Chan, Leila Haghghat, et al. 2014. “Reduced BMPR2 Expression Induces GM-CSF Translation and Macrophage Recruitment in Humans and Mice to Exacerbate Pulmonary Hypertension.” *The Journal of Experimental Medicine* 211 (2): 263–80. <https://doi.org/10.1084/jem.20111741>.
- Schenck, Karl, Olav Schreurs, Katsuhiko Hayashi, and Kristen Helgeland. 2017. “The Role of Nerve Growth Factor (NGF) and Its Precursor Forms in Oral Wound Healing.” *International Journal of Molecular Sciences* 18 (2): 386. <https://doi.org/10.3390/ijms18020386>.
- Schindler, Christian, David E. Levy, and Thomas Decker. 2007. “JAK-STAT Signaling: From Interferons to Cytokines *.” *Journal of Biological Chemistry* 282 (28): 20059–63. <https://doi.org/10.1074/jbc.R700016200>.
- Schneider, Christoph, Samuel P. Nobs, Alex K. Heer, Michael Kurrer, Glynis Klinke, Nico van Rooijen, Johannes Vogel, and Manfred Kopf. 2014. “Alveolar Macrophages Are Essential for Protection from Respiratory Failure and Associated Morbidity Following Influenza Virus Infection.” *PLOS Pathogens* 10 (4): e1004053. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004053>.
- Schneider, Christoph, Samuel P. Nobs, Michael Kurrer, Hubert Rehrauer, Christoph Thiele, and Manfred Kopf. 2014. “Induction of the Nuclear Receptor PPAR- γ by the Cytokine GM-CSF Is Critical for the Differentiation of Fetal Monocytes into Alveolar Macrophages.” *Nature Immunology* 15 (11): 1026–37. <https://doi.org/10.1038/ni.3005>.
- Seeger, Werner, Yochai Adir, Joan Albert Barberà, Hunter Champion, John Gerard Coghlan, Vincent Cottin, Teresa De Marco, et al. 2013. “Pulmonary Hypertension in Chronic Lung Diseases.” *Journal of the American College of Cardiology*, Updates in Pulmonary Hypertension, 62 (25, Supplement): D109–16. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.10.036>.
- Shaykhiev, Renat, Anja Krause, Jacqueline Salit, Yael Strulovici-Barel, Ben-Gary Harvey, Timothy P. O’Connor, and Ronald G. Crystal. 2009. “Smoking-Dependent Reprogramming of Alveolar Macrophage Polarization: Implication for Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease.” *The Journal of Immunology* 183 (4): 2867–83. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900473>.
- Sica, Antonio, and Alberto Mantovani. 2012. “Macrophage Plasticity and Polarization: In Vivo Veritas.” *The Journal of Clinical Investigation* 122 (3): 787–95. <https://doi.org/10.1172/JCI59643>.
- Siegel, Rebecca L., Eric J. Jacobs, Christina C. Newton, Diane Feskanich, Neal D. Freedman, Ross L. Prentice, and Ahmedin Jemal. 2015. “Deaths Due to Cigarette Smoking for 12 Smoking-Related Cancers in the United States.” *JAMA Internal Medicine* 175 (9): 1574–76. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2015.2398>.

- Silva, Camila Oliveira da, Thomas Gicquel, Yoann Daniel, Thiago Bártholo, Elise Vène, Pascal Loyer, Luís Cristóvão Pôrto, Vincent Lagente, and Tatiana Victoni. 2020. "Alteration of Immunophenotype of Human Macrophages and Monocytes after Exposure to Cigarette Smoke." *Scientific Reports* 10 (July): 12796. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68753-1>.
- Silverman, Edwin K., Harold A. Chapman, Jeffrey M. Drazen, Scott T. Weiss, Bernard Rosner, Edward J. Campbell, Walter J. O'donnell, et al. 1998. "Genetic Epidemiology of Severe, Early-Onset Chronic Obstructive Pulmonary Disease." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 157 (6): 1770–78. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.157.6.9706014>.
- Simonneau, Gérald, David Montani, David S. Celermajer, Christopher P. Denton, Michael A. Gatzoulis, Michael Krowka, Paul G. Williams, and Rogerio Souza. 2019a. "Haemodynamic Definitions and Updated Clinical Classification of Pulmonary Hypertension." *European Respiratory Journal* 53 (1): 1801913. <https://doi.org/10.1183/13993003.01913-2018>.
- . 2019b. "Haemodynamic Definitions and Updated Clinical Classification of Pulmonary Hypertension." *European Respiratory Journal* 53 (1): 1801913. <https://doi.org/10.1183/13993003.01913-2018>.
- Sitbon, Olivier, Mardi Gomberg-Maitland, John Granton, Michael I. Lewis, Stephen C. Mathai, Maurizio Rainisio, Norman L. Stockbridge, Martin R. Wilkins, Roham T. Zamanian, and Lewis J. Rubin. 2019. "Clinical Trial Design and New Therapies for Pulmonary Arterial Hypertension." *European Respiratory Journal* 53 (1): 1801908. <https://doi.org/10.1183/13993003.01908-2018>.
- Smigiel, Kate S., and William C. Parks. 2017. "Chapter Five - Matrix Metalloproteinases and Leukocyte Activation." In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, edited by Raouf A. Khalil, 147:167–95. Matrix Metalloproteinases and Tissue Remodeling in Health and Disease: Cardiovascular Remodeling. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.01.003>.
- Snodgrass, Ryan G., Shurong Huang, Il-Whan Choi, John C. Rutledge, and Daniel H. Hwang. 2013. "Inflammasome-Mediated Secretion of IL-1 β in Human Monocytes through TLR2 Activation; Modulation by Dietary Fatty Acids." *The Journal of Immunology* 191 (8): 4337–47. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300298>.
- Sommer, N., A. Dietrich, R. T. Schermuly, H. A. Ghofrani, T. Gudermann, R. Schulz, W. Seeger, F. Grimminger, and N. Weissmann. 2008. "Regulation of Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction: Basic Mechanisms." *European Respiratory Journal* 32 (6): 1639–51. <https://doi.org/10.1183/09031936.00013908>.
- Soon, Elaine, Alexi Crosby, Mark Southwood, Peiran Yang, Tamara Tajsic, Mark Toshner, Sarah Appleby, et al. 2015. "Bone Morphogenetic Protein Receptor Type II Deficiency and Increased Inflammatory Cytokine Production. A Gateway to Pulmonary Arterial Hypertension." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 192 (7): 859–72. <https://doi.org/10.1164/rccm.201408-1509OC>.
- Soon, Elaine, Alan M. Holmes, Carmen M. Treacy, Natalie J. Doughty, Laura Southgate, Rajiv D. Machado, Richard C. Trembath, et al. 2010. "Elevated Levels of Inflammatory Cytokines Predict Survival in Idiopathic and Familial Pulmonary Arterial Hypertension." *Circulation* 122 (9): 920–27. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.933762>.
- Soucie, Erinn L., Ziming Weng, Laufey Geirsdóttir, Kaaweh Molawi, Julien Maurizio, Romain Fenouil, Noushine Mossadegh-Keller, et al. 2016. "Lineage-Specific Enhancers Activate Self-Renewal Genes in Macrophages and Embryonic Stem Cells."

- Science (New York, N.Y.)* 351 (6274): aad5510.
<https://doi.org/10.1126/science.aad5510>.
- Speidl, Walter S., Wolfgang G. Toller, Christoph Kaun, Thomas W. Weiss, Stefan Pfaffenberger, Stefan P. Kastl, Alexander Furnkranz, et al. 2004. "Catecholamines Potentiate LPS-Induced Expression of MMP-1 and MMP-9 in Human Monocytes and in the Human Monocytic Cell Line U937: Possible Implications for Peri-Operative Plaque Instability." *The FASEB Journal* 18 (3): 603–5. <https://doi.org/10.1096/fj.03-0454fje>.
- Stacher, Elvira, Brian B. Graham, James M. Hunt, Aneta Gandjeva, Steve D. Groshong, Vallerie V. McLaughlin, Marsha Jessup, et al. 2012. "Modern Age Pathology of Pulmonary Arterial Hypertension." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 186 (3): 261–72. <https://doi.org/10.1164/rccm.201201-0164OC>.
- Stefano, A. Di, G. Caramori, T. Oates, A. Capelli, M. Lusuardi, I. Gnemmi, F. Ioli, et al. 2002. "Increased Expression of Nuclear Factor-KB in Bronchial Biopsies from Smokers and Patients with COPD." *European Respiratory Journal* 20 (3): 556–63. <https://doi.org/10.1183/09031936.02.00272002>.
- Stuart, Lynda M., and R. Alan B. Ezekowitz. 2005. "Phagocytosis: Elegant Complexity." *Immunity* 22 (5): 539–50. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.05.002>.
- Sugimoto, Michelle A., Juliana P. Vago, Mauro Perretti, and Mauro M. Teixeira. 2019. "Mediators of the Resolution of the Inflammatory Response." *Trends in Immunology* 40 (3): 212–27. <https://doi.org/10.1016/j.it.2019.01.007>.
- Sutter, A, R J Riopelle, R M Harris-Warrick, and E M Shooter. 1979. "Nerve Growth Factor Receptors. Characterization of Two Distinct Classes of Binding Sites on Chick Embryo Sensory Ganglia Cells." *Journal of Biological Chemistry* 254 (13): 5972–82. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)50507-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)50507-X).
- Sweatt, Andrew J., Haley K. Hedlin, Vidhya Balasubramanian, Andrew Hsi, Lisa K. Blum, William H. Robinson, Francois Haddad, et al. 2019. "Discovery of Distinct Immune Phenotypes Using Machine Learning in Pulmonary Arterial Hypertension." *Circulation Research* 124 (6): 904–19. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.313911>.
- Szulcek, Robert, Chris M. Happé, Nina Rol, Ruud D. Fontijn, Chris Dickhoff, Koen J. Hartemink, Katrien Grünberg, et al. 2016. "Delayed Microvascular Shear Adaptation in Pulmonary Arterial Hypertension. Role of Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 Cleavage." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 193 (12): 1410–20. <https://doi.org/10.1164/rccm.201506-1231OC>.
- Takano, S., K. Uchida, G. Inoue, M. Miyagi, J. Aikawa, D. Iwase, K. Iwabuchi, et al. 2017. "Nerve Growth Factor Regulation and Production by Macrophages in Osteoarthritic Synovium." *Clinical & Experimental Immunology* 190 (2): 235–43. <https://doi.org/10.1111/cei.13007>.
- Takeuchi, Osamu, and Shizuo Akira. 2010. "Pattern Recognition Receptors and Inflammation." *Cell* 140 (6): 805–20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>.
- Tamby, M, Y Chanseaud, M Humbert, J Fermanian, P Guilpain, P Garcia-de-la-Pena..., S Brunet, et al. 2005. "Anti-Endothelial Cell Antibodies in Idiopathic and Systemic Sclerosis Associated Pulmonary Arterial Hypertension." *Thorax* 60 (9): 765–72. <https://doi.org/10.1136/thx.2004.029082>.
- Tamosiuniene, Rasa, Wen Tian, Gundeep Dhillon, Lijuan Wang, Yon K. Sung, Lajos Gera, Andrew J. Patterson, et al. 2011. "Regulatory T Cells Limit Vascular Endothelial Injury and Prevent Pulmonary Hypertension." *Circulation Research* 109 (8): 867–79. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.236927>.

- Tamura, Yuichi, Carole Phan, Ly Tu, Morane Le Hiress, Raphaël Thuillet, Etienne-Marie Jutant, Elie Fadel, et al. n.d. “Ectopic Upregulation of Membrane-Bound IL6R Drives Vascular Remodeling in Pulmonary Arterial Hypertension.” *The Journal of Clinical Investigation* 128 (5): 1956–70. <https://doi.org/10.1172/JCI96462>.
- Tao, Florence, and Lester Kobzik. 2002. “Lung Macrophage-Epithelial Cell Interactions Amplify Particle-Mediated Cytokine Release.” *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 26 (4): 499–505. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.26.4.4749>.
- Taylor, A. E., T. K. Finney-Hayward, J. K. Quint, C. M. R. Thomas, S. J. Tudhope, J. A. Wedzicha, P. J. Barnes, and L. E. Donnelly. 2010. “Defective Macrophage Phagocytosis of Bacteria in COPD.” *European Respiratory Journal* 35 (5): 1039–47. <https://doi.org/10.1183/09031936.00036709>.
- Terrier, Benjamin, Mathieu C. Tamby, Luc Camoin, Philippe Guilpain, Cédric Broussard, Guillaume Bussone, Azzedine Yaïci, et al. 2008. “Identification of Target Antigens of Antifibroblast Antibodies in Pulmonary Arterial Hypertension.” *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 177 (10): 1128–34. <https://doi.org/10.1164/rccm.200707-1015OC>.
- Thabut, Gabriel, Jason D. Christie, Philippe Ravaud, Yves Castier, Olivier Brugière, Michel Fournier, Hervé Mal, Guy Lesèche, and Raphaël Porcher. 2008. “Survival after Bilateral versus Single Lung Transplantation for Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Retrospective Analysis of Registry Data.” *The Lancet* 371 (9614): 744–51. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60344-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60344-X).
- The Tobacco Use and Dependence Clinical Practice Guideline Panel, Staff, and Consortium Representatives. 2000. “A Clinical Practice Guideline for Treating Tobacco Use and Dependence A US Public Health Service Report.” *JAMA* 283 (24): 3244–54. <https://doi.org/10.1001/jama.283.24.3244>.
- “The Top 10 Causes of Death.” n.d. Accessed September 30, 2021. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.
- Thenappan, Thenappan, Stephen Y. Chan, and E. Kenneth Weir. 2018. “Role of Extracellular Matrix in the Pathogenesis of Pulmonary Arterial Hypertension.” *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 315 (5): H1322–31. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00136.2018>.
- Theodore, James, and Norman Lewiston. 1990. “Lung Transplantation Comes of Age.” *New England Journal of Medicine* 322 (11): 772–74. <https://doi.org/10.1056/NEJM199003153221110>.
- Tian, Xue, Guogang Xie, Fengming Ding, and Xin Zhou. 2018. “LPS-Induced MMP-9 Expression Is Mediated through the MAPKs-AP-1 Dependent Mechanism in BEAS-2B and U937 Cells.” *Experimental Lung Research* 44 (4–5): 217–25. <https://doi.org/10.1080/01902148.2018.1493551>.
- Tive, Leslie, Alfonso E Bello, David Radin, Thomas J Schnitzer, Ha Nguyen, Mark T Brown, and Christine R West. 2019. “Pooled Analysis of Tanezumab Efficacy and Safety with Subgroup Analyses of Phase III Clinical Trials in Patients with Osteoarthritis Pain of the Knee or Hip.” *Journal of Pain Research* 12 (March): 975–95. <https://doi.org/10.2147/JPR.S191297>.
- Traves, S, S Culpitt, R Russell, P Barnes, and L Donnelly. 2002. “Increased Levels of the Chemokines GRO α and MCP-1 in Sputum Samples from Patients with COPD.” *Thorax* 57 (7): 590–95. <https://doi.org/10.1136/thorax.57.7.590>.
- Traves, Suzanne L., Susan J. Smith, Peter J. Barnes, and Louise E. Donnelly. 2004. “Specific CXC but Not CC Chemokines Cause Elevated Monocyte Migration in COPD: A Role for CXCR2.” *Journal of Leukocyte Biology* 76 (2): 441–50. <https://doi.org/10.1189/jlb.1003495>.

- Tuder, Rubin M., Carlyne D. Cool, Mark W. Geraci, Jun Wang, Steven H. Abman, Laurel Wright, David Badesch, and Norbert F. Voelkel. 1999. "Prostacyclin Synthase Expression Is Decreased in Lungs from Patients with Severe Pulmonary Hypertension." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 159 (6): 1925–32. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.159.6.9804054>.
- Vahanian, Alec, Authors/Task Force Members, Ottavio Alfieri, Felicita Andreotti, Manuel J. Antunes, Gonzalo Barón-Esquivias, Helmut Baumgartner, et al. 2012. "Guidelines on the Management of Valvular Heart Disease (Version 2012)." *European Heart Journal* 33 (19): 2451–96. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehs109>.
- Van Dyken, Steven J., and Richard M. Locksley. 2013. "INTERLEUKIN-4- AND INTERLEUKIN-13-MEDIATED ALTERNATIVELY ACTIVATED MACROPHAGES: ROLES IN HOMEOSTASIS AND DISEASE." *Annual Review of Immunology* 31 (March): 317–43. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095906>.
- Vandooren, Jennifer, Philippe E. Van den Steen, and Ghislain Opdenakker. 2013. "Biochemistry and Molecular Biology of Gelatinase B or Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9): The next Decade." *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 48 (3): 222–72. <https://doi.org/10.3109/10409238.2013.770819>.
- Vannella, Kevin M., and Thomas A. Wynn. 2017. "Mechanisms of Organ Injury and Repair by Macrophages." *Annual Review of Physiology* 79 (1): 593–617. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034356>.
- Victoni, Tatiana, Florence Gleonnec, Manuella Lanzetti, Hermann Tenor, Samuel Valença, Luis Cristovão Porto, Vincent Lagente, and Elisabeth Boichot. 2014. "Roflumilast N-Oxide Prevents Cytokine Secretion Induced by Cigarette Smoke Combined with LPS through JAK/STAT and ERK1/2 Inhibition in Airway Epithelial Cells." *PLOS ONE* 9 (1): e85243. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085243>.
- Vlach, Manuel, Nicolas Quesnot, Hélène Dubois-Pot-Schneider, Catherine Ribault, Yann Verres, Kilian Petitjean, Claudine Rauch, et al. 2019. "Cytochrome P450 1A1/2, 2B6 and 3A4 HepaRG Cell-Based Biosensors to Monitor Hepatocyte Differentiation, Drug Metabolism and Toxicity." *Sensors (Basel, Switzerland)* 19 (10): 2245. <https://doi.org/10.3390/s19102245>.
- Voelkel, N F, R M Tuder, J Bridges, and W P Arend. 1994. "Interleukin-1 Receptor Antagonist Treatment Reduces Pulmonary Hypertension Generated in Rats by Monocrotaline." *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 11 (6): 664–75. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.11.6.7946395>.
- Vogelmeier, Claus F., Gerard J. Criner, Fernando J. Martinez, Antonio Anzueto, Peter J. Barnes, Jean Bourbeau, Bartolome R. Celli, et al. 2017. "Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease 2017 Report. GOLD Executive Summary." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 195 (5): 557–82. <https://doi.org/10.1164/rccm.201701-0218PP>.
- Walz, A., R. Burgener, B. Car, M. Baggiolini, S. L. Kunkel, and R. M. Strieter. 1991. "Structure and Neutrophil-Activating Properties of a Novel Inflammatory Peptide (ENA-78) with Homology to Interleukin 8." *The Journal of Experimental Medicine* 174 (6): 1355–62. <https://doi.org/10.1084/jem.174.6.1355>.
- Walz, Alfred, Peter Schmutz, Christoph Mueller, and Silvia Schnyder-Candrian. 1997. "Regulation and Function of the CXC Chemokine ENA-78 in Monocytes and Its Role in Disease." *Journal of Leukocyte Biology* 62 (5): 604–11. <https://doi.org/10.1002/jlb.62.5.604>.
- Wang, Chengyang, Huanzhang Ding, Xiao Tang, Zegeng Li, and Lei Gan. 2017. "Effect of Liuweibuqi Capsules in Pulmonary Alveolar Epithelial Cells and COPD Through

- JAK/STAT Pathway.” *Cellular Physiology and Biochemistry* 43 (2): 743–56.
<https://doi.org/10.1159/000481558>.
- Wang, Daren, Zhang Zhang, Min Li, Maria G. Frid, Amanda R. Flockton, B. Alexandre McKeon, Michael E. Yeager, et al. 2014. “MicroRNA-124 Controls the Proliferative, Migratory, and Inflammatory Phenotype of Pulmonary Vascular Fibroblasts.” *Circulation Research* 114 (1): 67–78.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.301633>.
- Wang, Jenny W., Chau Vu, and Neil J. Poloso. 2017. “A Prostacyclin Analog, Cicaprost, Exhibits Potent Anti-Inflammatory Activity in Human Primary Immune Cells and a Uveitis Model.” *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* 33 (3): 186–92.
<https://doi.org/10.1089/jop.2016.0167>.
- Watanabe, Satoshi, Michael Alexander, Alexander V. Misharin, and G.R. Scott Budinger. n.d. “The Role of Macrophages in the Resolution of Inflammation.” *The Journal of Clinical Investigation* 129 (7): 2619–28. <https://doi.org/10.1172/JCI124615>.
- Wedzicha, Jadwiga A., Peter MA Calverley, and Klaus F. Rabe. 2016. “Roflumilast: A Review of Its Use in the Treatment of COPD.” *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease* 11 (1): 81–90. <https://doi.org/10.2147/COPD.S89849>.
- Williams, Kimberly S., Deirdre A. Killebrew, Gillian P. Clary, Jaimie A. Seawell, and Rick B. Meeker. 2015. “Differential Regulation of Macrophage Phenotype by Mature and Pro-Nerve Growth Factor.” *Journal of Neuroimmunology* 285 (August): 76–93.
<https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2015.05.016>.
- Winthrop, Kevin L. 2017. “The Emerging Safety Profile of JAK Inhibitors in Rheumatic Disease.” *Nature Reviews Rheumatology* 13 (4): 234–43.
<https://doi.org/10.1038/nrrheum.2017.23>.
- Wong, Christine K., Candice A. Smith, Koji Sakamoto, Naftali Kaminski, Jonathan L. Koff, and Daniel R. Goldstein. 2017. “Aging Impairs Alveolar Macrophage Phagocytosis and Increases Influenza-Induced Mortality in Mice.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 199 (3): 1060–68. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700397>.
- Wongsurakiat, Phunsup, Khun Nanta Maranetra, Chantapong Wasi, Uraivan Kositanont, Wanchai Dejsomritrutai, and Suchai Charoenratanakul. 2004. “Acute Respiratory Illness in Patients With COPD and the Effectiveness of Influenza Vaccination.” *Chest* 125 (6): 2011–20. <https://doi.org/10.1378/chest.125.6.2011>.
- Wynn, Thomas A., Ajay Chawla, and Jeffrey W. Pollard. 2013. “Origins and Hallmarks of Macrophages: Development, Homeostasis, and Disease.” *Nature* 496 (7446): 445–55.
<https://doi.org/10.1038/nature12034>.
- Xia, Min, Krishna M. Boini, Justine M. Abais, Ming Xu, Yang Zhang, and Pin-Lan Li. 2014. “Endothelial NLRP3 Inflammasome Activation and Enhanced Neointima Formation in Mice by Adipokine Visfatin.” *The American Journal of Pathology* 184 (5): 1617–28. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.01.032>.
- Xia, Qing, Hongyi Tan, Pinhua Pan, Xiaoli Su, and Chengping Hu. 2015. “[Role of nerve growth factor in differentiation of ^{CD11b} dendritic cells].” *Zhong Nan Da Xue Xue Bao. Yi Xue Ban = Journal of Central South University. Medical Sciences* 40 (8): 829–36.
<https://doi.org/10.11817/j.issn.1672-7347.2015.08.002>.
- Xiang, Meng, Xiaolian Shi, Yuehua Li, Jia Xu, Lianhua Yin, Guozhi Xiao, Melanie J. Scott, Timothy R. Billiar, Mark A. Wilson, and Jie Fan. 2011. “Hemorrhagic Shock Activation of NLRP3 Inflammasome in Lung Endothelial Cells.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 187 (9): 4809–17.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102093>.
- Yan, Zhaoqi, Sara A. Gibson, Jessica A. Buckley, Hongwei Qin, and Etty N. Benveniste. 2018. “Role of the JAK/STAT Signaling Pathway in Regulation of Innate Immunity in



- Neuroinflammatory Diseases.” *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)* 189 (April): 4–13. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2016.09.014>.
- Yang, Qingliang, Jordan C. Langston, Yuan Tang, Mohammad F. Kiani, and Laurie E. Kilpatrick. 2019. “The Role of Tyrosine Phosphorylation of Protein Kinase C Delta in Infection and Inflammation.” *International Journal of Molecular Sciences* 20 (6): 1498. <https://doi.org/10.3390/ijms20061498>.
- Yew-Booth, Liang, Mark A. Birrell, Ming Sum Lau, Katie Baker, Victoria Jones, Iain Kilty, and Maria G. Belvisi. 2015. “JAK–STAT Pathway Activation in COPD.” *European Respiratory Journal* 46 (3): 843–45. <https://doi.org/10.1183/09031936.00228414>.
- Yew-Booth, Liang, Ming Sum Lau, Steven M. Evans, Iain Kilty, Maria G. Belvisi, and Mark A. Birrell. 2012. “Activation Of The JAK/STAT Pathway In The Lungs Of COPD Patients.” In *C52. COPD PATHOGENESIS: HUMAN STUDIES*, A4546–A4546. American Thoracic Society. https://doi.org/10.1164/ajrccm-conference.2012.185.1_MeetingAbstracts.A4546.
- Yona, Simon, Ki-Wook Kim, Yochai Wolf, Alexander Mildner, Diana Varol, Michal Breker, Dalit Strauss-Ayali, et al. 2013. “Fate Mapping Reveals Origins and Dynamics of Monocytes and Tissue Macrophages under Homeostasis.” *Immunity* 38 (1): 79–91. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.12.001>.
- Yoshimura, Teizo. 2015. “Discovery of IL-8/CXCL8 (The Story from Frederick).” *Frontiers in Immunology* 6 (June): 278. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00278>.
- Yu, Xueyang, Anne Buttgerit, Iva Lelios, Sebastian G. Utz, Dilay Cansever, Burkhard Becher, and Melanie Greter. 2017. “The Cytokine TGF- β Promotes the Development and Homeostasis of Alveolar Macrophages.” *Immunity* 47 (5): 903–912.e4. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.10.007>.
- Yuan, Fengjiao, Xiao Fu, Hengfei Shi, Guopu Chen, Ping Dong, and Weiyun Zhang. 2014. “Induction of Murine Macrophage M2 Polarization by Cigarette Smoke Extract via the JAK2/STAT3 Pathway.” Edited by Estelle Cormet-Boyaka. *PLoS ONE* 9 (9): e107063. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107063>.
- Yuan, J. X., A. M. Aldinger, M. Juhaszova, J. Wang, J. V. Conte, S. P. Gaine, J. B. Orens, and L. J. Rubin. 1998. “Dysfunctional Voltage-Gated K⁺ Channels in Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells of Patients with Primary Pulmonary Hypertension.” *Circulation* 98 (14): 1400–1406. <https://doi.org/10.1161/01.cir.98.14.1400>.
- Yuan, Ke, Mark E. Orcholski, Cristina Panaroni, Eric M. Shuffle, Ngan F. Huang, Xinguo Jiang, Wen Tian, et al. 2015. “Activation of the Wnt/Planar Cell Polarity Pathway Is Required for Pericyte Recruitment during Pulmonary Angiogenesis.” *The American Journal of Pathology* 185 (1): 69–84. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.09.013>.
- Yunna, Chen, Hu Mengru, Wang Lei, and Chen Weidong. 2020. “Macrophage M1/M2 Polarization.” *European Journal of Pharmacology* 877 (June): 173090. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173090>.
- Žaloudíková, M., R. Vytášek, O. Vajnerová, O. Hniličková, M. Vízek, V. Hampl, and J. Herget. 2016. “Depletion of Alveolar Macrophages Attenuates Hypoxic Pulmonary Hypertension but Not Hypoxia-Induced Increase in Serum Concentration of MCP-1.” *Physiological Research*, October, 763–68. <https://doi.org/10.33549/physiolres.933187>.
- Zamanian, Roham T., David Badesch, Lorinda Chung, Robyn T. Domsic, Thomas Medsger, Ashley Pinckney, Lynette Keyes-Elstein, et al. 2021. “Safety and Efficacy of B-Cell Depletion with Rituximab for the Treatment of Systemic Sclerosis–Associated Pulmonary Arterial Hypertension: A Multicenter, Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial.” *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 204 (2): 209–21. <https://doi.org/10.1164/rccm.202009-3481OC>.

- Zhao, Guixiang, Terry D. Etherton, Keith R. Martin, John P. Vanden Heuvel, Peter J. Gillies, Sheila G. West, and Penny M. Kris-Etherton. 2005. "Anti-Inflammatory Effects of Polyunsaturated Fatty Acids in THP-1 Cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 336 (3): 909–17. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.08.204>.
- Zhao, Kaishun, Ran Dong, Yanfang Yu, Chunlin Tu, Ying Li, YuJuan Cui, Lei Bao, and Chunhua Ling. 2020. "Cigarette Smoke-Induced Lung Inflammation in COPD Mediated via CCR1/JAK/STAT /NF-KB Pathway." *Aging (Albany NY)* 12 (10): 9125–38. <https://doi.org/10.18632/aging.103180>.
- Zhao, Yingzi, Paul M. Vanhoutte, and Susan W.S. Leung. 2015. "Vascular Nitric Oxide: Beyond ENOS." *Journal of Pharmacological Sciences* 129 (2): 83–94. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2015.09.002>.
- Zhou, Jin J., Michael H. Cho, Peter J. Castaldi, Craig P. Hersh, Edwin K. Silverman, and Nan M. Laird. 2013. "Heritability of Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Related Phenotypes in Smokers." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 188 (8): 941–47. <https://doi.org/10.1164/rccm.201302-0263OC>.
- Zhu, Xiaoping, Gang Meng, Bonny L. Dickinson, Xiaotong Li, Emiko Mizoguchi, Lili Miao, Yuansheng Wang, et al. 2001. "MHC Class I-Related Neonatal Fc Receptor for IgG Is Functionally Expressed in Monocytes, Intestinal Macrophages, and Dendritic Cells." *The Journal of Immunology* 166 (5): 3266–76. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.5.3266>.
- Zsófia, Lázár, Mészáros Martina, and Bikov Andras. 2020. "The Nitric Oxide Pathway in Pulmonary Arterial Hypertension: Pathomechanism, Biomarkers and Drug Targets." *Current Medicinal Chemistry* 27 (42): 7168–88.

ANNEXES

Article

Cytochrome P450 1A1/2, 2B6 and 3A4 HepaRG Cell-Based Biosensors to Monitor Hepatocyte Differentiation, Drug Metabolism and Toxicity

Manuel Vlach ^{1,†}, Nicolas Quesnot ^{1,†}, Hélène Dubois-Pot-Schneider ² , Catherine Ribault ¹, Yann Verres ¹, Kilian Petitjean ¹, Claudine Rauch ¹, Fabrice Morel ^{1,‡}, Marie-Anne Robin ^{1,‡}, Anne Corlu ¹ and Pascal Loyer ^{1,*} 

¹ Inserm, INRA, Univ Rennes, Institut NUMECAN (Nutrition Metabolisms and Cancer) UMR-A 1341, UMR-S 1241, Plateforme BiogenOuest SynNanoVect, F-35000 Rennes, France; manuel.vlach@univ-rennes1.fr (M.V.); quesnotnicolas@hotmail.fr (N.Q.); catherine.ribault@univ-rennes1.fr (C.R.); yann.verres@etudiant.univ-rennes1.fr (Y.V.); petitjeankilian@gmail.com (K.P.); claudine.rauch@univ-rennes1.fr (C.R.); anne.corlu@univ-rennes1.fr (A.C.)

² Université de Lorraine, CNRS, CRAN, F-54000 Nancy, France; helene.dubois-pot-schneider@univ-lorraine.fr

* Correspondence: pascal.loyer@univ-rennes1.fr; Tel.: +33-(0)223233873; Fax: +33-(0)299540137

† The authors have contributed to this work equally.

‡ Deceased.

Received: 14 March 2019; Accepted: 13 May 2019; Published: 15 May 2019



Abstract: Human hepatoma HepaRG cells express most drug metabolizing enzymes and constitute a pertinent *in vitro* alternative cell system to primary cultures of human hepatocytes in order to determine drug metabolism and evaluate the toxicity of xenobiotics. In this work, we established novel transgenic HepaRG cells transduced with lentiviruses encoding the reporter green fluorescent protein (GFP) transcriptionally regulated by promoter sequences of cytochromes P450 (CYP) 1A1/2, 2B6 and 3A4 genes. Here, we demonstrated that GFP-biosensor transgenes shared similar expression patterns with the corresponding endogenous CYP genes during proliferation and differentiation in HepaRG cells. Interestingly, differentiated hepatocyte-like HepaRG cells expressed GFP at higher levels than cholangiocyte-like cells. Despite weaker inductions of GFP expression compared to the strong increases in mRNA levels of endogenous genes, we also demonstrated that the biosensor transgenes were induced by prototypical drug inducers benzo(a)pyrene and phenobarbital. In addition, we used the differentiated biosensor HepaRG cells to evidence that pesticide mancozeb triggered selective cytotoxicity of hepatocyte-like cells. Our data demonstrate that these new biosensor HepaRG cells have potential applications in the field of chemicals safety evaluation and the assessment of drug hepatotoxicity.

Keywords: HepaRG cells; cell-based biosensors; cytochromes P450; drug screening; hepatotoxicity

1. Introduction

The liver plays a crucial role in the biotransformation and elimination of chemicals, pollutants and drugs since the normal hepatocytes express a large panel of phase I, II and III metabolism enzymes [1] that catalyze the conversion of endogenous toxins and xenobiotics in hydrophilic products that are more easily eliminated in urine and bile. As a consequence, the liver that accumulates noxious compounds is also a main target of toxicity triggered by xenobiotics themselves and their down-stream reactive metabolites as demonstrated by the fact that a frequent cause for the market withdrawals of approved medications is the liver toxicity evidenced by the pharmacovigilance agencies after initial drug approval [2].

The establishment of metabolism pathways and the toxicity assessment of xenobiotics are technically difficult, often expensive and time-consuming processes that require the use of both *in vitro* cell systems [3] and *in vivo* animal models prior to any clinical trials in humans [4]. Among the different *in vitro* hepatic cell systems available, primary cultures of human hepatocytes are recognized as the most pertinent cell systems to accurately predict metabolism pathways and regulate phase I, II and III enzyme expressions and hepatotoxicity by synthetic compounds [1,4,5]. However, primary cultures of hepatocytes have several drawbacks considerably limiting their use. These cells are isolated from surgical biopsies of patients suffering from hepatic diseases, which lead to great variations in metabolic activities including enzymes involved in drug metabolism such as the cytochrome P450 enzymes (CYP). Furthermore, the reproducibility of the experiments is impaired by the fact that hepatocytes are isolated from different donors with variations in age, liver diseases and treatments [1,4]. In addition, the hepatocytes in primary cultures have a short lifespan. Thus, because of all these drawbacks as well as the relative shortage in human biopsies and the constraining ethical regulation, a limited number of laboratories have access to these culture models.

The hepatoma cell lines represent an attractive alternative to the use of human hepatocytes in primary culture to study the toxicity [3] and genotoxicity of xenobiotics [4,6]. These cell lines, however, express drug metabolism enzymes at low levels compared to normal hepatocytes in the liver and in primary cultures [1,7]. To circumvent this drawback, subclones of hepatoma cells have been derived such as HBG [8] and HepG2C3A that express higher amounts of at least some CYP [9]. Similarly, recombinant hepatoma cell lines have been generated through stable transfection of genes encoding drug metabolism enzymes [10] or liver-specific transcription factors driving transcription of liver-specific functions [11]. Most hepatoma cell lines show, however, reduced expression levels of phase I and II enzymes and limited induction upon treatments with their canonical xenobiotic inducers.

The human hepatoma HepaRG cells are bipotent hepatic progenitors actively proliferating at low density but are capable of differentiating into biliary- and hepatocyte-like cells when kept as a confluent cell monolayer in appropriate culture medium [12]. This cell model represents a unique *in vitro* cell system to investigate the molecular signalling pathways controlling the hepatocyte differentiation [13,14]. Moreover, HepaRG hepatocyte-like cells that express most of the major phase I, II and III enzymes [15–17] provide a valuable *in vitro* alternative model to primary cultures of hepatocytes and are used worldwide for studying the metabolism [15,18,19], drug toxicity [20,21] and genotoxicity of xenobiotics [4,22,23].

In the assessment of drug hepatotoxicity, an important aspect is the induction of drug metabolism enzyme expressions by xenobiotics in order to evidence the activation of metabolic pathways [4]. Beyond the study of the drug metabolisms, the expression of phase I and II in human hepatocytes is also strongly regulated by endogenous noxious compounds, hormonal factors such as growth factors and cytokines [24,25], and hypoxia [19]. In order to study the regulation of expression of drug metabolism genes, the mRNA and/or protein levels must be measured and, when an assay is available, the quantification of their enzymatic activity is performed. These experiments require relatively large amounts of cells and analytical measurements or molecular biology experiments that are labour intensive. To overcome these problems, rapid high-throughput cell-based assays that measure cell responses and gene induction are being developed to provide early warning on metabolic pathway activations and toxicity [4]. Among these assays, whole cell biosensors in HepaRG [21,26,27] and HepG2 [26–29] hepatoma cell lines have been developed in order to detect mitochondrial dysfunction, toxicity, metabolism and genotoxicity [4].

In the present study, we describe the development and validation of whole cell-based biosensor recombinant hepatoma HepaRG cells that were transduced with lentiviral particles carrying the partial gene promoters of CYP1A1/2, 2B6 and 3A4, driving the transcription of the reporter Green Fluorescent Protein (GFP). Characterization of these CYP1A1/2-, 2B6- and 3A4-GFP transgenic biosensor HepaRG cells demonstrated that GFP expression correlated with the expression levels of liver-specific functions. Furthermore, the treatment of biosensor HepaRG cells with prototypical inducers of CYP via xenobiotic

responsive elements present in their promoters, benzo(a)pyrene and phenobarbital, induced the GFP expression levels. In addition, we demonstrated that differentiated CYP1A1/2, 2B6 and 3A4 biosensor HepaRG cells can be used to show selective hepatocyte toxicity following exposure to hepatotoxic compounds such as the mancozeb.

2. Materials and Methods

2.1. Reagents

Benzo(a)pyrene (B(a)P), thioacetamide, mancozeb and insulin were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Phenobarbital (PB) was provided by Sanofi-Aventis (Gardenal). William's E medium was purchased from Eurobio (Les Ulis, France). Fetal calf serum (FCS) was obtained from Lonza (Levallois-Perret, France). Penicillin, streptomycin and L-glutamine were purchased by Life Technologies (Saint Aubin, France).

2.2. HepaRG Cell Culture

HepaRG cells were seeded at a density of 3×10^4 cells/cm². These cells were cultured in William's E medium supplemented with 10% of FCS, 5 µg/mL insulin, 2 mM L-glutamine, 50 units/mL penicillin, 50 µg/mL streptomycin and 50 µM Hydrocortisone hemisuccinate sodium salt. Two weeks after plating, the cells were maintained for 2 more weeks in the same William's E medium further supplemented with 2% dimethylsulfoxide (DMSO) in order to obtain the full hepatocyte differentiation [13,30]. For half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) assays, parental differentiated HepaRG cells were exposed to various concentrations of thioacetamide (1 to 250 mM) and mancozeb (2.5, 5 and 22.5 µM) for 24 h. For the induction of selective cytotoxicity, CYP-GFP biosensor HepaRG cells were treated with 3.5 µM of mancozeb for 24 h.

2.3. GFP Reporter Gene Constructs.

DNA fragments corresponding to the 5' flanking region of Homo sapiens CYP1A1/CYP1A2 locus (bidirectional 5' flank CYP1A1/2 promoter region) (−1679/+80 base pairs upstream of exon 1), CYP2B6 gene (−1995/+1 base pairs) and distal CYP3A4 gene enhancer region (−1429/+1 base pairs) were cloned into the lentiviral expression pLV-GFP vector upstream of the GFP reporter gene (Supplementary Material 1 for promoter sequences). The CYP3A4 promoters have been previously described [19,31,32].

2.4. Lentiviral Infection and Selection of Biosensor HepaRG Cells.

The CYP1A1/2, CYP2B6 and CYP3A4 promoter sequences were subcloned into the lentiviral expression pLV-GFP backbone upstream of the GFP reporter genes using the KpnI (5' end) and SacI (3' end) restriction sites. The production of lentiviral particles was performed in HEK293T packaging cell line (Vectalys, Toulouse, France). Proliferating progenitor HepaRG cells seeded in 24-well plates were infected for 48 h at a multiplicity of infection of 5, 24 h after plating the cells. After 2 days, the mediums were discarded and cell monolayers were washed with regular medium. Two weeks later, GFP positive hepatocyte-like HepaRG cells were sorted by flow cytometry. These GFP positive cells were expanded and frozen prior to further experiments.

2.5. Immunoblotting Blotting

For immunoblotting, culture medium was discarded and adherent cells were washed once with cold PBS and lysed in the dish wells using lysis buffer: 50 mM HEPES pH 7.9, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 10% glycerol, 0.5% Tween 20 supplemented with protease inhibitors (EDTAfree, Roche). Following a brief sonication, total protein contents of cell extracts were quantified using Biorad protein reagent assay. For immunoblotting, 20 µg of protein was separated on NuPAGE® Novex® Bis-Tris 4–12% gels kit (Invitrogen) and transferred to PVDF membranes (Trans-blot® Turbo™ Transfer System, Biorad) prior to immunoblotting using the following primary antibodies: CYP3A4 (anti-human

CYP3A4 rabbit polyclonal antibody, AB1254, Millipore Sigma), CYP1A1/2 (anti-human CYP1A1/2 mouse monoclonal antibody, ABIN614141, Daiichi Pure Chemicals Co., Tokyo, Japan) and CYP2B6 (anti-human CYP2B6 rabbit polyclonal antibody, MBS9409762, Daiichi Pure Chemicals Co., Tokyo, Japan), CYP2E1 (anti-human CYP2B6 rabbit polyclonal antibody, PA26, Oxford Biomedical, MI, USA), GSTA1 and Mu (Biotrin, Dublin, Ireland), albumin and transferrin (Kent laboratories, WA, USA), HSC70 (B-6, sc-7298, Santa Cruz Biotechnology), GFP (mAb 8758, Abnova), and cyclin A (anti-human cyclin A rabbit polyclonal antibody, H-432, sc-751, Santa Cruz Biotechnology). Primary antibodies were detected using secondary goat or rabbit antibodies coupled to horseradish peroxidase (Dako, Denmark), and detection of the immune complex was performed by chemiluminescent detection (Pierce™ ECL Substrate). The signals were quantified with scanning densitometry using the Quantity One software program (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Densitometry data were normalized with the loading control HSC70.

2.6. RNA Expression by RetroTranscription Quantitative Polymerase Chain Reaction

After discarding the culture medium and brief washing with cold PBS, cells were lysed in dish wells and the total RNA was extracted using a Macherey-Nagel NucleoSpin® RNA kit. Following elution, quantification of total RNAs was performed by measuring the optical density at 260 nm. Then, reverse transcription was performed using 500 ng of total RNAs and High capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems). The RNA expression levels of specific genes were measured with SYBR Green PCR Master Mix kit (Applied Biosystems) using the ABI PRISM 7900HT instrument. TATA Binding Protein (TBP) genes were used as normalizing genes. Primers sequences are shown in Table 1:

Table 1. Forward and reverse primers used for quantitative PCR.

	Forward	Reverse
CYP1A1	TCTTCCTTCGTCCCTTCAC	ACACCTTGTCGATAGCACCA
CYP2B6	TTCCTACTGCTTCCGTCTATC	GTGCAGAATCCCACAGCTCA
CYP2E1	TTGAAGCCTCTCGTTGACCC	CGTGGTGGGATACAGCCA
CYP3A4	CTTCATCCAATGGACTGCATAAA	TCCCAAGTATAAACTCTACACACACA
CK19	TTTGAGACGGAACAGGCTCT	AATCCACCTCCACACTGACC
GFP	ACAACAGCCACAACGTCTAT	GGGTGTTCTGCTGGTAGTG
TBP	GAGCTGTGATGTGAAGTTCC	TCTGGGTTTGATCATTCTGTA

2.7. Fluorescence Microscopy and Flow Cytometry Analyses.

The cellular DNA was stained using the BD Cycletest™ Assay (BD Biosciences) and detected using a FACSCalibur™ equipment (BD Biosciences) using the CellQuest™ software. The DNA content was analyzed for 5000 cells. Percentages of cells in G0/G1, S and G2/M phases was established using the ModFit LT™ software (Supplementary Materials). The GFP was detected in HepaRG cells by fluorescence microscopy using Zeiss Inverted Microscope, and photographs were analyzed with the AxioVision Software. The quantification of GFP was carried out by flow cytometry: The cells were detached with trypsin and resuspended in William's E medium containing FCS. The fluorescence intensity of 10,000 cells was analyzed with a Becton Dickinson le LSRFortessa™ X-20 (cytometry core facility of the Biology and Health Federative research structure Biosit, Rennes, France) to measure the fluorescence of the GFP positive cells. Flow cytometry data were analyzed using DIVA software (Becton Dickinson).

2.8. Statistical Analyses

The Results were expressed as mean \pm SD (the standard deviation) of two or three independent experiments including three to six independent culture wells. Statistically significant variations after

treatment were compared with controls using Student's test with Excel software; * p value < 0.05, ** p < 0.01 and *** p < 0.001.

3. Results

3.1. Subsection

3.1.1. Expression of Phase I and II Enzymes in HepaRG Hepatocyte-Like Cells.

The most appropriate procedure to expand HepaRG cells is to culture them over 2 weeks between two passages (Figure 1A). As previously reported [4,12–14], HepaRG cells actively proliferate during the first 8 to 10 days after seeding as confirmed by the increasing cell counts and the high numbers of cells in S and G2/M phases during this period (Figure 1B,C). Two weeks after cell seeding, the proliferation activity strongly decreased and over 95% of cells became quiescent (G0/G1 phase) while nearly 50% of quiescent HepaRG cells committed toward the hepatocyte-like cell lineage as demonstrated by the appearance of well-defined colonies of hepatocytes and the high expression of albumin detected by immunoblotting (Figure 1D).

To further enhance the expression of hepatocyte-specific functions, especially cytochrome P450's, committed HepaRG are cultured for 2 more weeks with culture medium supplemented with 2% DMSO. Hepatocyte-like cells complete their differentiation and undergo drastic morphological changes to give rise to well-defined colonies of hepatocytes characterized by a dark cytoplasm, a large nucleus with a single nucleolus, and functional neo-canalculi (Figure 1A), while the overall cell number is slightly reduced following DMSO treatment (Figure 1B). In most reports, the expression of liver-specific functions in HepaRG cells has been investigated at the mRNA levels [14] and/or by the quantification of drug metabolism enzyme's catalytic activities [15]. In our study, we studied the expression of several phase I and II proteins by immunoblotting during a 31-day time-course to establish their sequential activation during the first 2 weeks of expansion and the 2 weeks of stimulation by DMSO treatment (Figure 1D). The proliferation was correlated with the expression of the cyclin A from day 1 to day 8 after cell seeding. Confluent cells detached by trypsin and seeded at low density (day 0) express high levels of albumin, confirming that HepaRG cells are committed to the hepatocyte lineage. The albumin expression was decreased during the active phase of proliferation between days 1 and 8 and increased until day 14. The addition of DMSO to the culture medium did not further enhance its expression. In contrast, transferrin, another plasma protein secreted by the hepatocytes, was barely detectable in proliferating and quiescent HepaRG cells during the first 2 weeks post-seeding. Its expression was induced by the DMSO treatment since at day 31, in absence of DMSO, the transferrin was expressed at very low levels. The GSTA1 and GST Mu were expressed in proliferating cells; their expression increased when cells became quiescent and the treatment by DMSO did not significantly increase their expression levels. In contrast, the expressions of the CYP1A1/2, CYP2E1, CYP3A4 and CYP2B6 had very low levels in quiescent cells at day 14, were undetectable during proliferation, and strongly increased in HepaRG hepatocyte-like cells upon stimulation by DMSO. Our data confirmed the commitment to the hepatocyte lineage following an active phase of proliferation, and full hepatocyte differentiation during the 2-week treatment by DMSO [4].

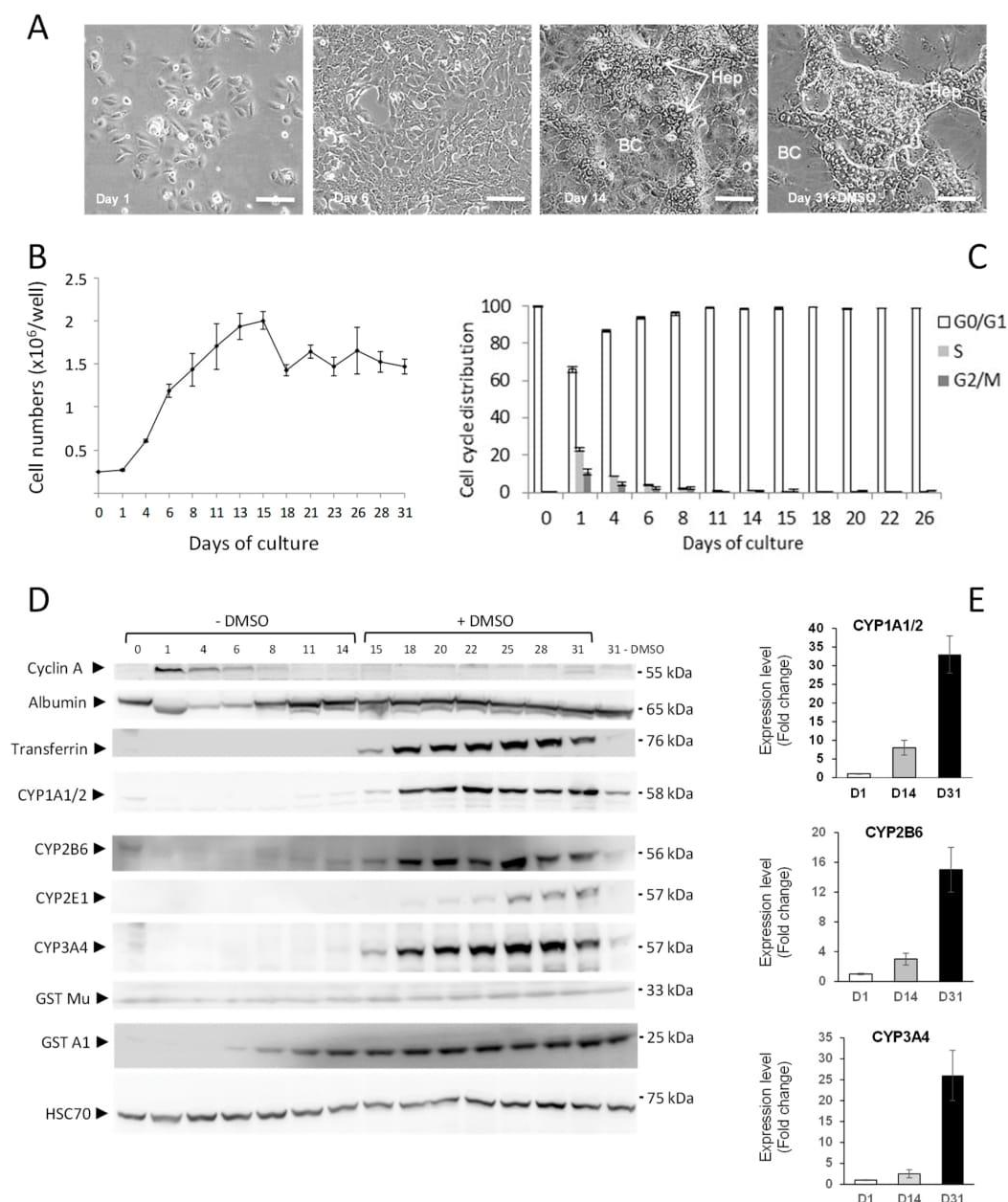


Figure 1. Proliferation and differentiation of HepaRG cells. Morphology in phase contrast of HepaRG cells at different stages of differentiation after plating (**A**). At day 1: bipotent progenitors at low density; 1 day after trypsination; subconfluent HepaRG cells at day 7 after trypsination, committed HepaRG hepatocyte-like (Hep) and biliary (BC) cells at day 14 post trypsination; and highly differentiated hepatocyte-like HepaRG and biliary cells 30 days after passage. To obtain full differentiation, cells were maintained for 2 weeks in culture medium supplement with 2% DMSO. Scale bar: 100 μ m. Time course of cell counts of HepaRG cells at different times after cell plating (**B**). Percentages of cells in the different phases of the cell cycle (DNA content: G0/G1, S and G2/M) measured by flow cytometry at different times after cell plating (**C**). Immunoblotting of cyclin A, albumin, transferrin, CYP2B6, CYP2E1, CYP3A4, CYP1A1/2, GST Mu, GSTA1 and HSC70 used as a loading control, during the proliferation and differentiation of HepaRG cells (**D**). Densitometry analysis of CYP1A1/2, 2B6 and 3A4 immunoblottings at days 14 and 31 expressed in fold change compared to expression at day 1 and normalized with HSC70 protein levels (**E**).

3.1.2. Establishment of Biosensor HepaRG Cells

In order to establish stable CYP1A1/2, CYP2B6 and CYP3A4 biosensor HepaRG cells, we subcloned the partial promoter sequences of the CYP1A1/2, CYP2B6 and CYP3A4 (Supplementary Materials) in

the lentiviral pLV-GFP backbone expression vector (Figure 2). The CYP promoters were thus supposed to regulate the transcription of the GFP open reading frame and to allow the expression of GFP detected in situ by fluorescence microscopy and by flow cytometry to quantify the fluorescence intensities in HepaRG cells.

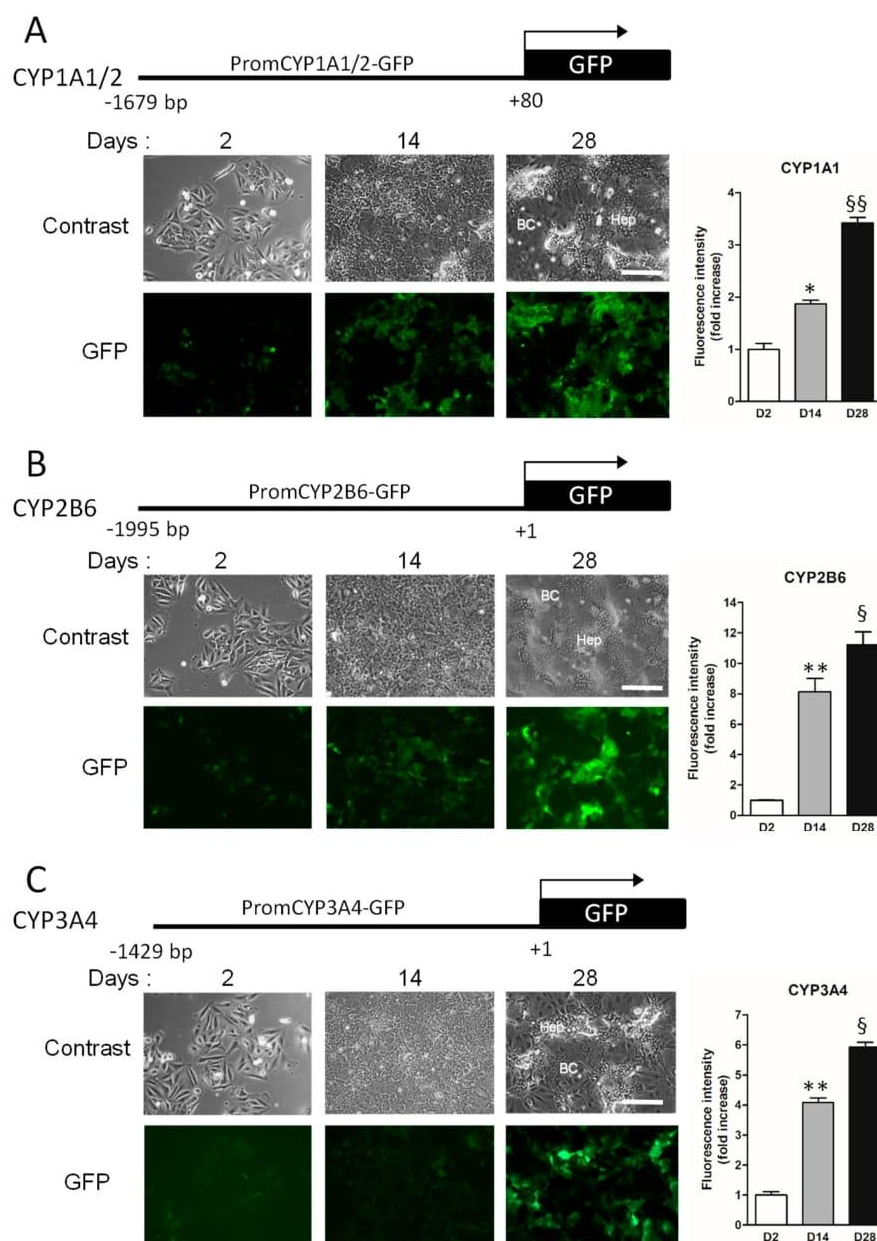


Figure 2. Schematic representation of CYP's promoter constructs and establishment of biosensor HepaRG cell lines. CYP1A1/2 (A), CYP2B6 (B) and CYP3A4 (C) promoters were used in GFP reporter constructs. Visualization of the GFP by fluorescent microscopy and quantification of GFP fluorescent intensity by flow cytometry (charts) in the promCYP1A1/2-, CYP2B6- and CYP3A4-GFP HepaRG biosensor cells at day 2 after plating (progenitor HepaRG cells); at day 14 when confluent HepaRG cells have committed to biliary/cholangiocyte (BC) or hepatocyte (Hep) cell lineages; and at day 28 in differentiated HepaRG cells following 2 weeks of culture in DMSO-supplemented culture medium. Scale bar: 400 μ m. Statistics: Fluorescence intensities were significantly higher in cells at day 14 (* p value < 0.05 and ** p < 0.01) versus cells at day 2, and in cells at day 28 (§ p value < 0.05 and § p < 0.01) versus cells at days 2 and 14.

After lentiviral transduction and selection of recombinant cells stably transduced, we studied the expression of the GFP in these derived HepaRG cell lines in order to evaluate the patterns of

transcription of the different CYP promoter-GFP transgenes during the proliferation and differentiation processes taking place over 30 days after cell splitting (protocol described in Figure 1). The GFP expression was detected in situ by fluorescent microscopy and quantified by flow cytometry (Figure 2). Visualization of the GFP by fluorescent microscopy demonstrated the low transcriptional activities of the CYP1A1/2, CYP2B6 and CYP3A4 promoters within the integrated lentiviral transgene at day 2 after HepaRG cell seeding. For all the transgenes, the GFP expression increased at days 14 and 28 after stimulation by DMSO and was much stronger in colonies of hepatocyte-like cells compared to the very low intensity of fluorescence detected in cholangiocyte-like cells.

These data of in situ GFP visualization were confirmed by the GFP protein detection by Western blot (Figure 3A). A time-course analysis of the GFP expression in the CYP1A1/2-, CYP2B6- and CYP3A4-GFP HepaRG biosensor cells was performed and compared to the expression of the corresponding endogenous CYP proteins. Immunoblotting showed very similar expression patterns for the GFP and the corresponding endogenous CYP (Figure 3A), demonstrating that the endogenous CYP gene and the corresponding transgene containing the CYP promoter driving the GFP expression shared similar transcriptional regulation during the process of proliferation and differentiation in the HepaRG cells [4].

Cultures of differentiated HepaRG cells include both hepatocyte- and cholangiocyte-like HepaRG cells. To further demonstrate that GFP was mainly expressed in hepatocyte-like HepaRG cells and not in cholangiocytes, the two cell types were selectively detached using mild trypsinization as previously described [13], and fluorescence intensity was analyzed (Figure 3B). Enriched cultures of hepatocyte-like HepaRG cells showed high levels of fluorescence while the GFP expression was much lower in cholangiocyte-like cells.

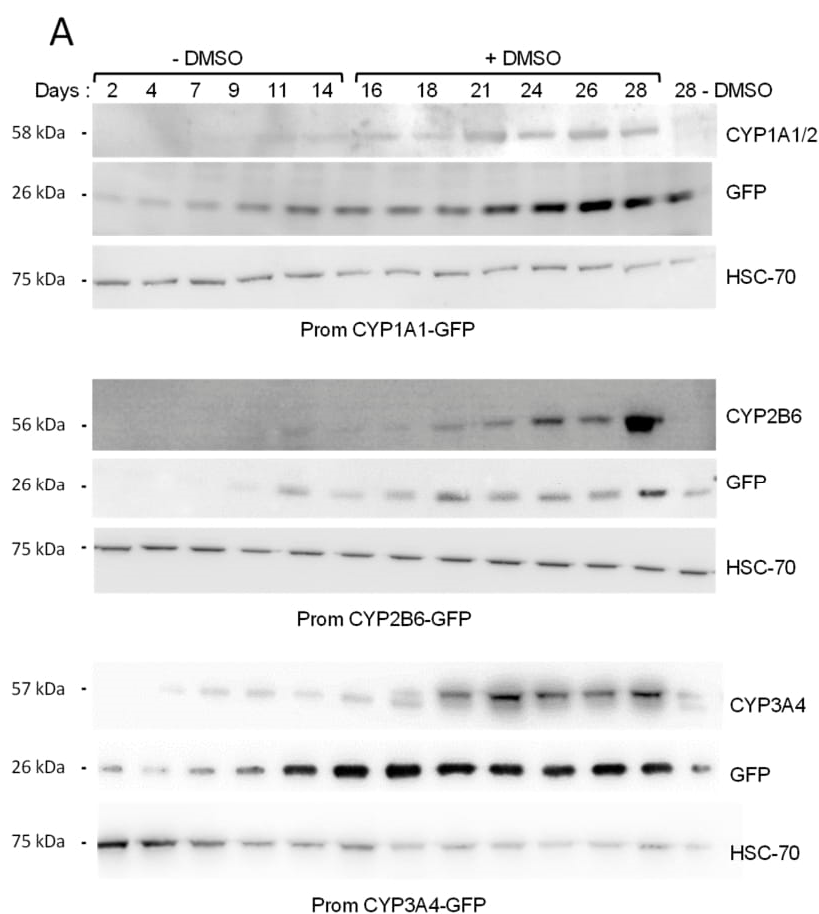


Figure 3. *Cont.*

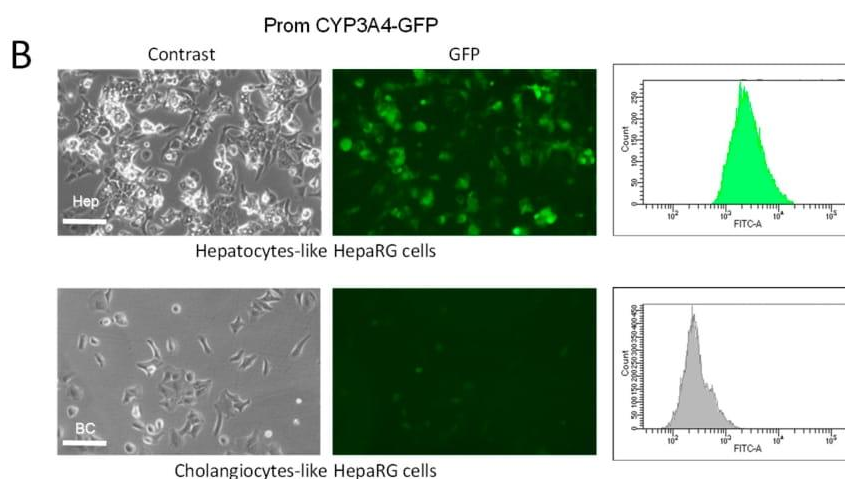


Figure 3. Correlated expression of GFP and endogenous CYP1A1, CYP2B6 and CYP3A4. Immunoblotting of endogenous CYP1A1, CYP2B6 or CYP3A4 and GFP in promCYP1A1-, CYP2B6- and CYP3A4-GFP HepaRG cells (A). HSC70 was used as loading control. Expression of GFP in hepatocytes-like and cholangiocytes-like HepaRG cells in enriched cell populations (B). Both cell types were selectively detached from differentiated CYP3A4-GFP biosensor HepaRG cells using a mild-trypsin detachment protocol previously described [13], and GFP expression was visualized by fluorescence microscopy and quantified by flow cytometry. Scale bar: 200 μ m.

3.1.3. Induction of GFP Expression in Biosensor HepaRG Cells by Xenobiotics

We next compared the expression of endogenous CYP genes at the mRNA levels and the GFP expression by flow cytometry following treatment with prototypical inducers of CYP450 genes in differentiated biosensor HepaRG cells (Figure 4). Differentiated biosensor HepaRG cells were treated for 48 h with benzo(a)pyrene B(a)P at 5 μ M and phenobarbital (PB) at 1.5 mM, then, the expression of endogenous CYP1A1, 2B6 and 3A4 mRNA was analyzed by RT-qPCR (Figure 4A). The CYP1A1/2 mRNA levels were strongly and significantly induced (\sim 350-fold) by B(a)P and to a much lesser extent by PB (\sim 3.7-fold). The expression of CYP2B6 and CYP3A4 showed a 30- and 50-fold increase after treatment by PB, respectively, while B(a)P led to a 2.7 increase in CYP3A4 expression and no effect on CYP2B6 mRNA levels [4].

We next evaluated the induction of GFP expression by flow cytometry in the same biosensor HepaRG cells following treatments with B(a)P and PB (Figure 4B). Despite much weaker inductions (three- to four-fold) in GFP expression compared to the strong inductions of endogenous CYP mRNAs (Figure 4A), we showed that CYP1A1/2-GFP reporter transgene was also significantly induced by B(a)P with a three- to four-fold increase in fluorescence intensities in biosensor hepatocyte-like HepaRG cells while the fluorescence was not significantly induced by PB. Conversely, the CYP2B6 and CYP3A4-GFP reporter transgenes were significantly induced by PB with three to four-fold increases in fluorescence intensities but not by B(a)P.

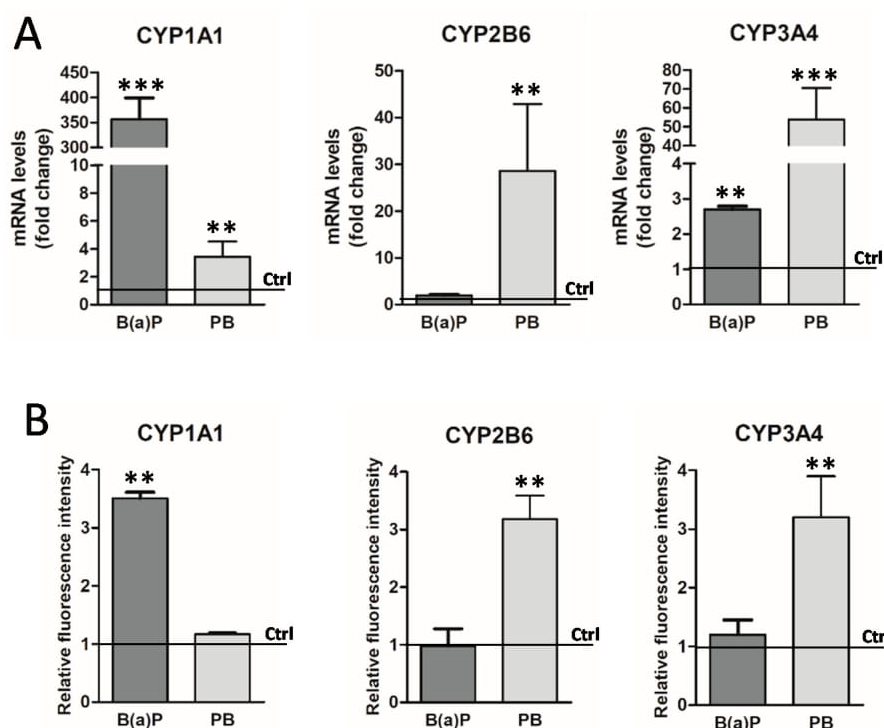


Figure 4. Induction of GFP expression in biosensor HepaRG cells by drugs. Expression levels of endogenous CYP1A1, CYP2B6 and CYP3A4 mRNAs in biosensor HepaRG cells (A). HepaRG cells were treated for 24 h with prototypical inducers of CYP genes, the phenobarbital (PB) and Benzo(a)pyrene (B(a)P). The endogenous CYP1A1, CYP2B6 and CYP3A4 RNA expression levels were studied by quantitative PCR and results were expressed as fold changes compared to untreated control cells. Quantification of the GFP expression by flow cytometry in promCYP1A1/2, CYP2B6 and CYP3A4-GFP biosensor HepaRG cells following treatments with B(a)P and PB (B). Results were expressed as fold changes in fluorescence relative to the signal measured in untreated control cells (Ctrl) arbitrarily set as 1. Statistics: * p value < 0.005, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

3.1.4. Detection of Selective Hepatocyte-Like Cytotoxicity

A main feature of the progenitor HepaRG cells is their ability to differentiate into two hepatic lineages leading to a differentiated coculture model of hepatocyte- and cholangiocyte-like cells (Figure 1). Thus, we next evaluated whether the CYP-GFP biosensor HepaRG cells could be used to evidence selective cell death of hepatocyte-like HepaRG cells triggered by drugs known to induce hepatocyte toxicity. We selected two hepatotoxic fungicides, the thioacetamide-inducing centrolobular hepatocyte necrosis in vivo [33–35] and the mancozeb triggering necrosis/apoptosis in rat liver [36] and in HepG2 hepatoma cells [37].

In order to determine whether these two compounds induce the cell death of differentiated HepaRG cells, the morphological alterations were monitored and a cell viability was assayed by measuring the ATP content following treatments by increasing the concentrations of thioacetamide and mancozeb (Figure 5). Twenty-four hours after exposure to 2.5 μ M or higher concentrations of mancozeb, colonies of hepatocyte-like HepaRG cells were disrupted with cells that rounded up while cholangiocyte-like cells remained adherent (Figure 5A). This observation suggested a selective hepatocyte toxicity induced by the mancozeb. This conclusion was strengthened by the dose-dependent decrease in ATP content at 2.5 and 7 μ M with a half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) at 5 μ M \pm 0.5 (Figure 5B). The highest dose of 22.5 μ M did not further reduce the ATP content, confirming that a large fraction of the HepaRG cell population was resistant to very high doses of mancozeb. In contrast, the thioacetamide induced a dose-dependent decrease in ATP content leading to complete cell death of all the HepaRG cells for concentrations higher than 100 mM, demonstrating that thioacetamide triggers cell death of both cholangiocytes- and hepatocyte-like HepaRG cells (Figure 5A).

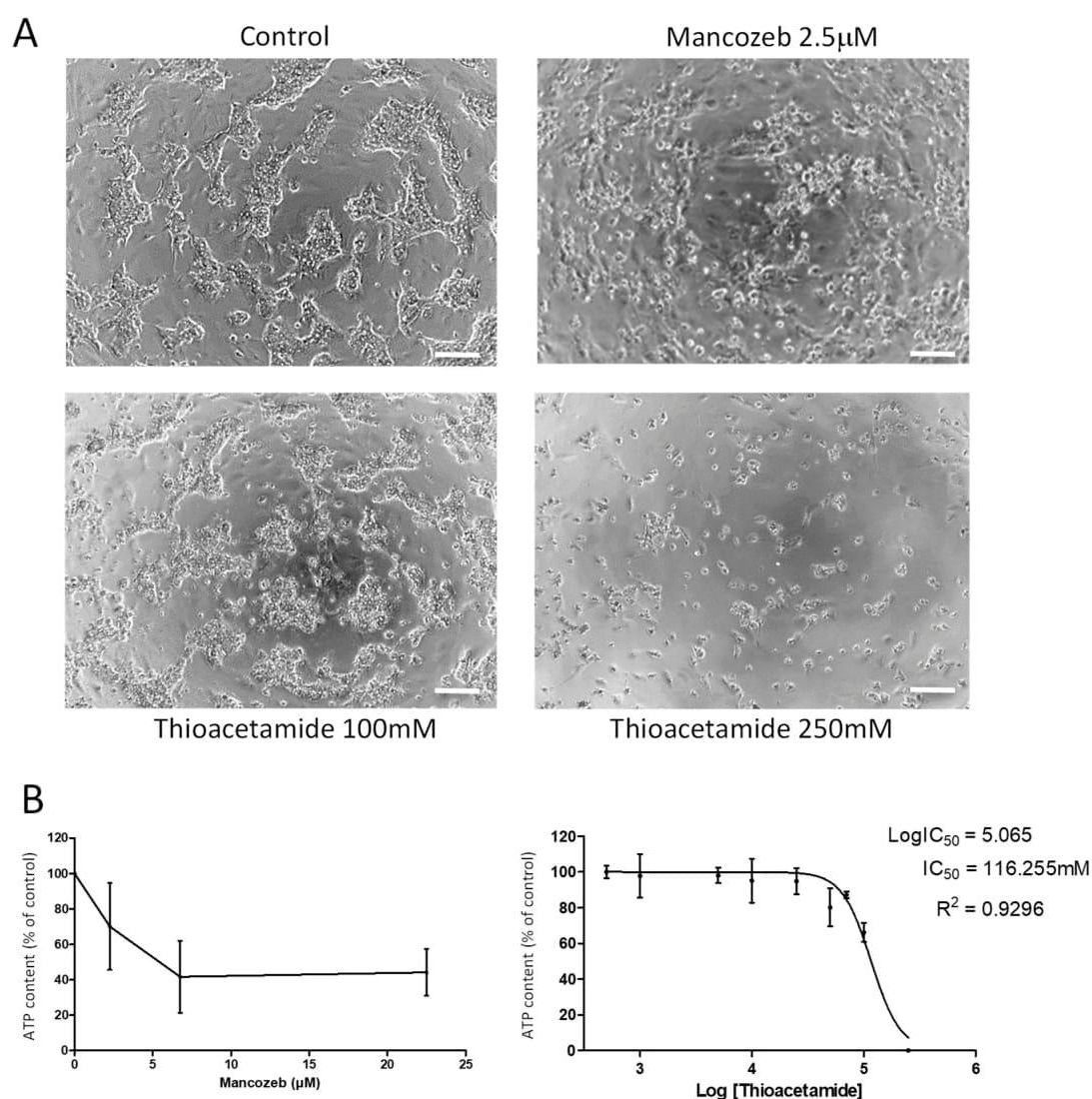


Figure 5. Viability of differentiated HepaRG cells upon treatment by thioacetamide and mancozeb. Viability of HepaRG cells following a 24 h exposure to various concentrations of thioacetamide (1 to 250 mM) and mancozeb (2.5, 5 and 22.5 μM) was evaluated by phase contrast microscopy (A) and by measuring the relative ATP content compared to untreated control cultures (B).

To further evaluate whether the promCYP1A1/2-, CYP2B6- and CYP3A4-GFP biosensor HepaRG cells could be used to detect selective hepatocyte cytotoxicity, differentiated HepaRG cell cultures were then treated with mancozeb for 24 h and the GFP expression was visualized by fluorescence microscopy (Figure 6) and quantified by flow cytometry (Figure 7). As previously observed (Figure 5), the mancozeb induced a strong alteration of hepatocyte-like HepaRG cell colonies visible in phase contrast and fluorescence microscopy with a reduction of the GFP expression in promCYP1A1/2-, promCYP2B6- and promCYP3A4-GFP biosensor cells (Figure 6A–C and Figure 7A–C). Quantification by flow cytometry showed a 40 to 50% decrease in GFP mRNA expression levels and fluorescence intensity in mancozeb-treated GFP biosensor cells (Figure 7). The decrease in GFP expression also correlated with the strong reduction in the mRNA expression levels of endogenous hepatocyte-specific genes CYP3A4 and CYP2E1 following exposure to mancozeb in the GFP-biosensor HepaRG cells. In contrast, the mRNA expression levels of the cytokeratin 19, which are expressed at higher levels in cholangiocytes- than in hepatocyte-like HepaRG cells [13], did not decrease upon treatment by mancozeb (Figure 7).

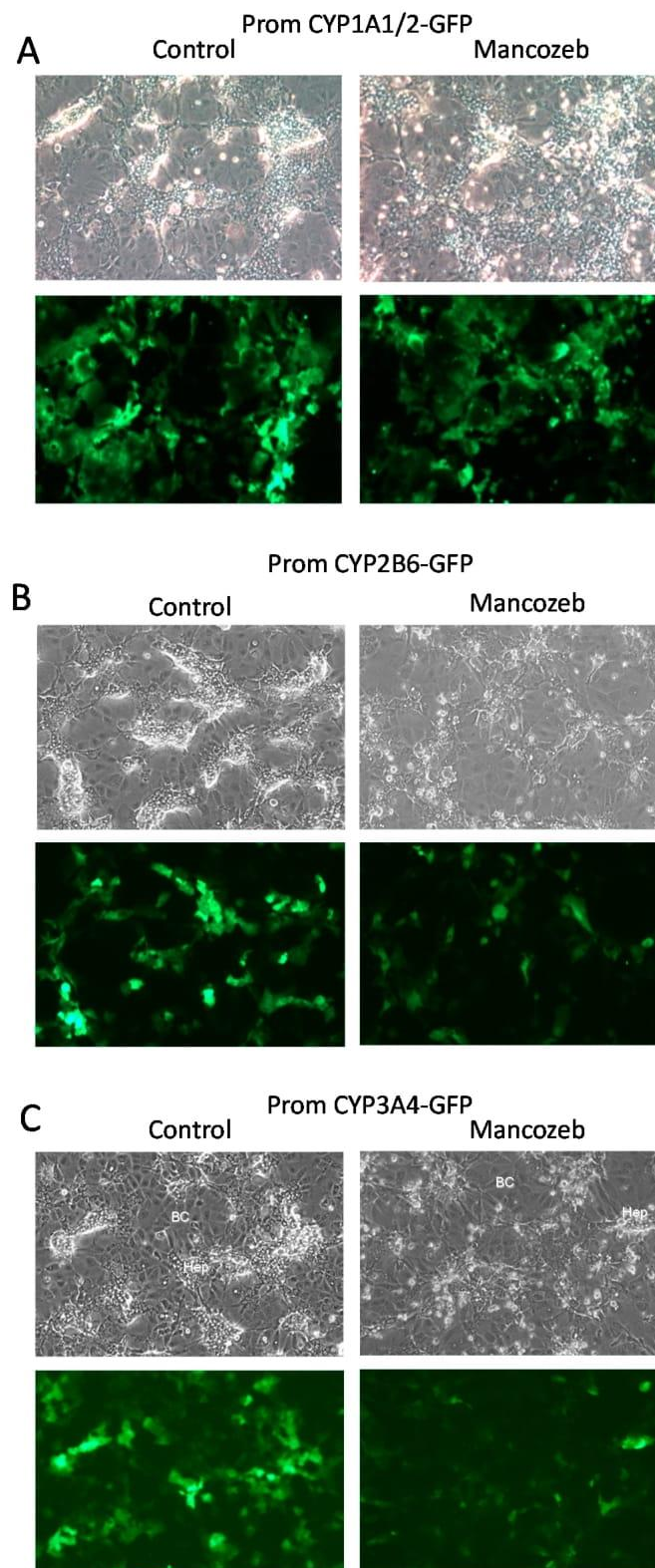


Figure 6. Selective toxicity of the mancozeb towards CYP-GFP biosensor hepatocyte-like HepaRG cells. Phase contrast microscopy (upper panels) and detection of GFP by fluorescence microscopy (lower panels) in promCYP1A1/2 (A), promCYP2B6 (B) and promCYP3A4 (C) biosensor HepaRG cells exposed to mancozeb for 24 h. Scale bar: 400 μ m. BC: biliary- or cholangiocytes-like cells, Hep: hepatocyte-like HepaRG cells.

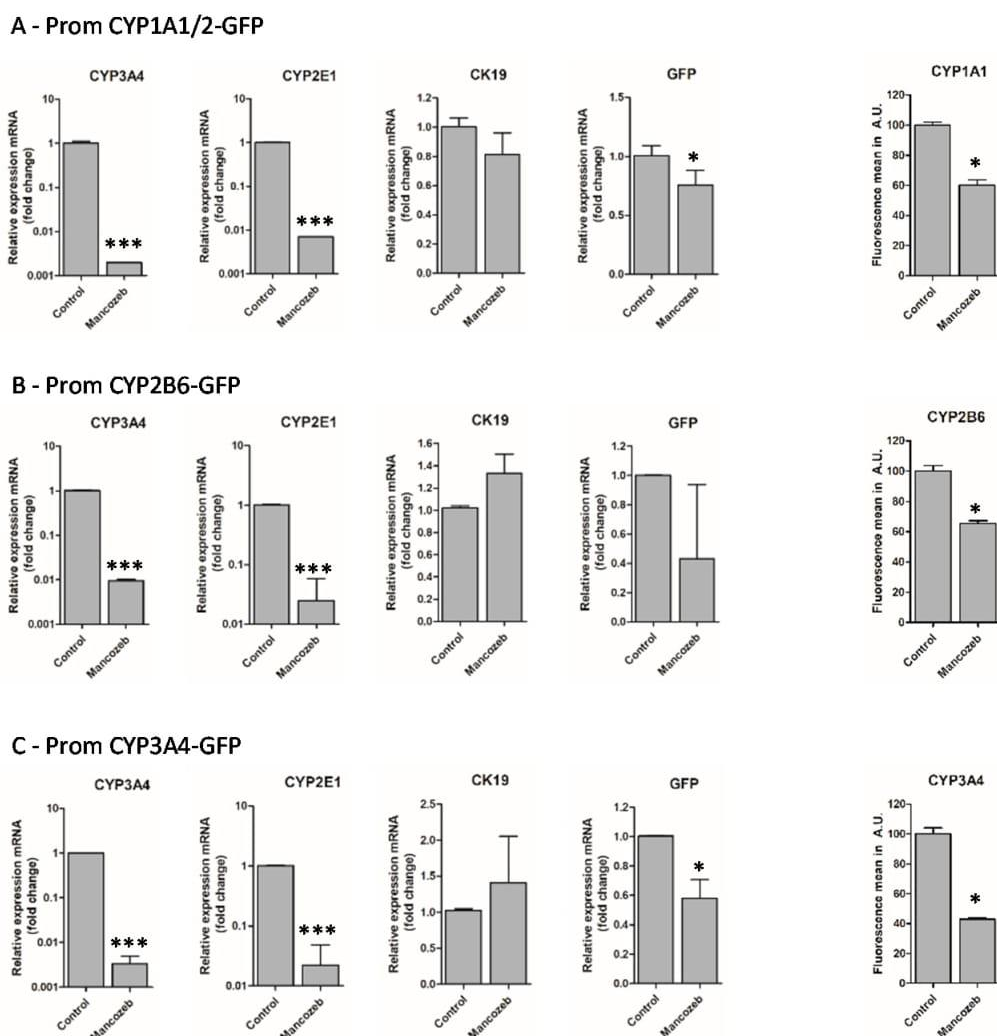


Figure 7. Selective toxicity of toxic compounds towards hepatocyte-like HepaRG cells. The mRNA expression levels of endogenous CYP3A4, CYP2E1, cytokeratin 19 (CK19) and GFP were evaluated by RT-qPCR, and the GFP fluorescence intensities were measured by flow cytometry in promCYP1A1/2- (A), promCYP2B6- (B) and promCYP3A4 (C) biosensor HepaRG cells either untreated (control cells) or exposed to mancozeb for 24 h. The mRNA expression levels in control cells were arbitrarily set as 1 while the mean of fluorescence in control cells was set as 100%. Statistics: * p value < 0.005, *** p < 0.001.

These data indicated that mancozeb induced cell death preferentially in promCYP1A1/2-, promCYP2B6- and promCYP3A4-GFP biosensor hepatocyte-like HepaRG cells while cholangiocyte-like cells showed no major morphological changes.

4. Discussion

The most relevant feature of the hepatocyte-like HepaRG cells is their remarkable levels of expression of most specific liver functions since nearly 90% of the genes found expressed in primary culture of human hepatocytes are also expressed in differentiated HepaRG cells [38]. In addition, these cells exhibit a high metabolism capacity with very active mitochondrial oxidative phosphorylation [39] and xenobiotic metabolism [22,40,41]. This unique cell model has been used to develop whole cell biosensors [21,26,27] for studying gene inductions activation of the hepatic metabolic pathway and cytotoxicity. We have also recently developed an original transfection procedure to efficiently introduced exogenous DNA in hepatocyte-like HepaRG cells [42]. This protocol was used to transfect in differentiated HepaRG-like hepatocytes a biosensor plasmid expressing the luciferase reporter gene under the transcriptional control of a consensus Xenobiotic Responsive Element motif and a minimal promoter. This transgene transiently expressed was able to sensor the induction of the Xenobiotic

Responsive Element (XRE) following treatments by the drug-activating transcription factor, binding to the consensus xenobiotic responsive element sequence through the detection of luciferase activities [42].

This initial study prompted us to develop new biosensor HepaRG cell lines. Because of the raising interest in hepatocyte-like HepaRG cells for drug metabolism studies [40,41] and for analyzing the process of differentiation from hepatic progenitors towards hepatocytes, we herein report the establishment of three recombinant HepaRG cell lines that express the GFP under the transcriptional control of partial promoters of CYP1A1/2, CYP2B6 and CYP3A4 genes. We demonstrated that the CYP-GFP transgenes and the corresponding endogenous CYP genes shared similar expression patterns during proliferation and differentiation of HepaRG cells. As expected, differentiated hepatocyte-like HepaRG cells expressed GFP at higher levels compared to cholangiocyte-like cells. The prototypical drug-inducers benzo(a)pyrene and phenobarbital trigger the induction of GFP expression in prom-CYP biosensor HepaRG cells, which, however, remained in much lower magnitudes compared to the strong increases in mRNA levels of corresponding endogenous CYP genes detected by RT-qPCR. We and others have previously reported similar levels of inductions (3- to 10-fold) of such reporter genes [26,27,42]. These limited induction rates can be explained by the use of partial promoter gene sequences that most likely lack some of the regulatory elements such as distant enhancer sequences. In addition, the loci of the transgene insertions may also play an important role in the transcriptional regulation of the reporter gene. Furthermore, the CYP1A1/2-, CYP2B6- and CYP3A4-GFP biosensor HepaRG lines established in our study are pools of GFP positive cells. Individual clones could be further derived to isolate cells with higher rates of induction by drugs. Nevertheless, the pattern of GFP expression during differentiation of HepaRG cells correlated well with the expression of endogenous CYP proteins, and the induction by drugs observed in CYP1A1-, CYP2B6- and CYP3A4-GFP biosensor HepaRG cells was reproducible.

We also used the differentiated CYP-GFP biosensor HepaRG cells to evidence that the mancozeb triggered selective cytotoxicity of hepatocyte-like cells while cholangiocyte-like cells were not strongly affected by the treatment. In contrast, the thioacetamide induced a strong cytotoxicity towards both hepatocyte- and cholangiocyte-like HepaRG cells as previously reported *in vivo* and *in vitro* in primary cultures of rat hepatocytes [34,35].

These HepaRG cell-based biosensor systems present two major advantages. The CYP-GFP biosensor transgenes are integrated in the genome of HepaRG cells, leading to stable GFP expressions in these metabolically competent hepatoma cells that allow for the detection of the indirect-acting compounds on CYP expression without the use of exogenous metabolic activation. In addition, the variations in GFP fluorescence intensities of the GFP can be performed either by direct *in situ* fluorimetry quantification in culture microplates or by flow cytometry, which provide in both cases easy handling and data acquisition.

Together, our data demonstrated that the novel transgenic biosensor HepaRG cells described in this manuscript could be pertinent cell models for potential applications in the evaluation of xenobiotic safety and the assessment of drug hepatotoxicity. Further experiments are currently in progress to assess the inductibility of the CYP-GFP biosensor cells upon stimulation by other canonical inducers and to study the selective cytotoxicity of a larger collection of pesticides and environmental contaminants that were shown to induce genotoxicity in HepaRG cells [23].

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/1424-8220/19/10/2245/s1>, Figure S1.

Author Contributions: C.R. (Claudine Rauch) has subcloned promoter gene DNA sequences; N.Q. and H.D.-P.S. have performed lentiviral infections of progenitor HepaRG cells and established the recombinant cell lines, C.R. (Catherine Ribault) has performed western blots, M.V. analyzed fluorescence intensities by flow cytometry and performed RT-qPCR, Y.V. and K.P. studied the cytotoxicity of thioacetamide and mancozeb; F.M., M.-A.R. and A.C. obtained the funding and were involved in conceptualization; P.L. designed the methodology, analyzed the data and supervised the writing and submission.

Funding: This work was funded by the Agence Nationale de la Recherche (ANR) [contract NISTEC ANR-09-CESA-003-002], the Institut National de la santé et de la Recherche Médicale (Inserm, France), the

European Commission FP7 program “LIV-ES” (HEALTH-F5-2008-223317) and the Cancéropôle Grand-Ouest (réseau Niche Tumorale, projet PeNiCa).

Acknowledgments: Nicolas Quesnot received a fellowship from the Région Bretagne and Ligue contre le Cancer (Comité Départemental des Côtes d’Armor). We would like to thank Jean-Marc Pascussi (INSERM U1191, CNRS UMR 5203, Institut de Génétique Fonctionnelle, Montpellier, France) for providing us the CYP3A4 promoter sequence. We also thank the Vectalys Company (Toulouse, France) for the subcloning in lentiviral expression vectors and the production of lentivirus infectious particles and the cytometry core facility of the Biology and Health Federative research structure Biosit (Rennes, France) for technical support. The authors would like to dedicate this article to Marie-Anne Robin and Fabrice Morel who passed away during the preparation of the manuscript. Our colleagues were exceptional scientists and friends whose enthusiasm for life and belief in science will continue to inspire all of us who were privileged to know them.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Guillouzo, A.; Guguen-Guillouzo, C. Evolving concepts in liver tissue modeling and implications for in vitro toxicology. *Expert Opin. Drug. Metab. Toxicol.* **2008**, *4*, 1279–1294. [[CrossRef](#)]
2. Lasser, K.E.; Allen, P.D.; Woolhandler, S.J.; Himmelstein, D.U.; Wolfe, S.M.; Bor, D.H. Timing of new black box warnings and withdrawal for prescription medications. *JAMA* **2002**, *287*, 2215–2220. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Suter, W. Predictive value of in vitro safety studies. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 362–366. [[CrossRef](#)]
4. Quesnot, N. Evaluation de la génotoxicité des contaminants environnementaux, production de lignées bio-senseurs et mesure de l’activité enzymatique du cytochrome P450 2E1 dans les cellules d’hépatome HepaRG. Ph.D. Thesis, Philosophy, University of Rennes 1, Rennes, France, 30 April 2015.
5. Vinken, M.; Hengstler, J.G. Characterization of hepatocyte-based in vitro systems for reliable toxicity testing. *Arch. Toxicol.* **2018**, *92*, 2981–2986. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Audebert, M.; Riu, A.; Jacques, C.; Hillenweck, A.; Jamin, E.L.; Zalko, D.; Cravedi, J.-P. Use of the H2AX assay for assessing the genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in human cell lines. *Toxicol. Lett.* **2010**, *199*, 182–192. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Wilkening, S.; Stahl, F.; Bader, A. Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metab. Dispos.* **2003**, *31*, 1035–1042. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Glaise, D.; Ilyin, G.P.; Loyer, P.; Cariou, S.; Bilodeau, M.; Lucas, J.; Puisieux, A.; Ozturk, M.; Guguen-Guillouzo, C. Cell cycle gene regulation in reversibly differentiated new human hepatoma cell line. *Cell Growth Differ.* **1998**, *9*, 165–176. [[PubMed](#)]
9. Kelly, J.H. Permanent Human Hepatocyte Cell Line and Its Use in a Liver Assist Device (LAD). U.S. Patent No. 5,290,684, 1 March 1994.
10. Hashizume, T.; Yoshitomi, S.; Asahi, S.; Uematsu, R.; Matsumura, S.; Chatani, F.; Oda, H. Advantages of human hepatocyte-derived transformants expressing a series of human cytochrome P450 isoforms for genotoxicity examination. *Toxicol. Sci.* **2010**, *116*, 488–497. [[CrossRef](#)]
11. Jover, R.; Bort, R.; Gomez-Lechon, M.J.; Castell, J.V. Re-expression of C/EBP alpha induces CYP2B6, CYP2C9 and CYP2D6 genes in HepG2 cells. *FEBS Lett.* **1998**, *431*, 227–230. [[CrossRef](#)]
12. Gripon, P.; Rumin, S.; Urban, S.; Le Seyec, J.; Glaise, D.; Cannie, I.; Guyomard, C.; Lucas, J.; Trepo, C.; Guguen-Guillouzo, C. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 15655–15660. [[CrossRef](#)]
13. Cerec, V.; Glaise, D.; Garnier, D.; Morosan, S.; Turlin, B.; Drenou, B.; Gripon, P.; Kremsdorf, D.; Guguen-Guillouzo, C.; Corlu, A. Transdifferentiation of hepatocyte-like cells from the human hepatoma HepaRG cell line through bipotent progenitor. *Hepatology* **2007**, *45*, 957–967. [[CrossRef](#)]
14. Dubois-Pot-Schneider, H.; Fekir, K.; Coulouarn, C.; Glaise, D.; Aninat, C.; Jouarnen, K.; Le Guével, R.; Kubo, T.; Ishida, S.; Morel, F.; et al. Inflammatory cytokines promote the retrodifferentiation of tumor-derived hepatocyte-like cells to progenitor cells. *Hepatology* **2014**, *60*, 2077–2090. [[CrossRef](#)]
15. Aninat, C.; Piton, A.; Glaise, D.; Le Charpentier, T.; Langouet, S.; Morel, F.; Guguen-Guillouzo, C.; Guillouzo, A. Expression of cytochrome P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG cells. *Drug Metab. Dispos.* **2006**, *34*, 75–83. [[CrossRef](#)]

16. Le Vee, M.; Noel, G.; Jouan, E.; Stieger, B.; Fardel, O. Polarized expression of drug transporters in differentiated human hepatoma HepaRG cells. *Toxicol. In Vitro* **2013**, *27*, 1979–1986. [[CrossRef](#)]
17. Quesnot, N.; Bucher, S.; Gade, C.; Vlach, M.; Vène, E.; Valenca, S.; Gicquel, T.; Holst, H.; Robin, M.-A.; Loyer, P. Production of chlorzoxazone glucuronides via cytochrome P450E1 dependent and independent pathways in human hepatocytes. *Arch. Toxicol.* **2018**, *92*, 3077–3091. [[CrossRef](#)]
18. Dumont, J.; Jossé, R.; Lambert, C.; Anthérieu, S.; Laurent, V.; Loyer, P.; Robin, M.-A.; Guillouzo, A. Preferential induction of the AhR gene battery in HepaRG cells after a single or repeated exposure to heterocyclic aromatic amines. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2010**, *249*, 91–100. [[CrossRef](#)]
19. Legendre, C.; Hori, T.; Loyer, P.; Aninat, C.; Ishida, S.; Glaise, D.; Lucas-Clerc, C.; Boudjema, K.; Guguen-Guillouzo, C.; Corlu, A.; et al. Drug-metabolising enzymes are down-regulated by hypoxia in differentiated human hepatoma HepaRG cells: HIF1-alpha involvement in CYP3A4 repression. *Eur. J. Cancer* **2009**, *12*, 2882–2892. [[CrossRef](#)]
20. Jossé, R.; Aninat, C.; Glaise, D.; Dumont, J.; Fessard, V.; Morel, F.; Poul, J.M.; Guguen-Guillouzo, C.; Guillouzo, A. Long-term functional stability of HepaRG hepatocytes and use for chronic toxicity and genotoxicity studies. *Drug Metab. Dispos.* **2008**, *36*, 1111–1118. [[CrossRef](#)]
21. Pernelle, K.; Le Guevel, R.; Glaise, D.; Stasio, C.G.; Le Charpentier, T.; Bouaita, B.; Corlu, A.; Guguen-Guillouzo, C. Automated detection of hepatotoxic compounds in human hepatocytes using HepaRG cells and image-based analysis of mitochondrial dysfunction using JC-1 dye. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2011**, *254*, 256–266. [[CrossRef](#)]
22. Jetten, M.J.A.; Kleinjans, J.C.S.; Claessen, S.M.; Chesné, C.; van Delft, J.H.M. Baseline and genotoxic compound induced gene expression profiles in HepG2 and HepaRG compared to primary human hepatocytes. *Toxicol. In Vitro* **2013**, *27*, 2031–2040. [[CrossRef](#)]
23. Quesnot, N.; Rondel, K.; Martinais, S.; Audebert, M.; Glaise, D.; Morel, F.; Loyer, P.; Robin, M.-A. Evaluation of genotoxicity using automated detection of gammaH2AX in metabolically competent HepaRG cells. *Mutagenesis* **2016**, *31*, 43–50.
24. Abdel-Razzak, Z.; Loyer, P.; Fautrel, A.; Gautier, J.-C.; Corcos, L.; Turlin, B.; Beaune, P.; Guillouzo, A. Cytokines down-regulate major cytochrome P450 in primary culture of human hepatocytes. *Mol. Pharmacol.* **1993**, *44*, 707–715. [[PubMed](#)]
25. Langouet, S.; Corcos, L.; Abdel-Razzak, Z.; Loyer, P.; Ketterer, B.; Guillouzo, A. Up regulation of glutathione S-transferases alpha by interleukin 4 in human hepatocytes in primary culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, *216*, 793–800. [[CrossRef](#)]
26. Tsuji, S.; Kawamura, F.; Hayashi, A.; Ohbayashi, T.; Kazuki, Y.; Chesné, C.; Oshimura, M.; Tada, M. Dual-color fluorescence imaging to monitor CYP3A4 and CYP3A7 expression in human hepatic carcinoma HepG2 and HepaRG cells. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e104123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Ueyama, T.; Tsuji, S.; Tada, M. Fluorometric evaluation of CYP3A4 expression using improved transgenic HepaRG cells carrying a dual-colour reporter for CYP3A4 and CYP3A7. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 2874. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Casabar, R.C.; Das, P.C.; Dekrey, G.K.; Gardiner, C.S.; Cao, Y.; Rose, R.L.; Wallace, A.D. Endosulfan induces CYP2B6 and CYP3A4 by activating the pregnane X receptor. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2010**, *245*, 335–343. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Blagus, T.; Zager, V.; Cemazar, M.; Sersa, G.; Kamensek, U.; Zegura, B.; Nunic, J.; Filipic, M. A cell-based biosensor system HepG2CDKN1A-DsRed for rapid and simple detection of genotoxic agents. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *64*, 102–111. [[CrossRef](#)]
30. Corlu, A.; Loyer, P. Culture conditions promoting hepatocyte proliferation and cell cycle synchronization. In *Protocols in In Vitro Hepatocyte Research*; Rogiers, V., Vinken, M., Eds.; Methods in Molecular Biology; Humana Press: New York, NY, USA, 2015; Volume 1250, pp. 27–51.
31. Piton, A.; Rauch, C.; Langouet, S.; Guillouzo, A.; Morel, F. Involvement of pregnane X receptor in the regulation of CYP2B6 gene expression by oltipraz in human hepatocytes. *Toxicol. In Vitro* **2010**, *24*, 452–459. [[CrossRef](#)]
32. Ayed-Boussema, I.; Pascussi, J.-M.; Maurel, P.; Bacha, H.; Hassen, W. Zearalenone activates pregnane X receptor, constitutive androstane receptor and aryl hydrocarbon receptor and corresponding phase I target genes mRNA in primary cultures of human hepatocytes. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2011**, *31*, 79–87. [[CrossRef](#)]

33. Gilot, D.; Loyer, P.; Corlu, A.; Glaise, D.; Lagadic-Gossmann, D.; Atfi, A.; Morel, F.; Ichijo, H.; Guguen-Guillouzo, C. Liver protection from apoptosis requires both blockage of initiator caspase activities and inhibition of ASK1/JNK pathway via glutathione S-transferase regulation. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 49220–49229. [[CrossRef](#)]
34. Staňková, P.; Kučera, O.; Lotková, H.; Roušar, T.; Endlicher, R.; Cervinková, Z. The toxic effect of thioacetamide on rat liver in vitro. *Toxicol. In Vitro* **2010**, *24*, 2097–2103. [[CrossRef](#)]
35. Hajovsky, H.; Hu, G.; Koen, Y.; Sarma, D.; Cui, W.; Moore, D.S.; Staudinger, J.L.; Hanzlik, R. Metabolism and toxicity of thioacetamide and thioacetamide S-oxide in rat hepatocytes. *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, *25*, 1955–1963. [[CrossRef](#)]
36. Adjrah, Y.; Karou, S.D.; Agbonon, A.; Eklugadegbeku, K.; de Souza, C.; Gbeassor, M. Toxicological assessment of effect of mancozeb-treated lettuce (*Lactuca sativa*) on wistar rat liver. *Ethiop. J. Environ. Stud. Manag.* **2013**, *6*, 67–73.
37. Pirozzi, A.V.; Stellavato, A.; La Gatta, A.; Lamberti, M.; Schiraldi, C. Mancozeb, a fungicide routinely used in agriculture, worsens nonalcoholic fatty liver disease in the human HepG2 cell model. *Toxicol. Lett.* **2016**, *249*, 1–4. [[CrossRef](#)]
38. Rogue, A.; Lambert, C.; Spire, C.; Claude, N.; Guillouzo, A. Interindividual variability in gene expression profiles in human hepatocytes and comparison with HepaRG cells. *Drug Metab. Dispos.* **2012**, *40*, 151–158. [[CrossRef](#)]
39. Peyta, L.; Jarnouen, K.; Pinault, M.; Guimaraes, C.; Pais de Barros, J.P.; Chevalier, S.; Dumas, J.F.; Maillot, F.; Hatch, G.M.; Loyer, P.; et al. Reduced cardiolipin content decreases respiratory chain capacities and increases ATP synthesis yield in the human HepaRG cells. *Biochim. Biophys. Acta* **2016**, *1857*, 443–453. [[CrossRef](#)]
40. Kanebratt, K.P.; Andersson, T.B. Evaluation of HepaRG cells as an in vitro model for human drug metabolism studies. *Drug Metab. Dispos.* **2008**, *36*, 1444–1452. [[CrossRef](#)]
41. Anthérieu, S.; Chesné, C.; Li, R.; Guguen-Guillouzo, C.; Guillouzo, A. Optimization of the HepaRG cell model for drug metabolism and toxicity studies. *Toxicol. In Vitro* **2012**, *26*, 1278–1285. [[CrossRef](#)]
42. Demazeau, M.; Quesnot, N.; Ripoché, N.; Rauch, C.; Jeftić, J.; Morel, F.; Gauffre, F.; Benvegna, T.; Loyer, P. Efficient transfection of Xenobiotic Responsive Element-biosensor plasmid using diether lipid and phosphatidylcholine liposomes in differentiated HepaRG cells. *Int. J. Pharm.* **2017**, *524*, 268–278. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



Non-oxidative ethanol metabolism in human hepatic cells *in vitro*: Involvement of uridine diphospho-glucuronosyltransferase 1A9 in ethylglucuronide production



Chloé Hugbart^{a,b}, Yann Verres^a, Brendan Le Daré^{a,c}, Simon Bucher^a, Elise Vène^a, Aude Bodin^a, Vincent Lagente^a, Bernard Fromenty^a, Renaud Bouvet^{b,d}, Isabelle Morel^{a,c}, Pascal Loyer^{a,*}, Thomas Gicquel^{a,c,*}

^a Univ Rennes, INSERM, INRAE, Institut NuMeCan (Nutrition, Metabolisms and Cancer) UMR-A 1341, UMR-S 1241, F-35000 Rennes, France

^b CHU Rennes, Service de médecine légale, F-35000 Rennes, France

^c CHU Rennes, Laboratoire de toxicologie médico-légale, F-35000 Rennes, France

^d Univ Rennes, IDPSP-EA 4640, F-35000 Rennes, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Ethanol
Ethylglucuronide
Ethylsulfate
Hepatocytes
Uridine diphospho-glucuronosyltransferase
Sulfotransferase

ABSTRACT

Ethanol is the most frequently psychoactive substance used in the world, leading to major public health problems with several millions of deaths attributed to alcohol consumption each year. Metabolism of ethanol occurs mainly in the liver via the predominant oxidative metabolism pathway involving phase I enzymes including alcohol dehydrogenases (ADH), cytochrome P450 (CYP) 2E1 and catalase. In a lesser extent, an alternative non-oxidative pathway also contributes to the metabolism of ethanol, which involves the uridine diphospho-glucuronosyltransferase (UGT) and sulfotransferase (SULT) phase II enzymes. Using liquid chromatography-high resolution mass spectrometry, ethylglucuronide (EtG) and ethylsulfate (EtS) produced respectively by UGT and SULT conjugation and detected in various biological samples are direct markers of alcohol consumption. We report herein the efficient non-oxidative metabolic pathway of ethanol in human differentiated HepaRG cells compared to primary human hepatocytes (HH). We showed dose- and time-dependent production of EtS and EtG after ethanol (25 or 50 mM) treatment in culture media of differentiated HepaRG cells and HH and a significant induction of CYP2E1 mRNA expression upon acute ethanol exposure in HepaRG cells. These differentiated hepatoma cells thus represent a suitable *in vitro* human liver cell model to explore ethanol metabolism and more particularly EtG and EtS production. In addition, using recombinant HepG2 cells expressing different UGT1A genes, we found that UGT1A9 was the major UGT involved in ethanol glucuronidation.

1. Introduction

Ethanol is the most consumed legal drug worldwide and is considered to be the third leading cause of death in the United States (Nutt et al., 2007). Chronic excessive consumption of ethanol is associated with multi-organ toxicities, including hepatic, neurologic, cardiovascular or hematologic disorders (Bühler and Mann, 2011; Smith et al., 2015; Osna et al., 2017; Obad et al., 2018; Le Daré et al., 2019). Alcohol is also involved in carcinogenesis of mouth, esophageal, hepatic, colic and breast cancer (Seitz and Stickel, 2007). Thus, the mortality

attributed to alcohol is mainly related to cancer, cirrhosis, road accidents, psychoses, and dependencies (Guérin et al., 2013).

In humans, ethanol is mainly metabolized through oxidative pathways in hepatocytes. Ethanol is initially oxidized into acetaldehyde by three enzymatic pathways located in different cellular compartments. This predominant phase I metabolism occurs in the cytosol via alcohol dehydrogenases (ADHs) but ethanol can also be metabolized by cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) in the endoplasmic reticulum membrane (and to a lesser extent in mitochondria) and by catalase located in peroxisomes. Acetaldehyde is then oxidized by acetaldehyde

Abbreviations: BSA, bovine serum albumin; CYP, cytochrome P450; LC-HRMS, liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry; UGT, UDP-glucuronosyltransferase; SULT, sulfotransferase; CHZ, chlorzoxazone; EtG, ethylglucuronide; EtS, ethylsulfate; CHZ-O-Glc, CHZ-O-glucuronide; OH-CHZ, 6-hydroxy-CHZ; HH, human hepatocytes

* Corresponding authors at: Univ Rennes, INSERM, INRAE, Institut NuMeCan (Nutrition, Metabolisms and Cancer), 2 Rue Henri le Guilloux, 35000 Rennes, France

E-mail addresses: pascal.loyer@univ-rennes1.fr (P. Loyer), thomas.gicquel@chu-rennes.fr (T. Gicquel).

<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104842>

Received 28 October 2019; Received in revised form 27 March 2020; Accepted 2 April 2020

Available online 10 April 2020

0887-2333/© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

dehydrogenase (ALDH), xanthine oxidase (XO) and aldehyde oxidase (AO) to produce acetate, which is released into the bloodstream and finally oxidized in carbon dioxide and water by tricarboxylic acid cycle (Zakhari, 2006; Cederbaum, 2012) (Supporting information 1A). Interestingly, ADH and ALDH show different characteristics depending on their genetic variants, which influence ethanol consumption and metabolism (Edenberg, 2007). For example, ADH genotypes have been associated with differences in alcohol consumption and subjects with an ADH2*2 allele (highly active enzyme) have a decreased risk of alcoholism (Borràs et al., 2000). Also, in eastern Asia, 15–40% of the population have inactive ALDH2 isoenzymes and thus acetaldehyde levels are 5 to 20 times higher in these subjects than in individuals with active isoenzymes (Cederbaum, 2012). Therefore, the resulting accumulation of acetaldehyde would be responsible for the lower tolerance to alcohol in these populations compared to the Caucasian population.

Besides this oxidative pathway, ethanol undergoes metabolism through the so-called non-oxidative pathway generating fatty acid ethyl esters (FAEE), phosphatidylethanol (PEth), ethylsulfate (EtS) and ethylglucuronide (EtG) (Kaphalia et al., 2004; Foti and Fisher, 2005; Helander and Beck, 2005). EtG and EtS are stable, non-volatile and water-soluble phase II metabolites produced by direct conjugation of ethanol to glucuronic acid *via* uridine diphospho-glucuronosyl-transferases (UGTs) and to sulfate *via* cytosolic sulfotransferases (SULTs), respectively (Cabarcos et al., 2015) (Supporting information 1B). Notably, phase II conjugation enzymes exhibit a low affinity towards ethanol, which limits the contribution of this alternative pathway in the overall metabolism of this molecule (Cederbaum, 2012). Although EtG and EtS are minor metabolites corresponding to less than 1% of ethanol excreted in urine (Dahl et al., 2002; Ingall, 2012; Cabarcos et al., 2015), these stable compounds are reliable markers of ethanol consumption, particularly interesting given their sensitivity and specificity.

Indeed, their detection in blood or urine confirms recent ethanol consumption even at low doses (Foti and Fisher, 2005; Helander and Beck, 2005). Detection and quantification of these biomarkers are routinely used in clinical practice for evaluation, screening and diagnosis of patients with excessive ethanol consumption, as well as for monitoring abstinence (Ingall, 2012) and forensic sciences (Andresen-Streichert et al., 2018).

While many reports described the detection of EtG and EtS in hair and biological fluids for clinical use and forensic medicine, intrinsic or exogenous factors that may modulate ethanol metabolism and production of EtG and EtS are not well characterized. Among these putative factors, genetic polymorphisms of metabolic enzymes, chronic or occasional consumption, nutritional factors, co-exposure to xenobiotics and liver diseases are thought to regulate the non-oxidative metabolic pathways of ethanol as observed for most other xenobiotics. Similarly, identity of the liver enzymes involved in the non-oxidative transformation of ethanol remains debated. For instance, contradictory data have been reported regarding UGT family members exhibiting the highest catalytic activities for EtG production. While several UGTs are obviously involved in the production of EtG, it was first described that UGT1A1 and 2B7 were the most prevalent isoforms generating EtG in cell free assay using recombinant UGTs (Foti and Fisher, 2005). However, patients suffering from Gilbert's syndrome, a congenital metabolic disorder characterized with a decrease in UGT1A1 expression, show no differences in EtG formation following exposure to ethanol (Huppertz et al., 2015). Conversely, high rates of ethanol glucuronidation by UGT1A9 were reported using recombinant UGTs (Schwab and Skopp, 2014). These discrepancies indicate that additional studies are required to better identify the UGT family members involved in EtG production.

Human hepatocytes in primary culture are considered as a suitable *in vitro* model to study hepatic metabolism of xenobiotics. However, hepatocytes isolated from patients present important differences in metabolic activities and lose their phenotype over time (including their capacity for drug metabolism and toxicity). Therefore, studies often

combined different hepatic cell models including human hepatocytes in both 2D and 3D culture conditions and human hepatoma cell lines such as the differentiated HepaRG cells.

The HepaRG hepatoma cell line has emerged as a suitable alternative model to the use of human hepatocytes (Rogue et al., 2012). These cells differentiate into cholangiocyte- and hepatocyte-like cells in appropriate culture conditions (Cerec et al., 2007) and express most of the liver specific functions including the major CYPs (Aninat et al., 2006) and UGTs (Quesnot et al., 2018). In this context, the aim of this work was to evaluate the differentiated HepaRG cells for studying non-oxidative ethanol metabolism upon a single exposure that would mimic acute ethanol exposure in humans. For this purpose, we compared this metabolic pathway between HepaRG cells and human hepatocytes in primary culture through the quantification of EtG and EtS metabolites using Liquid Chromatography–High resolution–Mass spectrometry (LC-HRMS) following cell exposure to 25 and 50 mM ethanol corresponding to 1.15 and 2.30 g/L, respectively. Furthermore, expression of different SULT and UGT genes were investigated to study the capacity of ethanol to modulate their expression. Then, we brought further evidence that UGT1A1, UGT1A6 and more particularly UGT1A9, play a predominant role in EtG production.

2. Material and methods

2.1. Reagents

Ethanol and propan-1-ol were purchased from VWR International (Fontenay-sous-bois, France). EtG, EtS and their deuterated analogs (EtG-D5 and EtS-D5) were obtained from Promochem (Molsheim, France). Chlorzoxazone (CHZ) and 6-hydroxychlorzoxazone (OH-CHZ) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO). Chlorzoxazone β -d-Glucuronide (CHZ-O-Glc) was from Toronto Research Chemistry (Canada). Methanol was obtained from Fisher Scientific UK (Loughborough, UK). Phosphate-buffered saline (PBS), trypsin-EDTA and glutamine were purchased from Life Technologies (Paisley, UK). William's E medium (ref: 12551032) and William's E Medium without phenol red (ref: A12176–01) were purchased from Gibco (Thermo Fisher Scientific, Illkirch France). Penicillin and streptomycin were obtained from Life Technologies (Grand Island, NY). Fetal Bovine Serum (FBS) was purchased from Eurobio (Courtaboeuf, France) and from Hyclone™ GE Healthcare Life Sciences (Logan, UT). Hydrocortisone hemisuccinate was from Serb (Paris, France). Dimethyl sulfoxide (DMSO), formic acid, Minimum Essential Medium (MEM) culture medium and insulin were obtained from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO).

2.2. Cell cultures

2.2.1. HepaRG cells

Progenitor HepaRG cells were cultured as previously described (Aninat et al., 2006). Briefly, proliferating progenitor HepaRG cells were seeded at a density of 2.6×10^4 cells/cm² in 12-well plates and expanded in the following culture medium: William's E medium (A12176–01, Gibco) supplemented with 10% FBS, 50 U/mL penicillin, 50 μ g/mL streptomycin, 5 μ g/mL insulin, 2 mM glutamine, 50 μ M sodium hydrocortisone hemisuccinate. After 2 weeks, cells were quiescent and further cultured during two more weeks in the same medium supplemented with 2% DMSO in order to enhance differentiation and to obtain higher expression levels of liver specific functions in differentiated HepaRG hepatocyte-like cells. After 4 weeks, the cultures are differentiated in both cholangiocyte- and hepatocyte like cells (Cerec et al., 2007). The detection of ethylglucuronide and ethylsulfate was performed using this coculture model. To detect CHZ metabolites, cultures enriched in hepatocyte-like cells were used as previously described (Cerec et al., 2007; Corlu and Loyer, 2015).

2.2.2. Primary human hepatocytes

Primary human hepatocytes (HH) were obtained from the processing of biological samples through the Centre de Ressources Biologiques (CRB) Santé of Rennes BB-0033-00,056 under French legal guidelines and fulfilled the requirements of the institutional ethics committee. Cells were isolated by collagenase-perfusion of liver biopsies from adult donors (Guguen-Guillouzo et al., 1982) and these cells were plated at a density of $1.5 \times 10^5/\text{cm}^2$ and cultured in the same William's E medium than HepaRG cells supplemented with 2% of DMSO. Cells were used 4 days after plating.

2.2.3. Parental and recombinant HepG2 cells

HepG2 cells, obtained from American Tissue Culture Collection (ATCC, Los Altos, CA, USA) were seeded at a density of 6.6×10^4 cells/ cm^2 in 12-well plates in MEM Eagle medium supplemented with 10% FBS, 50 UI/mL penicillin, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin and 4 mM L-glutamine. The recombinant cells were derived from parental cells by transduction with lentiviral transgenes encoding the human CYP2E1, UGT1A1, UGT1A6 and UGT1A9 proteins, as previously described (Quesnot et al., 2018). All HepG2 cells were used 4 days after seeding.

2.2.4. Ethanol treatment

Ethanol was added at different times in culture medium of cells located in 2 wells at the center of 12-well plates while the other wells were kept empty. One mL of medium containing ethanol (25 mM and 50 mM corresponding respectively to 1.15 g/L and 2.30 g/L) was incubated with cells in incubator under 95% air/5% CO_2 at 37 °C. After treatment, supernatants were collected in order to be analyzed.

2.3. Ethanol quantification

Ethanol concentrations in culture medium of cells were quantified by headspace gas chromatography – flame ionization detector (HS-GC-FID). Analyses were performed on a Thermo Scientific TRACE 2000 GC including a TriPlus Headspace autosampler (Thermo Scientific). Data acquisition, peak integration and calibration were performed using the ChromQuest 5.0 software (ThermoScientific, San Jose, CA). Briefly, 200 μL of sample and 200 μL of propan-1-ol (internal standard) were added in headspace crimp vials and incubated during 20 min at 80 °C. GC separation was performed on a Innowax column (30 m \times 0.25 mm; 0.25 μm) (Interchim, Montluçon, France) at 40 °C with N_2 as mobile phase and detected at 250 °C by FID. This method quantified simultaneously ethanol, methanol and acetaldehyde in samples. Quality controls were passed each day.

2.4. Quantification of EtG and EtS

Culture medium of cells (90 μL) were supplemented with internal standards (EtG-D5, EtS-D5) and treated with 1000 μL of methanol. Samples were then vortexed, centrifugated for 10 min at 3000 g and supernatants were evaporated to dryness at 50 °C under a stream of nitrogen. Residues were dissolved in 100 μL of water and transferred for LC-HRMS analysis (Q Exactive[®], Thermo Fisher Scientific). LC separation was performed using a C18 Accucore column (100 mm \times 2.1, 2.6 μm) (ThermoScientific). The mobile phase used was H_2O LC-MS grade containing 0.1% (v/v) formic acid and was delivered at a flow rate of 500 $\mu\text{L}/\text{min}$ during 3 min in a thermostated column at 30 °C. Data were acquired in negative heated electrospray ionization mode coupled to Targeted SIM (Single Ion Monitoring) mode. The measured accurate m/z values of the ions were 124.9910, 130.0225, 221.0679 and 226.0994 for EtS, EtS-D5, EtG, and EtG-D5, respectively. Quantification was performed by extracting the exact mass of each of the protonated species using a 5 ppm extraction window. LC-HRMS method parameters are further detailed in the Supporting information 2.

2.5. Quantification of CHZ and its metabolites

To quantify CHZ and its metabolites, William's E medium without red phenol was used. To quantify OH-CHZ, enzymatic hydrolysis of CHZ-O-Glc was performed for 2 h at 37 °C and pH 5 with 200 IU of β -glucuronidase (Sigma Aldrich G0251).

Samples were analyzed by high pressure liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet (UV) detection at $\lambda = 284$ nm by injecting samples (40 μL) on an Agilent Series 1100 (Waldbronn, Germany) equipment with a 75 \times 3 mm Ace Excel 2 Super C18 column (ThermoFisher Scientific). Elution was performed with a constant flow rate of 0.7 mL/min using a linear gradient elution from 2 to 60% of acetonitrile for 10 min. The eluents were 0.1% acetic acid in water with 0.25% (m/v) of triethylamine hydrochloride.

2.5.1. Incubation medium used in experiments involving CHZ

In order to investigate UGT1A and CYP2E1 catalytic activity by competition between ethanol and CHZ, HepaRG cells were incubated with 300 μM CHZ in William's E culture medium without phenol red during 4 h prior to detection of the CHZ glucuronide (CHZ-O-Glc) with direct injection of culture media in HPLC column. HepaRG cells were incubated for 8 h with 300 μM CHZ and without or with 50 mM ethanol, and the CHZ-O-Glc production was analyzed by HPLC.

2.5.2. Pre-incubation medium of ethanol: Induction of CYP2E1 activity

In order to induce CYP2E1 expression prior to the evaluation of its activity in the presence of CHZ with or without ethanol, HepaRG cells were incubated during 48 h with William's E medium (1 \times) (A12176-01, Gibco) supplemented with 10% FBS, 50 U/mL penicillin, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ insulin, 2 mM glutamine, 50 μM sodium hydrocortisone hemisuccinate and 1% DMSO. Then, cells were incubated with 300 μM CHZ in William's E culture medium without phenol red alone during 4 h prior to detection of CHZ-O-Glc with direct injection of culture media in HPLC column.

2.6. Real-time quantitative Reverse Transcription PCR (RT-qPCR) analysis

After cells lysis, total RNAs were isolated using a Macherey-Nagel NucleoSpin[®] RNAII kit, according to the manufacturer's protocol. Total RNAs (0.5 μg) were reverse-transcribed into first-strand cDNAs using a High-Capacity cDNA Achieve Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA), according to the manufacturer's instructions. RNA quantity and purity were assessed with a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Nyxor Biotech, Paris, France). Real-time qPCR was performed using the fluorescent dye SYBR Green method, with SYBR Green PCR Master Mix in 384-well plates and the StepOnePlus[™] system (Applied Biosystems). Human GAPDH was used as the reference gene. Relative quantification values were expressed using the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method as fold changes of the target gene, normalized to the reference gene, and related to the expression level in control experiments (arbitrarily set to 1). The sequences of the forward and reverse primers used in this study are available in the Supporting information 3.

2.7. Statistical analysis

The results were expressed as means \pm standard error of the mean (SEM). Intergroup differences as a function of the treatment were analyzed in a one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's post-hoc test. When two parameters were concomitantly studied, intergroup differences were tested in a two-way ANOVA with Bonferroni post-hoc correction. All analyses were performed using Prism 5.0 software (Graphpad Software, La Jolla, CA). For each analysis, two sided p value less than 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. HepaRG cells as a cellular model to study ethanol metabolism

In order to study the non-oxidative metabolism of ethanol, we have chosen a model of acute ethanol exposure of differentiated HepaRG cells and HH since these two cell models are metabolically competent. Two different concentrations of ethanol (25 and 50 mM) were used. HepaRG cells were exposed for 8, 24, 48 and 72 h while hepatocytes were treated for 24 and 48 h because of their limited availability. Cells exposed to ethanol were maintained in a CO₂ incubator dedicated to this treatment while control cells were cultured in a separate incubator to avoid ethanol dispersion and cross-contamination between conditions.

We first evaluated four models of ethanol evaporation using 12-well plates with different settings in absence of cells (Supporting information 4). Model 1: wells with medium containing ethanol surrounded by empty wells. Model 2: wells with medium containing ethanol surrounded by wells containing PBS. Model 3: wells with medium containing ethanol surrounded by PBS supplemented with ethanol at the same concentration. Model 4: same model as model 3 but with plates sealed with parafilm. Ethanol evaporation was very different depending on the models (Supporting Information 4), although models 1 and 2 exhibited the same profile with ~20% of the initial ethanol concentration at 24 h, ~10% at 48 h and < 5% at 72 h. In model 3, ethanol evaporation was slowed down with ~75% of the initial ethanol levels at 24 h and ~40% at 72 h. In model 4, evaporation was even more slowed down in sealed wells. Indeed, ~30% of ethanol disappeared from the medium within 48 h and then the concentration remained stable.

We then performed experiments using the different models with HepaRG cells in the central wells. Indeed, considering the large variations between the different models regarding the remaining ethanol content in the culture media, we assessed LDH release and cellular ATP content in HepaRG cells cultured according to models 1, 3 and 4. We did not observe any LDH release from HepaRG cells at any time points or any concentrations (data not shown) suggesting no significant cytotoxicity. However, ethanol exposure induced a slight but significant decrease in cellular ATP content regardless of the different ethanol concentrations found in the culture media after evaporation in the 3 experimental settings (Supporting information 5).

In our study, *in vitro* ethanol concentrations of 25 mM (1.15 g/L) and 50 mM (2.3 g/L) were compatible with blood alcohol concentrations found in acute human consumption (Jones, 2010). In addition, evidence-based survey showed that human ethanol elimination rate ranged from 10 to 35 mg/100 mL/h (Jones, 2010), which leads to estimate the entire elimination of 2.3 g/L blood alcohol within ~23 h. Using model 1, in which ethanol decay resembled to that observed *in vivo* (Jones, 2010), we next studied ethanol elimination in absence and presence of HepaRG cells (Fig. 1A, B) and HH (Fig. 1C, D). In these conditions, our data showed that the decrease in ethanol content in the culture medium was mainly due to evaporation, although a significant reduction in ethanol concentrations was observed in culture wells containing cells compared to wells without cells. The decay curves were similar for both cell types and ethanol concentrations (25 and 50 mM) with a 4- to 5-fold decrease in ethanol contents at 24 h. At 48 h, ethanol concentration was < 3 mM and ethanol was barely detectable at 72 h. Taking into consideration our *in vitro* data and previous clinical investigations (Pizon et al., 2007; Jones, 2010), further experiments were carried out using experimental model 1.

It has been established many years ago that CYP2E1, mainly expressed in hepatocytes, is an ethanol-inducible CYP oxidizing ethanol *in vivo* (Koop, 1992; Ingelman-Sundberg et al., 1993). Similarly, ethanol increases CYP2E1 expression and activity in HH in primary culture (Mahli et al., 2019) and in HepaRG cells (Do et al., 2013). Hence, we next determined whether acute ethanol exposure induced CYP2E1 expression and activity. We observed that CYP2E1 mRNA expression was

induced in a dose-dependent manner after ethanol treatment (25 or 50 mM) at 8 and 24 h in HepaRG cells (Fig. 1E). We also verified whether the increase in CYP2E1 mRNA levels correlated with enhanced catalytic activity by detecting the 2 main CHZ metabolites produced via CYP2E1-dependent oxidation (Quesnot et al., 2018). We found an increase in the amounts of OH-CHZ and its down-stream metabolite CHZ-O-Glc in the culture media of HepaRG cells following a 24 h ethanol treatment (Fig. 1F).

3.2. Production of EtG and EtS by HepaRG cells and HH

In order to demonstrate that differentiated HepaRG cells and HH *in vitro* can produce phase II metabolites of ethanol (EtS and EtG) upon an acute exposure, we developed and validated an original LC-HRMS method to detect and quantify these metabolites in cell culture media (Supporting information 2). Using this approach, we showed that both EtS and EtG were detected as early as 8 h in media of HepaRG cells exposed to ethanol and accumulated in a time- and dose-dependent manner in both cell types (Fig. 2). In particular, concentrations of these metabolites were almost twice as high upon 50 mM ethanol treatment as compared to 25 mM ethanol. The profiles of metabolite's accumulation appeared quite similar between HepaRG (Fig. 2A, C) cells and HH (Fig. 2B, D). For 25 mM ethanol, we observed an equal production of metabolites in both cell types with 1 μM of EtG and 0.5 μM of EtS at 24 h. For exposure to 50 mM ethanol, both cell models produced ~1 μM of EtS while EtG concentration reached 1.7 and 3 μM in HH and HepaRG cells, respectively. The rapid accumulation of metabolites found within the first 24 h of ethanol exposure followed by the relative steady amounts of EtG and EtS after 24 h was correlated to the strong decrease in ethanol concentration in the culture media due to the evaporation of ethanol at 37 °C (Fig. 1).

To further determine whether the amounts of EtG and EtS correlated with the remaining concentrations of ethanol in the culture media, we measured EtG and EtS levels in media of HepaRG cells treated for 72 h with 25 and 50 mM ethanol using models 1, 3 and 4. Indeed, ethanol concentrations in these models remained much higher over the 3-day treatment because of less evaporation (Supporting Information 4). As expected, EtG and EtS concentrations were higher in these models than in model 1 (Fig. 2E, F). Finally, we also demonstrated the production of EtG and EtS by precision cut liver slices (PCLS) prepared from a human liver biopsy and treated with ethanol for 48 h and confirmed that the amounts of both metabolites were higher when PCLS were cultured in sealed flasks that maintained elevated levels of ethanol during the incubation time (Supporting information 7).

3.3. SULT and UGT expression

It has been previously reported that ethanol induces different SULT and UGT gene family members in rat liver *in vivo* and in primary rat hepatocytes (Farinati et al., 1989; Kardon et al., 2000; Li et al., 2000). To confirm that HepaRG cells express most of the hepatocyte specific functions (Rogue et al., 2012) in our culture conditions, we first compared the relative mRNA levels of several ADHs, ALDHs, SULTs, and UGTs as well as CYP2E1 between HH and differentiated HepaRG cells (Supporting information 6). As previously reported (Rogue et al., 2012), all the genes expressed in HH were also detected in HepaRG cells confirming their high levels of differentiation.

We next studied the expression of different SULTs and UGTs at the mRNA levels between untreated and ethanol-treated differentiated HepaRG cells (Figs. 3 and 4). At 8 h, we did not observe any elevation of mRNA SULT expression (SULT1A1, SULT1B1, SULT1E1, SULT2A1) in ethanol-treated HepaRG cells compared to untreated cells while at 24 h, mRNA SULT expression of these different SULTs was slightly increased after ethanol treatment compared to the control cells (Fig. 3). Similarly, the mRNA levels of UGT1A1, UGT1A6 and UGT2B15 were slightly but significantly more elevated in ethanol-treated cells than in control

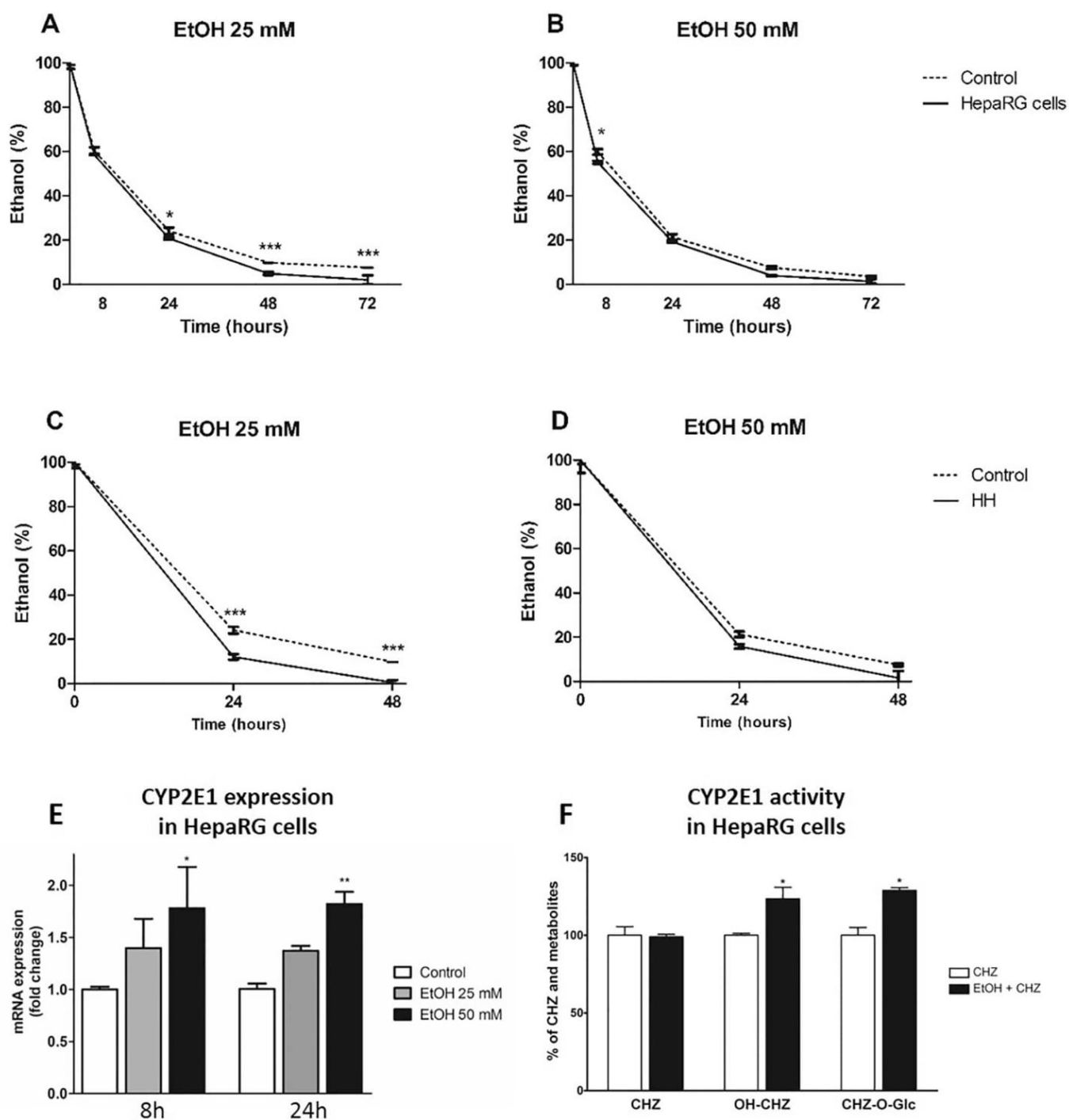
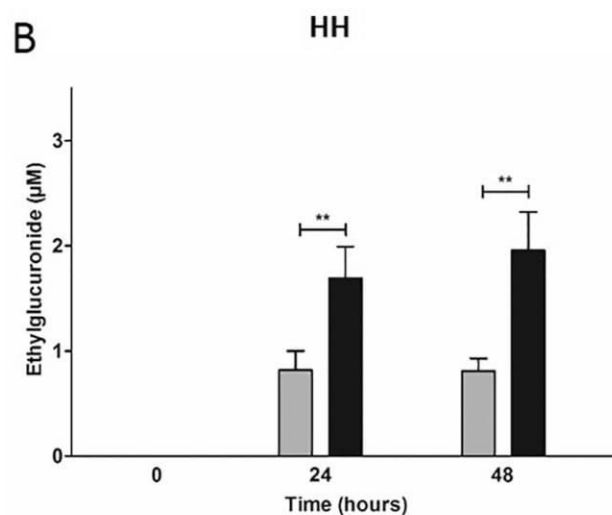
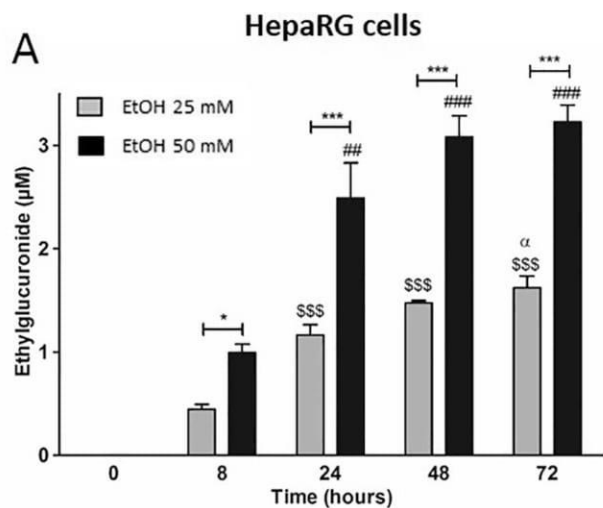


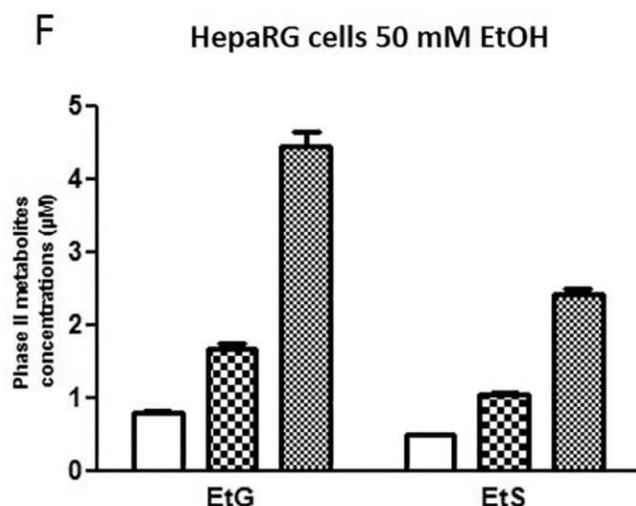
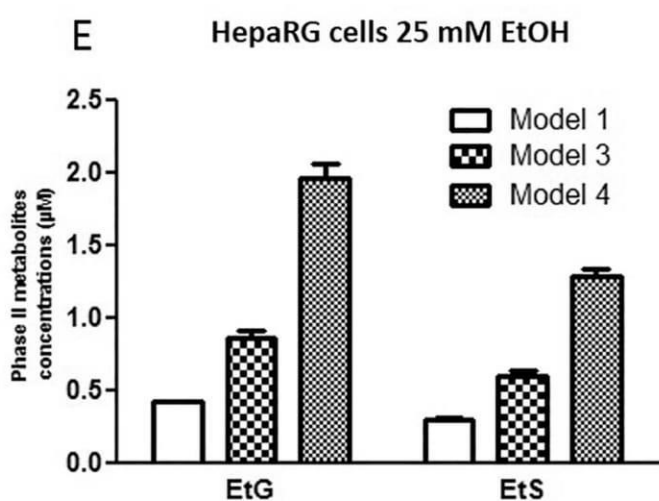
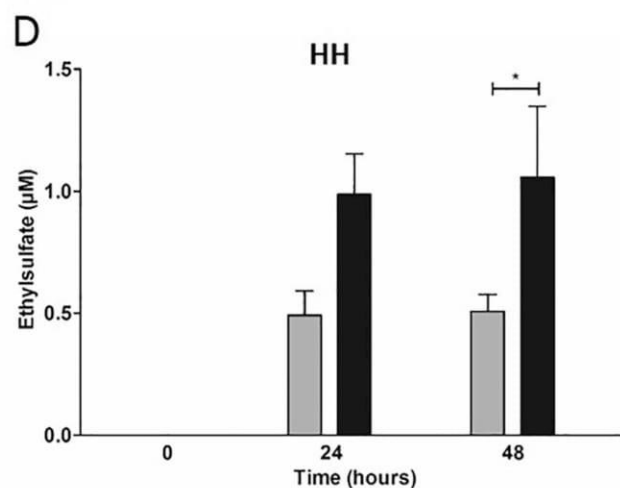
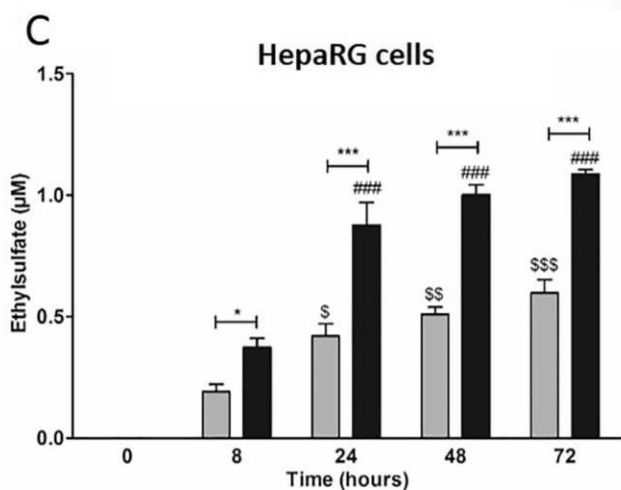
Fig. 1. Evaporation of ethanol (EtOH) in culture multiwell plates in absence and presence of cells and effect of ethanol (EtOH) on CYP2E1 expression and activity in differentiated HepaRG cells and Human Hepatocytes in primary culture (HH). Evaluation of ethanol elimination from culture media in 12 culture well-plates in absence (dashed line) or presence (plain line) of differentiated HepaRG cells (A, B) and human hepatocytes (HH: C, D) at 25 and 50 mM of ethanol in open multiwell plates with only 2 central wells containing ethanol (Model 1, Supporting information 4). Statistics: *** $p < .001$, * $p < .05$ for ethanol (EtOH) concentrations in cultures of HepaRG cells and HH compared to control cultures without cells at each time.

Differentiated HepaRG cells and HH were incubated during different times (8, 24, 48 or 72 h) with EtOH (25 or 50 mM). The effects of EtOH treatment on CYP2E1 expression was analyzed by RT-qPCR at 8 and 24 h of treatment in differentiated HepaRG cells (E). The effect of EtOH (50 mM) on CYP2E1 activity was measured in differentiated HepaRG cells using the chlorzoxazone (CHZ) as a substrate and by detecting its primary metabolite, the 6-hydroxychlorzoxazone (OH-CHZ), and the secondary metabolite, the chlorzoxazone O-Glucuronide (CHZ-O-Glc) by HPLC-UV in culture media at 4 h of 50 mM EtOH incubation (control amount corresponds to 100%) (F). The data are expressed as the mean \pm SEM for three independent experiments performed in triplicate. Statistics: ** $p < .01$ and * $p < .05$ for cultures exposed to ethanol treatment compared with the control cultures (E) or CHZ (F).

Ethylglucuronide



Ethylsulfate



(caption on next page)

Fig. 2. Ethylglucuronide (EtG) and ethylsulfate (EtS) production by differentiated HepaRG cells and Human Hepatocytes in primary cultures (HH) incubated with ethanol (EtOH). Differentiated HepaRG cells and HH were incubated during different times (8, 24, 48 or 72 h) with EtOH (25 or 50 mM) in open multiwell plates with only 2 central wells containing ethanol (Model 1, Supporting information 4). Concentrations of metabolites EtG (A, B) and EtS (C, D) were measured by LC-HRMS in the culture media of these cells. Differentiated HepaRG cells were also incubated during 72 h with EtOH at 25 mM (E) and 50 mM (F) in other multiwell plates settings (model 1, 3 and 4, Supporting Information 4) to obtain various remaining concentrations of ethanol within the wells containing cells and concentrations of metabolites EtG and EtS were measured. Results are expressed in μM and the data are expressed as the mean \pm SEM for three independent experiments performed in triplicate. Statistics: *** $p < .001$ ** $p < .01$ and * $p < .05$ for cultures exposed to 25 mM EtOH treatment compared with 50 mM EtOH treatment at each time. ### $p < .001$ and ## $p < .01$ for cultures exposed to 50 mM EtOH treatment compared with 8 h at 50 mM EtOH treatment. \$\$\$ $p < .001$ \$\$ $p < .01$ and \$ $p < .05$ for cultures exposed to 25 mM EtOH treatment compared with 8 h at 25 mM EtOH treatment. $\alpha p < .05$ for cultures exposed to 25 mM EtOH treatment compared with 24 h at 25 mM EtOH treatment. Statistics (E, F): Results are expressed in μM and the data are expressed as the mean \pm SD of one experiment performed in quadruplicate.

cultures while no significant differences were found for *UGT1A9*, *UGT2A3*, *UGT2B4* and *UGT2B7* (Fig. 4). The overall SULT and UGT induction remained rather weak in our acute condition of ethanol treatment of HepaRG cells.

3.4. Ethanol and CHZ are competitors for CYP2E1 and UGT enzymatic activities

Previous studies have reported that *UGT1A1*, *UGT1A9* and *UGT2B7* catalyzed the formation of EtG using recombinant UGTs (Foti and Fisher, 2005; Schwab and Skopp, 2014) while patients suffering from Gilbert's syndrome who have much lower expression in *UGT1A1* show

no differences in EtG formation following exposure to ethanol (Huppertz et al., 2015). We have recently demonstrated that CHZ [5-chloro-2(3H)-benzoxazolone], a centrally acting myorelaxant indicated for musculoskeletal pain (Chou et al., 2004), produced CHZ-O-Glc following the CYP2E1-mediated formation of OH-CHZ (Quesnot et al., 2018). Moreover, CHZ-O-Glc synthesis is catalyzed by *UGT1A1*, *UGT1A6* and *UGT1A9* but not by *UGT2B7* (Quesnot et al., 2018). Thus, we investigated whether ethanol could modulate the UGT-mediated metabolism of CHZ, postulating that a decrease in CHZ-O-Glc production in presence of ethanol would further indicate that *UGT1A* enzymes generate EtG.

HepaRG cells were incubated for 8 h with 300 μM CHZ and without

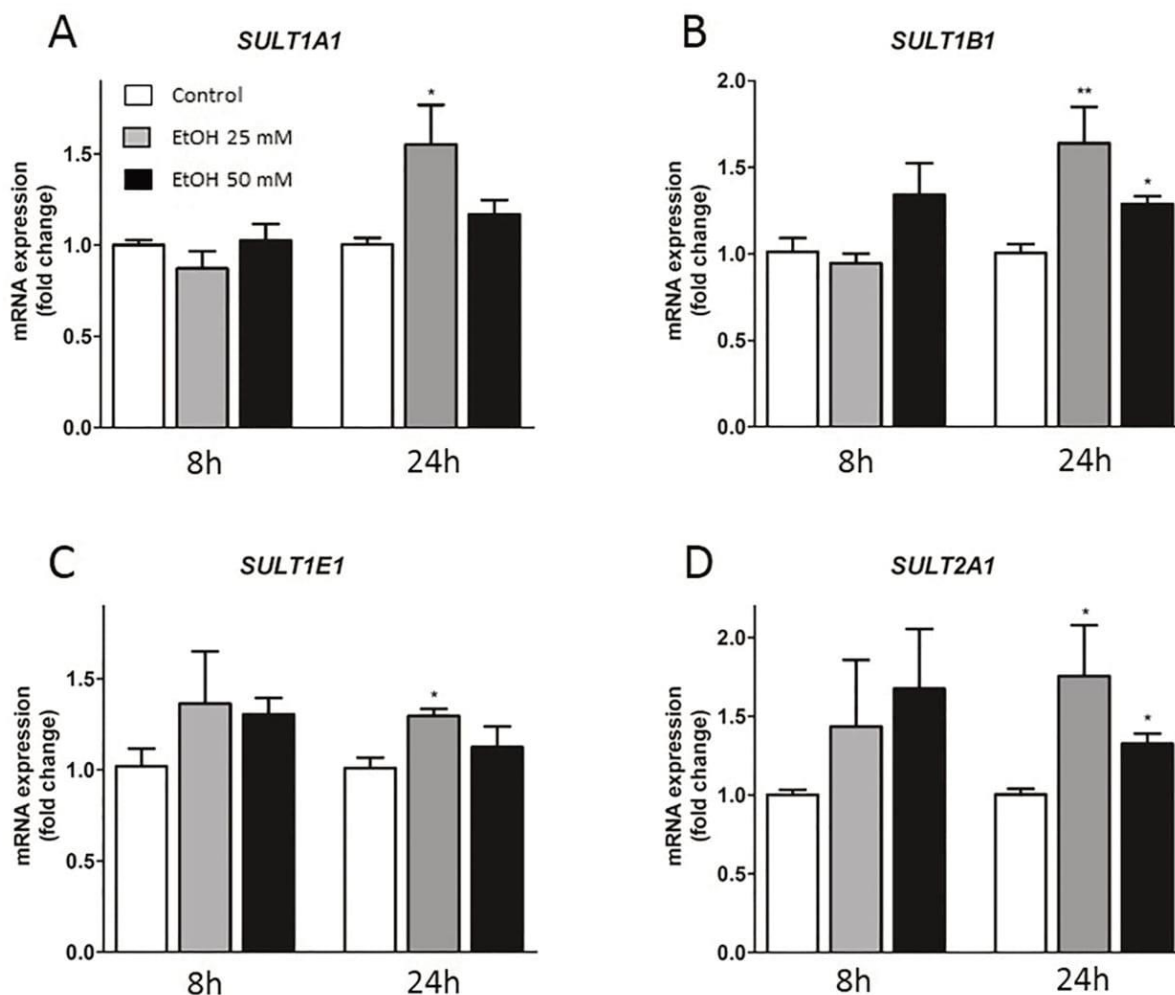
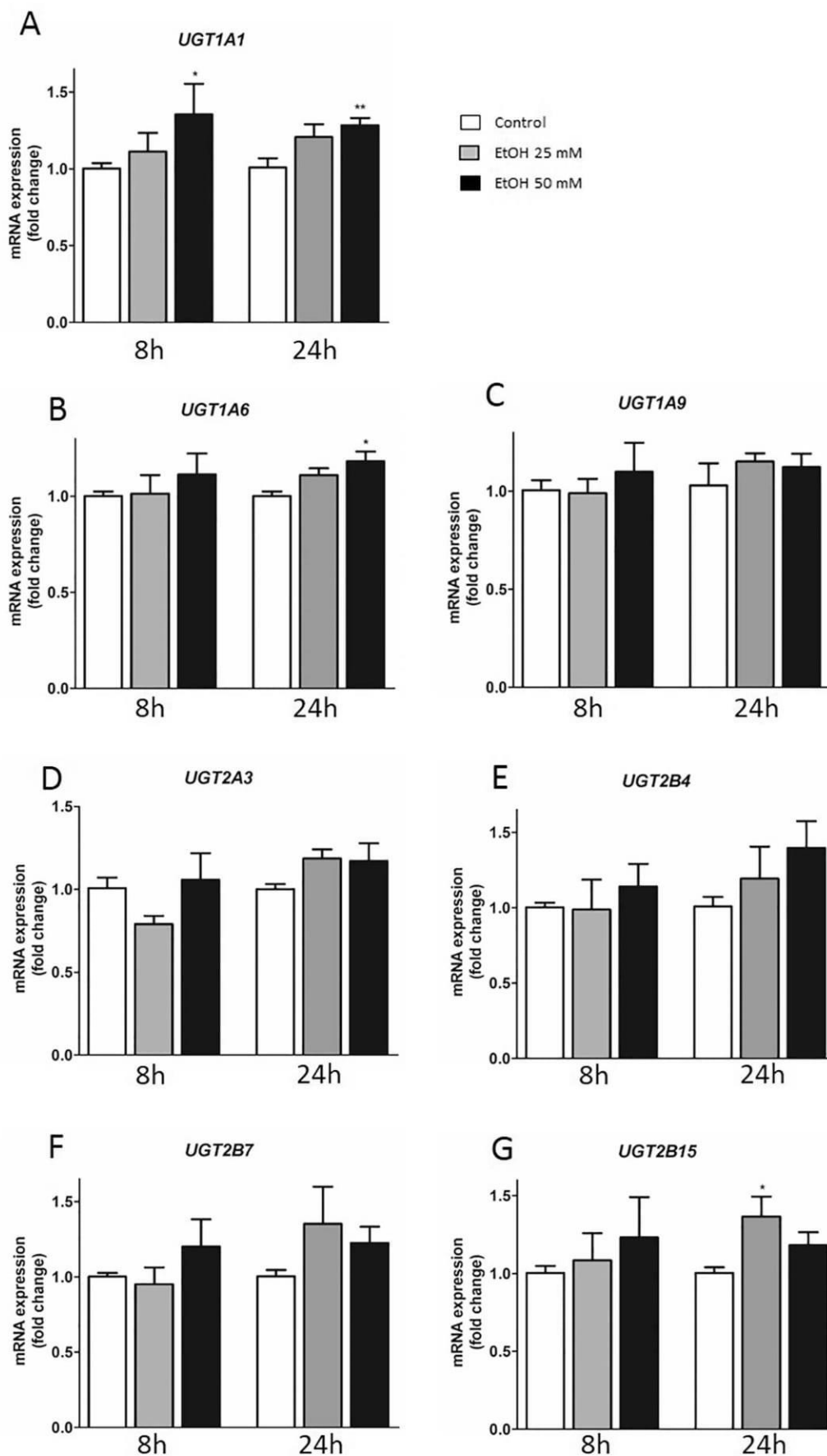


Fig. 3. Expression of sulfotransferases (SULTs) in differentiated HepaRG cells. Cells were cultured in medium alone (Control) or medium supplemented with ethanol (EtOH) at 25 mM and 50 mM for 8 or 24 h. The mRNA expression levels of *SULT1A1* (A), *SULT1B1* (B), *SULT1E1* (C) and *SULT2A1* (D) were determined using RT-qPCR. Results are normalized to GAPDH gene expression. The data are expressed as the mean \pm SEM for three independent experiments performed in triplicate. Statistics: ** $p < .01$ and * $p < .05$ for cultures exposed to ethanol treatment compared with the control cultures.



(caption on next page)

Fig. 4. Expression of uridine diphosphate-glucuronosyltransferases (UGT) in differentiated HepaRG cells. Cells were cultured in medium alone (control) or medium supplemented with 25 mM or 50 mM ethanol (EtOH) at for 8 or 24 h. The mRNA expression levels of *UGT1A1* (A), *UGT1A6* (B), *UGT1A9* (C), *UGT2A3* (D), *UGT2B4* (E), *UGT2B7* (F) and *UGT2B15* (G) were determined using RT-qPCR. Results are normalized to GAPDH gene expression. The data are expressed as the mean \pm SEM for three independent experiments performed in triplicate. Statistics: $^{**}p < .01$, $^{*}p < .05$ for cultures exposed to ethanol treatment compared with the control cultures.

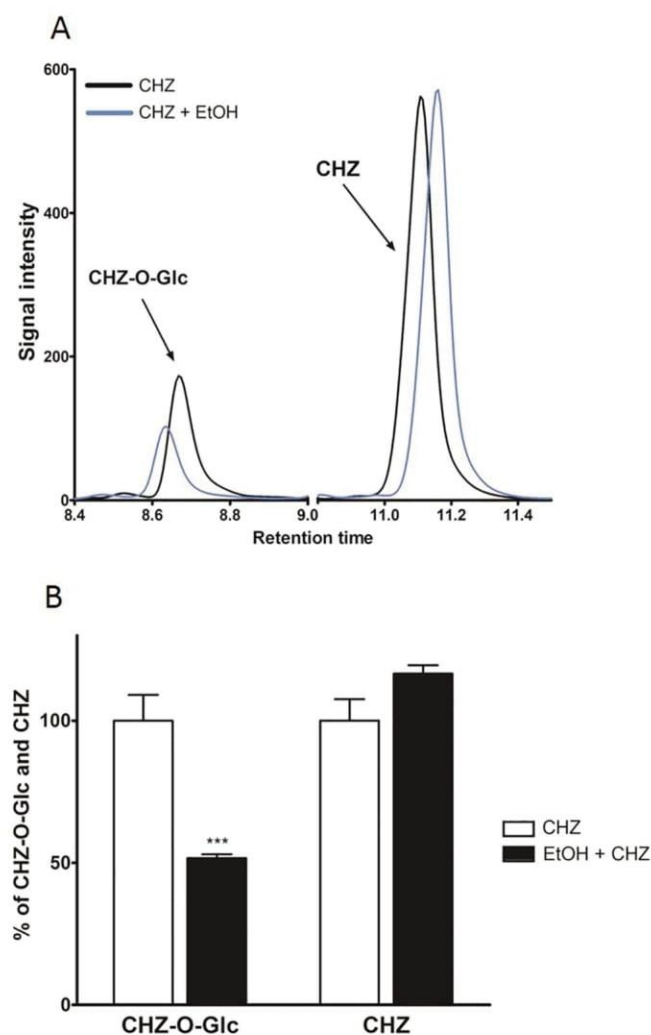


Fig. 5. UGT enzymatic activity in differentiated HepaRG cells treated by ethanol. Cells were incubated with incubation medium (William's E medium without red phenol) containing 300 μ M of chlorzoxazone (CHZ) or incubation medium (William's E medium without red phenol) supplemented with both CHZ (300 μ M) and ethanol (EtOH) at 50 mM for 4 h. The production of the CHZ-derived glucuronide (CHZ-O-Glc), reflecting UGT1A catalytic activity was analyzed by HPLC. Typical HPLC chromatograms (Fig. 5A) showing the peaks of CHZ-O-Glc and CHZ in culture media of cells incubated with CHZ and CHZ + EtOH. Peak area quantification of CHZ and CHZ-O-Glc (B) as the mean \pm SEM for three independent experiments performed in triplicate. Results are expressed as percent of control cultures (with CHZ) set at 100%. Statistics: $^{***}p < .001$ for cultures exposed to CHZ treatment compared with the cultures co-incubated with CHZ and EtOH. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

or with 50 mM ethanol, and CHZ-O-Glc production (reflecting UGT1A activity) was analyzed by HPLC (Fig. 5). The HPLC chromatograms (Fig. 5A) showed that the peak of CHZ-O-Glc was higher in culture media of cells treated with CHZ only compared to cells co-incubated with both ethanol and CHZ. Peak area quantification indicated that co-incubation with 50 mM ethanol reduced by 50% the production of CHZ-

O-Glc (Fig. 5B). Conversely, CHZ concentration was higher in culture media of cells co-incubated with ethanol and CHZ compared to cells incubated with CHZ only (Fig. 5B). Together, these data demonstrated that ethanol was a competitor of CHZ for glucuronide conjugation and strongly suggested that UGT1A enzymes are involved in EtG synthesis.

3.5. Glucuronidation of ethanol by UGT1 subfamily

In order to determine the UGT1A family members involved in EtG production, we took advantage of the different recombinant HepG2 cell lines recently established in our laboratory respectively expressing *UGT1A1*, *UGT1A6* and *UGT1A9* (Quesnot et al., 2018) in order to compare the production of EtG in each of these cell lines. The parental HepG2 cells are hepatic cells expressing very low levels of these UGTs (Quesnot et al., 2018) and presenting reduced xenobiotic metabolism (Donato et al., 2015). The enforced expression of one UGT gene thus allows to determine the involvement of the corresponding enzyme in EtG production.

We first confirmed that the recombinant HepG2 cell lines expressed high levels of the three *UGT1A1*, *UGT1A6* and *UGT1A9* genes at the mRNA level (Fig. 6A-C). As expected, each individual recombinant cell line expressed very high mRNA levels of one UGT gene. We also set up a RT-qPCR condition using "panUGT1A" primers that totally match with conserved sequences of *UGT1A1*, *UGT1A6* and *UGT1A9* in order to compare whether the overall expression of these UGTs was similar in the different recombinant cell lines (Fig. 6D). We found that *UGT1A1*, *UGT1A6* and *UGT1A9* mRNA levels were not significantly different using the "panUGT1A" primers indicating that the overall expression of these different UGTs in the three cell lines was relatively similar. As negative control, we used parental HepG2 cells (control) and the recombinant CYP2E1 HepG2 cell line (Quesnot et al., 2018) that expresses very high levels of CYP2E1 mRNAs and low amounts of the *UGT1A1*, *UGT1A6* and *UGT1A9* genes (Fig. 6E). Using these cell lines, we did not detect by LC-HRMS any EtG in the culture media of the parental and CYP2E1 HepG2 cells after 24 h of 50 mM ethanol treatment (Fig. 6F), while the glucuronide was found in the supernatants of UGT expressing cells with the highest amounts detected for the *UGT1A9* recombinant cells.

4. Discussion

In this study, we have further characterized the *in vitro* human HepaRG hepatoma cells with the goal to investigate ethanol metabolism, and more particularly the production of EtG and EtS metabolites.

Our first effort was to develop a model of ethanol acute exposure that would resemble the physiological ethanol elimination in humans by controlling ethanol concentration in the culture wells. To this end, we choose 25 and 50 mM in culture media corresponding to blood concentrations of 1.15 and 2.3 g/L during an acute ethanol intoxication in human. Ethanol is a highly volatile molecule that disappears from the culture medium at 37 $^{\circ}$ C through evaporation in air, thus contaminating adjacent wells of the same culture plate (Blein et al., 1991; Borgs et al., 1993). Hence, in order to avoid contamination by ethanol between wells, we have chosen 12-well culture plates where only the two central wells were filled, while peripheral wells were left empty (model 1, Supporting Information 4). In addition, other models were tested concerning the peripheral wells such as (i) wells containing PBS, (ii) wells containing PBS with ethanol and (iii) wells containing PBS with ethanol in culture plates sealed with parafilm (Models 2 to 4, Supporting

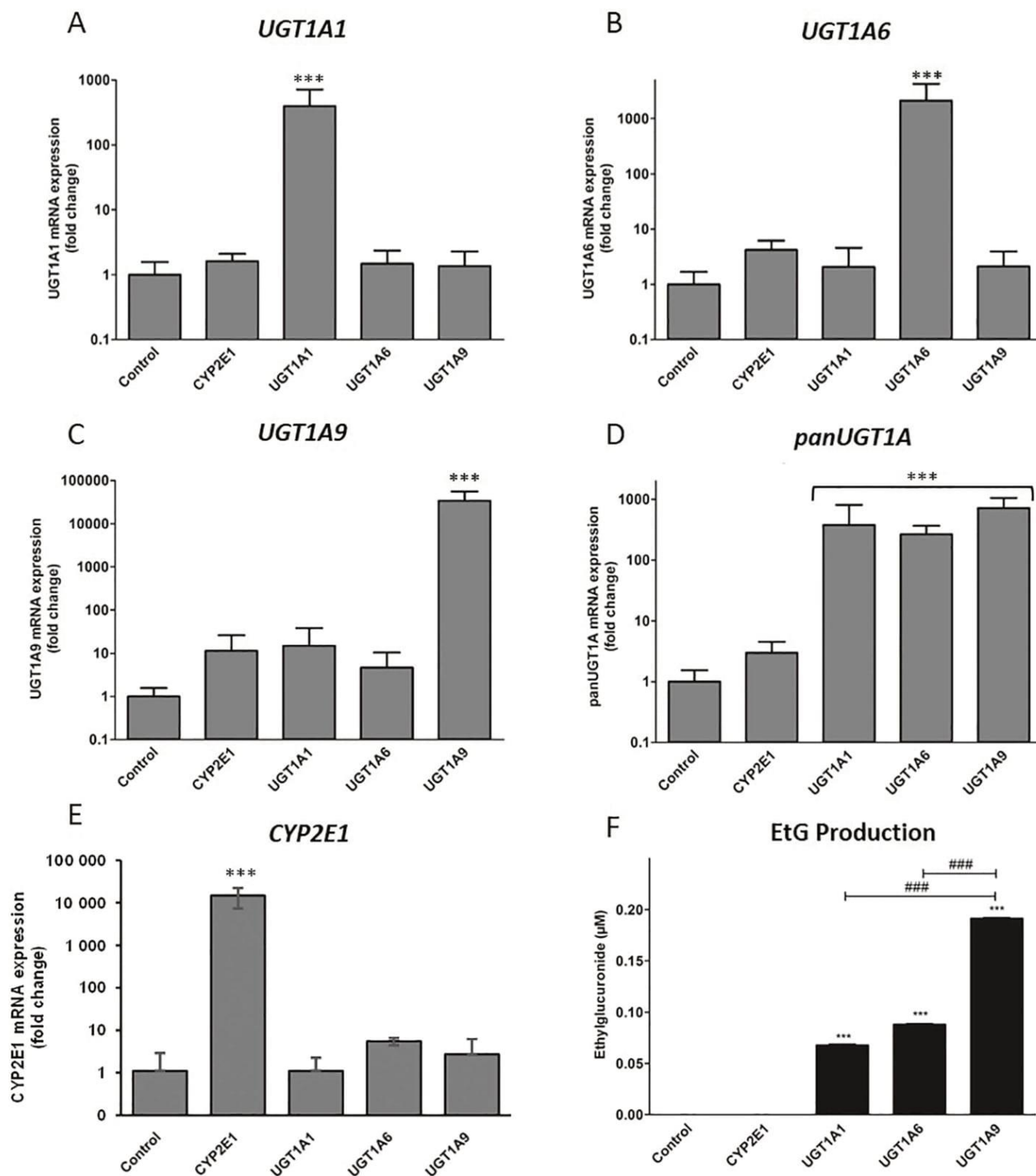


Fig. 6. Glucuroconjugation of ethanol in recombinant HepG2 cells expressing UGT1A genes. The mRNA expression levels of *UGT1A1* (A), *UGT1A6* (B), *UGT1A9* (C), *panUGT1A1* (D) and *CYP2E1* (E) were determined using RT-qPCR in parental and recombinant HepG2 cells expression *UGT1A1*, *UGT1A6* or *UGT1A9* proteins. Results were normalized to GAPDH gene expression. Cells were incubated with ethanol at 50 mM for 24 h and EtG concentrations were measured by LC-HRMS in the culture media of these cells (F). The data are expressed as the mean \pm SEM for three independent experiments performed in triplicate. Statistics: *** $p < .001$ for cultures compared to control cultures. ### $p < .001$ for cultures compared to other cultures.

information 4). However, Model 1 seemed the most appropriate since the decay profile of ethanol concentration was fast and comparable to the *in vivo* ethanolemia decay profile following acute ethanol exposure in humans (Pizon et al., 2007; Jones, 2010). Indeed, at the chosen

concentrations, we observed a complete disappearance of ethanol at 48 h using the GC-FID analytic method, as observed in humans (Jones, 2010). In addition, no cytotoxicity was observed at any time points or for any concentrations in both HepaRG cells and HH. However, while

the LDH release assay showed no cytolysis, cellular ATP content was moderately decreased. This suggests that ethanol could affect energy metabolism and oxidative phosphorylation without inducing major cell death, even when ethanol concentrations remain high over 72 h. Reduced cellular ATP most probably reflects the various deleterious effects of ethanol on mitochondrial function, including fatty acid oxidation and oxidative phosphorylation (Fromenty and Pessayre, 1995).

In the selected model of ethanol exposure, alcohol decay was largely due to the evaporation under our conditions of culture since less than 10% difference in ethanol concentrations was observed between wells with and without cells (HH or HepaRG). Next, we set up a reliable analytic method to detect ethanol metabolites in culture media of hepatic cells to demonstrate that HepaRG cells are competent for ethanol metabolism. After 48 h with 50 mM ethanol, the production of phase II metabolites represented only few μM of EtG and EtS, i.e. less than 1% of the initial ethanol concentration, in agreement with previous data reporting phase II metabolism *in vivo* (Dahl et al., 2002; Cabarcos et al., 2015).

Regarding the oxidative metabolism, we first looked at the CYP2E1 expression in HepaRG cells following exposure to ethanol. CYP2E1 is considered as the main CYP responsible for microsomal and mitochondrial ethanol metabolism into acetaldehyde, which has been associated with alcohol-induced liver damage (Lieber, 2005; Knockaert et al., 2011). In addition, CYP2E1 expression is known to be induced by ethanol consumption (Gonzalez et al., 1991; Takahashi et al., 1993; Zhukov and Ingelman-Sundberg, 1999; Balusikova and Kovar, 2013). Herein, we report a moderate but significant induction of CYP2E1 mRNA expression after an acute ethanol treatment in a dose-dependent manner demonstrating that differentiated HepaRG cells have kept an ethanol-inducible CYP2E1 gene expression. Moreover, we showed for the first time an ethanol-mediated induction of CYP2E1 catalytic activity in human hepatoma cells. Since induction of CYP2E1 mRNA is predominantly described during chronic exposure to ethanol, it may be postulated that the early increase in activity of this enzyme is more likely attributed to the stabilization of CYP2E1 mRNA and/or protein by ethanol (Zhukov and Ingelman-Sundberg, 1999).

The oxidative metabolism of ethanol was difficult to study under our culture conditions. Indeed, ethanol is oxidized to acetaldehyde by ADH and CYP2E1, then further metabolized to acetate by ALDH (Cederbaum, 2012). Although both HepaRG cells and HH express these enzymes (Quesnot et al., 2018), we did not detect acetaldehyde nor acetate by our methods most likely because of too low concentrations in the culture medium. Acetaldehyde has a boiling point at only 20.2 °C and the capacity of ALDH to remove acetaldehyde notably exceeds the capacity of its generation by the different pathways of alcohol oxidation. The absence of acetate detection can also be explained by its rapid metabolism to CO_2 , fatty acid, cholesterol or ketone bodies (Cederbaum, 2012).

Because our knowledge on the enzymes involved in the conjugation of ethanol is incomplete and partly controversial (Stachel and Skopp, 2015), we investigated the non-oxidative metabolism of ethanol. EtG and EtS are non-volatile and water-soluble non-oxidative metabolites formed in the liver and excreted in urine. These markers have also been shown to be stable *in vitro* (Walsham and Sherwood, 2014). Following a single exposure of both HepaRG cells and HH to ethanol, we detected ethanol-related phase II-metabolites using an innovative and fully validated LC-HRMS method. To our knowledge, this is the first quantification by LC-MS of EtG and EtS in culture media that revealed the non-oxidative production of ethanol metabolites in a dose and time dependent manner in metabolically active hepatic cells *in vitro*. These results also suggested that UGTs and SULTs were not saturated for 25 and 50 mM ethanol since the amounts of both metabolites were much higher in culture settings that maintained elevated amounts of ethanol over 3 days of treatment. The amount of EtG produced was greater than EtS, similar to what has been found *in vivo* (Halter et al., 2008; Kummer et al., 2013). In addition, the EtS/EtG ratio (molar concentration) was

lower for HepaRG cells (0.36) than for human hepatocytes (0.59). *In vivo*, in urine, this ratio has previously been found to be less than 1 (Halter et al., 2008; Winkler et al., 2013). Altogether, these results would suggest that UGTs have higher metabolic activity towards ethanol than SULTs both *in vivo* and in the *in vitro* models of hepatocytes used in this study.

SULT1A1 and SULT2A1 are the main SULT isoforms expressed in liver (Riches et al., 2009; Kurogi et al., 2012; Stachel and Skopp, 2016). Here, we confirmed that SULT1A1 and SULT2A1 mRNA are expressed at comparable levels between HepaRG and HH. Furthermore, SULT1A1, SULT1B1, SULT1E1 and SULT2A1 mRNA expression was slightly induced after 24 h-ethanol treatment in HepaRG cells. The phase II-UGT enzymes are also expressed at high levels in liver, especially UGT2B4, UGT2B15, UGT1A9 and UGT2B7 (Ohno and Nakajin, 2009). Our results also confirmed similar UGT mRNA expression levels between HepaRG cells and HH. UGT mRNA expression was barely induced by ethanol excepted UGT2B15 at 25 mM after 24 h, UGT1A1 at 50 mM after 8 and 24 h and UGT1A6 at 50 mM after 24 h. To our knowledge, there are no data available on the effect of ethanol on UGT expression in human. Only one study showed induction of UGT1A1 expression after chronic ethanol exposure in rats (Kardon et al., 2000).

Several UGTs are most likely involved in the production of EtG but contradictory data have been published regarding the most prevalent isoforms generating EtG. In cell free assays using recombinant UGTs, UGT1A1, 1A9 and 2B7 were identified as the most implicated enzymes (Foti and Fisher, 2005; Ohno and Nakajin, 2009; Court et al., 2012; Al Saabi et al., 2013; Schwab and Skopp, 2014; Stachel and Skopp, 2016). To further identify which UGTs can catalyze ethanol glucuronidation, we used recombinant HepG2 cells expressing CYP2E1, UGT1A1, UGT1A6 and UGT1A9. Our results demonstrated that recombinant HepG2 cells expressing UGT1A1, UGT1A6 and UGT1A9 were able to metabolize ethanol in EtG while native HepG2 cells and HepG2 cells expressing CYP2E1 did not produce this glucuronide. Furthermore, the UGT1A9 isoform seems to be the most active in ethanol glucuronidation in agreement with a previous study showing that UGT1A9 and UGT2B7 appeared to be the main isoforms producing EtG in recombinant microsomes (Stachel and Skopp, 2015). Further experiments would be required to establish additional recombinant HepG2 cells expressing other UGTs and SULTs and to study their involvement in EtG and EtS production.

Our results also demonstrated that HepaRG cells represent a suitable hepatic cell model to study ethanol metabolism. Indeed, we showed that expression of phase I and phase II genes and ethanol metabolism are very similar between these cells and HH. After characterizing this experimental model, we would like to extend this study to the metabolism of ethanol in pathological conditions observed in humans. Indeed, our laboratory has developed culture conditions of HepaRG cells to induce steatosis (Michaut et al., 2016), inflammation (Al-Attrache et al., 2016) and cholestasis (Bachour-El Azzi et al., 2014; Sharanek et al., 2016). These diseases are frequently related to, or associated with, alcohol consumption. Thus, our models will allow a better understanding of the metabolism, and therefore the toxicity of ethanol in different pathological conditions in human hepatocytes.

Authorship contributions

Participated in research design: Hugbart Chloé, Le Daré Brendan, Vène Elise, Lagente Vincent, Fromenty Bernard, Bouvet Renaud, Morel Isabelle, Loyer Pascal, Gicquel Thomas.

Conducted experiments: Hugbart Chloé, Verres Yann, Le Daré Brendan, Bucher Simon, Vène Elise, Bodin Aude, Gicquel Thomas.

Performed data analysis: Hugbart Chloé, Verres Yann, Le Daré Brendan, Gicquel Thomas.

Wrote or contributed to the writing of the manuscript: Hugbart Chloé, Loyer Pascal, Le Daré Brendan, Gicquel Thomas.

Declaration of Competing Interest

Authors declare that they have no conflicts of interest that might be relevant to the content of the manuscript.

Acknowledgments

We thank Drs. Dounia Le Guillou and Jacques Le Seyec for their helpful contribution. The authors would also like to thank the Centre de Ressources Biologiques (CRB) Santé of Rennes for providing human hepatocytes. The authors received no specific funding for this work.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104842>.

References

- Al Saabi, A., Allorge, D., Sauvage, F.-L., Tournel, G., Gaulier, J.M., Marquet, P., et al., 2013 Mar 1. Involvement of UDP-Glucuronosyltransferases UGT1A9 and UGT2B7 in ethanol Glucuronidation, and interactions with common drugs of abuse. *Drug Metab. Dispos.* 41 (3), 568–574.
- Al-Attrache, H., Sharaneq, A., Burban, A., Burbank, M., Gicquel, T., Abdel-Razzak, Z., et al., 2016 Sep. Differential sensitivity of metabolically competent and non-competent HepaRG cells to apoptosis induced by diclofenac combined or not with TNF- α . *Toxicol. Lett.* 258, 71–86.
- Andresen-Streichert, H., Müller, A., Glahn, A., Skopp, G., Sterneck, M., 2018 May 4. Alcohol biomarkers in clinical and forensic contexts. *Dtsch Aertzblatt Online [Internet]* 115 (18), 309–315.
- Aninat, C., Piton, A., Glaise, D., Le Charpentier, T., Langouët, S., Morel, F., et al., 2006 Jan. Expression of cytochromes P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG cells. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem.* 34 (1), 75–83.
- Bachour-El Azzi, P., Sharaneq, A., Abdel-Razzak, Z., Antherieu, S., Al-Attrache, H., Savary, C.C., et al., 2014 Aug 8. Impact of inflammation on chlorpromazine-induced cytotoxicity and cholestatic features in HepaRG cells. *Drug Metab. Dispos.* 42 (9), 1556–1566.
- Balusikova, K., Kovar, J., 2013 Sep. Alcohol dehydrogenase and cytochrome P450 2E1 can be induced by long-term exposure to ethanol in cultured liver HEP-G2 cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 49 (8), 619–625.
- Blein, O., Ronot, X., Adolphe, M., 1991 May. Cross contamination associated with the use of multiwell culture plates for cytotoxicity assessment of volatile chemicals. *Cytotechnology.* 6 (1), 79–82.
- Borgs, P., Way, D.L., Witte, M.H., Witte, C.L., 1993 Feb. Effective stabilization of ethanol levels in multiple-well tissue culture plates. *Alcohol.* 10 (1), 31–35.
- Borràs, E., Coutelle, C., Rosell, A., Fernández-Muixi, F., Broch, M., Crosas, B., et al., 2000 Apr. Genetic polymorphism of alcohol dehydrogenase in Europeans: The ADH2*2 allele decreases the risk for alcoholism and is associated with ADH3*1. *Hepatology.* 31 (4), 984–989.
- Bühler, M., Mann, K., 2011 Oct. Alcohol and the human brain: a systematic review of different neuroimaging methods: alcohol and the human brain. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 35 (10), 1771–1793.
- Cabarcos, P., Álvarez, I., Tabernero, M.J., Bermejo, A.M., 2015 Jul. Determination of direct alcohol markers: a review. *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (17), 4907–4925.
- Cederbaum, A.I., 2012 Nov. Alcohol metabolism. *Clin Liver Dis.* 16 (4), 667–685.
- Cerec, V., Glaise, D., Garnier, D., Morosan, S., Turlin, B., Drenou, B., et al., 2007 Apr. Transdifferentiation of hepatocyte-like cells from the human hepatoma HepaRG cell line through bipotent progenitor. *Hepatology.* 45 (4), 957–967.
- Chou, R., Peterson, K., Helfand, M., 2004 Aug. Comparative efficacy and safety of skeletal muscle relaxants for spasticity and musculoskeletal conditions: a systematic review. *J. Pain Symptom Manag.* 28 (2), 140–175.
- Corlu, A., Loyer, P., 2015. Culture conditions promoting hepatocyte proliferation and cell cycle synchronization. In: Vinken, M., Rogiers, V. (Eds.), *Protocols in In Vitro Hepatocyte Research [Internet]*. Springer New York, New York, NY, pp. 27–51 [cited 2020 Mar 27].
- Court, M.H., Zhang, X., Ding, X., Yee, K.K., Hesse, L.M., Finel, M., 2012 Mar. Quantitative distribution of mRNAs encoding the 19 human UDP-glucuronosyltransferase enzymes in 26 adult and 3 fetal tissues. *Xenobiotica.* 42 (3), 266–277.
- Dahl, H., Stephanson, N., Beck, O., Helander, A., 2002 May 1. Comparison of urinary excretion characteristics of ethanol and ethyl glucuronide. *J. Anal. Toxicol.* 26 (4), 201–204.
- Do, T.H.T., Gaboriau, F., Cannie, I., Batusanski, F., Ropert, M., Moirand, R., et al., 2013 Nov. Iron-mediated effect of alcohol on hepatocyte differentiation in HepaRG cells. *Chem. Biol. Interact.* 206 (2), 117–125.
- Donato MT, Tolosa L, Gómez-Lechón MJ. Culture and functional characterization of human hepatoma HepG2 cells. In: Vinken M, Rogiers V, editors. *Protocols in In Vitro Hepatocyte Research [Internet]*. New York, NY: Springer New York; 2015 [cited 2019 Jul 19]. p. 77–93.
- Edenberg, H.J., 2007. The genetics of alcohol metabolism: role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase variants. *Alcohol Res Health J Natl Inst Alcohol Abuse Alcohol.* 30 (1), 5–13.
- Farinati, F., Lieber, C.S., Garro, A.J., 1989 Jun. Effects of chronic ethanol consumption on carcinogen activating and detoxifying systems in rat upper alimentary tract tissue. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 13 (3), 357–360.
- Foti, R.S., Fisher, M.B., 2005 Oct. Assessment of UDP-glucuronosyltransferase catalyzed formation of ethyl glucuronide in human liver microsomes and recombinant UGTs. *Forensic Sci. Int.* 153 (2–3), 109–116.
- Fromenty, B., Pessayre, D., 1995 Jan. Inhibition of mitochondrial beta-oxidation as a mechanism of hepatotoxicity. *Pharmacol. Ther.* 67 (1), 101–154.
- Gonzalez, F.J., Ueno, T., Umeno, M., Song, B.J., Veech, R.L., Gelboin, H.V., 1991. Microsomal ethanol oxidizing system: transcriptional and posttranscriptional regulation of cytochrome P450, CYP2E1. *Alcohol Alcohol Oxf Oxf Suppl.* 1, 97–101.
- Guérin, S., Laplanche, A., Dunant, A., Hill, C., 2013 Aug. Alcohol-attributable mortality in France. *Eur. J. Pub. Health* 23 (4), 588–593.
- Guguen-Guillouzo, C., Campion, J.P., Brissot, P., Glaise, D., Launois, B., Bourel, M., et al., 1982 Jun. High yield preparation of isolated human adult hepatocytes by enzymatic perfusion of the liver. *Cell Biol Int Rep.* 6 (6), 625–628.
- Halter, C.C., Dresen, S., Auwaerter, V., Wurst, F.M., Weinmann, W., 2008 Mar. Kinetics in serum and urinary excretion of ethyl sulfate and ethyl glucuronide after medium dose ethanol intake. *Int. J. Legal Med.* 122 (2), 123–128.
- Helander, A., Beck, O., 2005 Jul 1. Ethyl sulfate: a metabolite of ethanol in humans and a potential biomarker of acute alcohol intake. *J. Anal. Toxicol.* 29 (5), 270–274.
- Huppertz, L.M., Gunsilius, L., Lardi, C., Weinmann, W., Thierauf-Emberger, A., 2015 Sep. Influence of Gilbert's syndrome on the formation of ethyl glucuronide. *Int. J. Legal Med.* 129 (5), 1005–1010.
- Ingall, G.B., 2012 Sep. Alcohol biomarkers. *Clin. Lab. Med.* 32 (3), 391–406.
- Ingelman-Sundberg, M., Johansson, I., Yin, H., Terelius, Y., Eliasson, E., Clot, P., et al., 1993 Dec. Ethanol-inducible cytochrome P4502E1: genetic polymorphism, regulation, and possible role in the etiology of alcohol-induced liver disease. *Alcohol.* 10 (6), 447–452.
- Jones, A.W., 2010 Jul. Evidence-based survey of the elimination rates of ethanol from blood with applications in forensic casework. *Forensic Sci. Int.* 200 (1–3), 1–20.
- Kaphalia, B.S., Cai, P., Khan, M.F., Okorodudu, A.O., Ansari, G., A, S., 2004 Nov. Fatty acid ethyl esters: markers of alcohol abuse and alcoholism. *Alcohol.* 34 (2–3), 151–158.
- Kardon, T., Coffey, M.J., Bánhegyi, G., Conley, A.A., Burchell, B., Mandl, J., et al., 2000 Jul. Transcriptional induction of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase by ethanol in rat liver. *Alcohol.* 21 (3), 251–257.
- Knockaert, L., Descatoire, V., Vadrot, N., Fromenty, B., Robin, M.-A., 2011 Mar. Mitochondrial CYP2E1 is sufficient to mediate oxidative stress and cytotoxicity induced by ethanol and acetaminophen. *Toxicol. in Vitro* 25 (2), 475–484.
- Koop, D.R., 1992 Jan 6. Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P450 2E1. *FASEB J.* 6 (2), 724–730.
- Kummer, N., Wille, S., Di Fazio, V., Lambert, W., Samyn, N., 2013 Jun. A fully validated method for the quantification of ethyl glucuronide and ethyl sulphate in urine by UPLC-ESI-MS/MS applied in a prospective alcohol self-monitoring study. *J. Chromatogr. B* 929, 149–154.
- Kurogi, K., Davidson, G.M., Mohammed, Y.I., Williams, F.E., Liu, M., Sakakibara, Y., et al., 2012. Ethanol sulfation by the human cytosolic sulfotransferases: a systematic analysis. *Biol. Pharm. Bull.* 35 (12), 2180–2185.
- Le Daré, B., Lagente, V., Gicquel, T., 2019 Oct 2. Ethanol and its metabolites: update on toxicity, benefits, and focus on immunomodulatory effects. *Drug Metab. Rev.* 51 (4), 545–561.
- Li, Y.Q., Prentice, D.A., Howard, M.L., Mashford, M.L., Wilson, J.S., Desmond, P.V., 2000 Jan. Alcohol up-regulates udp-glucuronosyltransferase mrna expression in rat liver and in primary rat hepatocyte culture. *Life Sci.* 66 (7), 575–584.
- Lieber, C.S., 2005. Pathogenesis and treatment of alcoholic liver disease: progress over the last 50 years. *Rocz Akad Med W Białymstoku* 1995 50, 7–20.
- Mahli, A., Erwin Thasler, W., Hellerbrand, C., 2019 Mar 24. Establishment of a *p*-nitrophenol oxidation-based assay for the analysis of CYP2E1 activity in intact hepatocytes *in vitro*. *Toxicol. Mech. Methods* 29 (3), 219–223.
- Michaut, A., Le Guillou, D., Moreau, C., Bucher, S., McGill, M.R., Martinais, S., et al., 2016 Feb. A cellular model to study drug-induced liver injury in nonalcoholic fatty liver disease: application to acetaminophen. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 292, 40–55.
- Nutt, D., King, L.A., Saulsbury, W., Blakemore, C., 2007 Mar. Development of a rational scale to assess the harm of drugs of potential misuse. *Lancet* 369 (9566), 1047–1053.
- Obad, A., Peeran, A., Little, J.L., Haddad, G.E., Tazami, S.T., 2018 Feb 13. Alcohol-Mediated Organ Damages: Heart and Brain. *Front Pharmacol [Internet]* 9 [cited 2018 Jul 25].
- Ohno, S., Nakajin, S., 2009 Jan 1. Determination of mRNA expression of human UDP-glucuronosyltransferases and application for localization in various human tissues by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Drug Metab. Dispos.* 37 (1), 32–40.
- Osna, N.A., Donohue, T.M., Kharbanda, K.K., 2017. Alcoholic liver disease: pathogenesis and current management. *Alcohol Res Curr Rev.* 38 (2), 147–161.
- Pizon, A.F., Becker, C.E., Bikin, D., 2007 Jun. The clinical significance of variations in ethanol toxicokinetics. *J. Med. Toxicol.* 3 (2), 63–72.
- Quesnot, N., Bucher, S., Gade, C., Vlach, M., Vene, E., Valença, S., et al., 2018 Oct. Production of chlorzoxazone glucuronides via cytochrome P4502E1 dependent and independent pathways in human hepatocytes. *Arch. Toxicol.* 92 (10), 3077–3091.
- Riches, Z., Stanley, E.L., Bloomer, J.C., Coughtrie, M.W.H., 2009 Nov 1. Quantitative Evaluation of the Expression and Activity of Five Major Sulfotransferases (SULTs) in Human Tissues: The SULT "Pie." *Drug Metab. Dispos.* 37 (11), 2255–2261.
- Rogue, A., Lambert, C., Spire, C., Claude, N., Guillouzo, A., 2012 Jan 1. Interindividual variability in gene expression profiles in human hepatocytes and comparison with HepaRG cells. *Drug Metab. Dispos.* 40 (1), 151–158.

- Schwab, N., Skopp, G., 2014 Apr. Identification and preliminary characterization of UDP-glucuronosyltransferases catalyzing formation of ethyl glucuronide. *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (9–10), 2325–2332.
- Seitz, H.K., Stickel, F., 2007 Aug. Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 7 (8), 599–612.
- Sharaneq, A., Burban, A., Burbank, M., Le Guevel, R., Li, R., Guillouzo, A., et al., 2016 Jul. Rho-kinase/myosin light chain kinase pathway plays a key role in the impairment of bile canaliculi dynamics induced by cholestatic drugs. *Sci Rep [Internet]* 6 (1) [cited 2019 Jul 19].
- Smith, C., Gasparetto, M., Jordan, C., Pollyea, D.A., Vasiliou, V., 2015. The effects of alcohol and aldehyde dehydrogenases on disorders of hematopoiesis. In: Vasiliou, V., Zakhari, S., Seitz, H.K., Hoek, J.B. (Eds.), *Biological Basis of Alcohol-Induced Cancer [Internet]*. Cham: Springer International Publishing, pp. 349–359 [cited 2018 Jul 25].
- Stachel, N., Skopp, G., 2015 Feb. In vitro characterization of glucuronosyl- and sulfo-transferases involved in the conjugation of ethanol. *Arch. Kriminol.* 235 (1–2), 29–42.
- Stachel, N., Skopp, G., 2016 Aug. Formation and inhibition of ethyl glucuronide and ethyl sulfate. *Forensic Sci. Int.* 265, 61–64.
- Takahashi, T., Lasker, J.M., Rosman, A.S., Lieber, C.S., 1993 Feb. Induction of cytochrome P-4502E1 in the human liver by ethanol is caused by a corresponding increase in encoding messenger RNA. *Hepatology.* 17 (2), 236–245.
- Walsham, N.E., Sherwood, R.A., 2014. Ethyl glucuronide and ethyl sulfate. In: *Advances in Clinical Chemistry [Internet]*. Elsevier, pp. 47–71 [cited 2019 Jul 19].
- Winkler, M., Skopp, G., Alt, A., Miltner, E., Jochum, Th., Daenhardt, C., et al., 2013 Jul. Comparison of direct and indirect alcohol markers with PEth in blood and urine in alcohol dependent inpatients during detoxication. *Int. J. Legal Med.* 127 (4), 761–768.
- Zakhari, S., 2006. Overview: How Is Alcohol Metabolized by the Body? 29(4). pp. 10.
- Zhukov, A., Ingelman-Sundberg, M., 1999 Jun 1. Relationship between cytochrome P450 catalytic cycling and stability: fast degradation of ethanol-inducible cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) in hepatoma cells is abolished by inactivation of its electron donor NADPH-cytochrome P450 reductase. *Biochem. J.* 340 (Pt 2), 453–458.

Titre : Rôle des monocytes/macrophages dans le processus inflammatoire de l'hypertension artérielle pulmonaire et de la bronchopneumopathie chronique obstructive

Mots clés : Monocytes/Macrophages – Inflammation – Cytokines – Poumon

Résumé :

L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) et la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) sont deux pathologies pulmonaires graves dans lesquelles les productions accrues de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines contribuent au développement de l'inflammation au niveau pulmonaire et à la progression de la maladie. Ne disposant à ce jour d'aucun traitement curatif, il est essentiel de chercher à mieux comprendre les mécanismes de ces pathologies dans l'espoir d'identifier de potentielles nouvelles cibles thérapeutiques.

Dans ces travaux, nous avons pu confirmer l'implication de la voie de signalisation JAK/STAT dans la réponse inflammatoire et chimiotactique des macrophages humains exposés à de la fumée de cigarette et du LPS. De plus, l'utilisation d'inhibiteurs de cette voie a permis de modérer cette

réponse inflammatoire sans excessivement affaiblir la capacité des macrophages à lutter contre les pathogènes, en faisant une cible thérapeutique prometteuse dans le traitement de la BPCO.

Nous avons aussi pu évaluer les effets du facteur de croissance des nerfs (NGF) sur les monocytes humains non différenciés, ce qui nous a dans un premier temps amenés à soulever une problématique méthodologique concernant l'usage de l'albumine bovine comme protéine de transport pour le NGF, de par sa capacité à induire des réponses variées dans nos cellules. Nous avons ensuite pu mettre en évidence une potentielle capacité du NGF, s'il est associé à d'autres stimulus, à induire la production de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines par les monocytes humains non différenciés. Ces résultats soutiennent l'idée que le blocage de l'action du NGF puisse être bénéfique dans le traitement contre l'HTAP.

Title: Role of monocyte/macrophages dans the inflammatory process of pulmonary arterial hypertension and chronic obstructive pulmonary disease.....

Keywords: Monocyte/Macrophages – Inflammation – Cytokines - Lung

Abstract:

Pulmonary arterial hypertension (PAH) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) are two severe pulmonary pathologies in which increased pro-inflammatory cytokine and chemokine productions contribute to the development of pulmonary inflammation and to the progression of the disease. With no current curative treatment, it is essential to try to better understand the mechanisms of these pathologies in order to identify new potential therapeutic targets.

In this work, we were able to confirm the implication of the JAK/STAT pathway in the inflammatory and chemotactic response of human macrophages treated with cigarette smoke and LPS. Moreover, the use of inhibitors of this pathway allowed to reduce this inflammatory

response without impairing the capacity of macrophages to fight pathogens, making it a promising therapeutic target for COPD treatment.

We also evaluated the effects of the nerve growth factor (NGF) on undifferentiated human monocytes. We were at first brought to discover a methodologic issue concerning the use of bovine serum albumin as a carrier protein for NGF, because of its capacity to induce various response in our cells. We were then able to describe a potential capacity of NGF, if its associated with other stimulus, to induce the production of pro-inflammatory cytokines and chemokines in undifferentiated human monocytes. These results might support the idea that the blockade of the NGF action could be benefic in the PAH treatment.