



**HAL**  
open science

# Impact des extraits organiques de particules diesel (DEPe) sur la physiologie de macrophages humains polarisés *in vitro*

Marie Jaguin

► **To cite this version:**

Marie Jaguin. Impact des extraits organiques de particules diesel (DEPe) sur la physiologie de macrophages humains polarisés *in vitro*. Santé publique et épidémiologie. Université de Rennes, 2015. Français. NNT : 2015REN1S011 . tel-01188679

**HAL Id: tel-01188679**

**<https://theses.hal.science/tel-01188679>**

Submitted on 31 Aug 2015

**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.



**THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1**  
*sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne*

pour le grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1**

*Mention : Biologie*

**Ecole doctorale Vie-Agro-Santé**

présentée par

**Marie Jaguin**

Préparée à l'unité de recherche INSERM U1085 Irset  
Institut de recherche en santé, environnement et travail  
Faculté de Pharmacie

---

**Impact des extraits  
organiques de  
particules diesel  
(DEPe) sur la  
physiologie de  
macrophages  
humains polarisés *in  
vitro***

**Thèse soutenue à Rennes  
Le 8 avril 2015**

Devant le jury composé de :

**Agnès COSTE**

MCU - Université de Toulouse III / *rapporteur*

**Françoise PONS**

PU - Université de Strasbourg / *rapporteur*

**Christelle MONTEIL**

PU - Université de Rouen / *examineur*

**Sophie LANGOUET-PRIGENT**

DR - INSERM Rennes / *examineur*

**Valérie LECUREUR-ROLLAND**

MCU - Université de Rennes 1 / *directeur de thèse*



## **REMERCIEMENTS**

**Ce cursus universitaire aura été un long chemin parfois semé d'embûches mais grâce aux nombreuses personnes croisées au fil de toutes ces années il s'achève de la meilleure façon qu'il soit. Je tiens à toutes les remercier profondément...**

Je tiens d'abord à remercier la fondation cœur et artères ainsi que le ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche qui, par leurs financements ont permis à ce travail de voir le jour.

Je tiens à remercier chaleureusement le Dr Sophie Langouët-Prigent d'avoir accepté de présider ce jury de thèse

Je remercie vivement le Professeur Françoise Pons et le Docteur Agnès Coste d'avoir accepté de lire et de juger mon travail en qualité de rapporteur.

Je remercie sincèrement le Professeur Christelle Monteil de siéger à ce jury de soutenance de thèse en tant qu'examinatrice.

Je remercie chaleureusement le Dr Dominique Lagadic-Gossmann pour m'avoir si bien accueillie au sein de l'IRSET « Institut de recherche en santé, environnement et travail » au cours de mon Master 2 et durant les années de thèse qui ont suivies.

Je remercie particulièrement le Professeur Olivier Fardel pour m'avoir accueillie au sein de son équipe 2C2I « Contaminants Chimiques, Immunité et Inflammation », pour ces conseils et ses encouragements.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude au Docteur Valérie Lecureur pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce travail de thèse et l'avoir dirigé durant ces quatre dernières années. Merci mille fois Valérie pour ta rigueur scientifique, ta disponibilité, ta confiance et tes conseils qui m'ont permis de mener ce travail à son terme dans les meilleures conditions. Entre autres qualités, je me souviendrais toujours de ton enthousiasme et de ta bienveillance. Travailler à tes côtés a été un réel plaisir chaque jour renouvelé.

Un grand merci à tous les membres de l'équipe 2C2I :

Le Pr. Laurent Vernhet, le Pr. Lydie Sparfel, le Dr. Eric Le Ferrec et le Dr. Stéphane Jouneau, pour leurs conseils, leurs encouragements et leur gentillesse tout au long de mon travail.

Je remercie particulièrement Marc Levée pour toutes ses discussions scientifiques, ses précieux conseils et sa disponibilité. Bon courage pour la suite ! Je te souhaite le meilleur aussi bien professionnellement que personnellement tu le mérites !!

Merci aussi à Abdullah (Dr. Mayati) mon camarade de bureau et à Elodie Jouan pour leur gentillesse.

Je n'oublie bien sûr pas « la reine du Labo » Claudie Morzadec et sans qui cette thèse n'aurait pas eu la même saveur (et je ne parle pas que des crêpes...). Merci pour ta bonne humeur, tes précieux

conseils techniques, toutes ces soirées (avant les bébés !!) et pour les prochaines à venir. Longue vie à notre amitié !

Un grand merci au Dr. Mélinda Macoch (dit « la Macoch ») ma camarade de bureau et de galère !! Merci pour ton soutien, ton humour noir (assez raccord avec le mien !), les gâteaux, les chocolats les discussions et j'en passe... Je n'ai pas suivie tout tes conseils en Master 2 (Fuie !!) et je ne le regrette pas, ces quatre ans avec toi ont été un vrai plaisir !

Merci également à Patricia André et à Brigitte Bardot (la seule et l'unique !), les petites fées administratives du Labo qui nous simplifient la vie !

Dans le désordre merci à :

Kévin, dont je garderai l'image entre autre d'un hyper-actif virtuose de la mitoch !! (Qui n'a cependant pas le compas dans l'œil pour la quantité de nourriture à fournir pour notre couscous endiablé!!!). Je te souhaite plein de courage pour la dernière ligne droite et toute la réussite possible pour « l'après-thèse » !

Medjda merci pour ta bonne humeur depuis notre année de Master 1 ! J'ai hâte de participer à ton atelier macarons !

Simon et Laurie merci aux petits pioupious devenus grands... Bon vent à vous !

Je remercie sincèrement tous les membres de l'IRSET et en particulier Dominique Bonnier mais aussi Fred, Isabelle et Jacques pour m'avoir si gentiment accueillie à leur table pour déjeuner durant ma grossesse !

Les doctorants présents : Mickaël, Jérémy, Manuella, Fidaa... et passés : Elise, Jean-Philippe, Anthony, Octavie, Adéodat... pour l'esprit stimulant et sympathique qu'ils ont fait planer dans les couloirs du Labo tout au long de ces années

Un merci particulier à Normand, Claudie et Eric (encore !) pour toutes ces soirées apéros/terrasses resto et pour m'avoir permis de rester connectée à la civilisation lorsque j'étais « échouée » dans mon canapé lors de mon congé maternité...

Je remercie vivement le Dr Frédéric Derbré et le laboratoire M2S « Mouvement, sport, santé » pour m'avoir accueillie si sympathiquement lors de mes deux années de monitorat. Frédéric, merci pour la confiance que tu m'as accordé, j'ai beaucoup appris sur l'enseignement universitaire en travaillant avec toi. Tu es vraiment impressionnant !

Un grand merci à mes potes de Master avec qui ces 2 années ont été vraiment fun, on pourrait vite se retrouver mais attention « juste pour une bière ! » :

Janic, mon *alter ego*, qui s'envole bientôt pour de nouvelles aventures...Je te souhaite pleins de bonheur et une brillante et très longue carrière dans la recherche. Tu es née pour ça !

Caroline ma «petite protégée» et nouvellement maman, tu vas voir c'est ça la vraie aventure !!! Que ce bonheur continu !

Pierre-Jean et Marco mes deux bons potes, toujours dans les bons coups ! Je vous souhaite de réaliser tous vos projets...

Je tiens à exprimer mon infinie gratitude à mes amis de fac : Virginie, Phil, Antoine, Sam, Baptiste, Yann, Amélie et d'ailleurs : Claire, Xavier, Sarah pour leur présence indéfectible à mes côtés tout au long de ces années dans les moments les plus durs comme les plus heureux (y compris à la maternité à 3h00 du matin !!!). Je suis consciente de la chance que j'ai de vous avoir.

Je tiens tout particulièrement à remercier Virginie à qui je dois en partie d'être arrivée jusque-là. Depuis cette première année de DEUG où tu es devenue ma « preneuse de notes personnelle », je n'imaginai pas à quel point ton amitié sans faille allait me soutenir. Merci d'être toujours là après toutes ces années pour voir l'aboutissement de nos efforts et de ton engagement ! Merci pour tout, ta bonne humeur, ton infinie gentillesse, ces soirées endiablées, pour être là pour Rosalie... Bref, merci d'être toi. Je te souhaite tous les bonheurs du monde avec cette petite crevette qui pointe le bout de son nez à l'instant où j'écris ces quelques lignes... Bienvenue Lucien !!

Merci également à Aurélie, mon amie de 30 ans qui a partagé à l'égal d'une sœur toutes ces années avec moi, maternelle, primaire, collègue, lycée, fac... Aujourd'hui une nouvelle ère de maternité s'ouvre à nous et je suis heureuse de partager à nouveau cette expérience avec toi !

Je remercie également mes beaux-parents Louis et Suzanne qui m'ont soutenu tout au long de ce parcours parfois difficile. J'espère avoir pu vous rendre fière de ce que nous avons accompli !

Merci à mes parents de m'avoir élevée avec le sentiment que j'étais capable de tout accomplir. Je vous serai éternellement reconnaissante de m'avoir donné la confiance et la joie de vivre pour surmonter toute les difficultés de la vie et la liberté d'entreprendre l'impossible. Je vous dois tout ce que je suis.

Merci à mes sœurs Justine et Chloé les piliers d'où je tire ma force et mon équilibre. Merci Justine pour notre complicité à la limite de la gémellité et nos fous rires si particuliers que peu de gens peuvent comprendre ! Merci pour m'avoir conseillée et soutenue lors de notre colocation en dehors du nid familial. Merci Chloé ma petite sœur adorée pour ta gentillesse, merci également pour ta présence à chaque instant et en particulier ces derniers mois auprès de Rosalie qui a vraiment facilité cette fin de thèse je t'en suis très reconnaissante.

Pierre, je n'aurai jamais assez de mot pour te remercier d'être là depuis bientôt 15ans déjà !! Tu es mon nord magnétique, merci d'avoir cru en moi quand moi-même je n'y arrivais plus. Merci aussi de m'avoir donné le plus merveilleux des cadeaux cette année. Une page se referme et le futur est plein d'inconnues mais j'ai toute confiance en notre avenir qui à n'en pas douter sera radieux !

Et enfin, je tiens à remercier mon petit trésor Rosalie qui a participé (bien au chaud) à la réussite de ce projet. Paradoxalement, malgré les nuits de veilles, tu m'as donné une force incroyable pour finir cette thèse et j'espère qu'un jour tu seras fière de moi. Tu es ma plus grande réussite !



*Je dédicace ce travail à ma grand-mère Yvonne, ma mère Françoise, mes sœurs  
Justine et Chloé et à ma fille Rosalie,*

*Je suis fière d'appartenir à cette lignée de femmes pleines d'esprit, de force et  
d'amour...*



## Résumé

---

Les macrophages (M $\phi$ ), des cellules clefs de la réponse immunitaire peuvent répondre à des contaminants environnementaux comme les particules diesel (DEP), des polluants atmosphériques récemment classés cancérigènes pour l'Homme. Les M $\phi$  sont des cellules hétérogènes et plastiques qui s'activent en fonction de leur microenvironnement soit en M $\phi$  M1 (dits classiquement activés ou pro-inflammatoires) sous l'effet de l'INF $\gamma$  et du LPS soit en M $\phi$  M2 (dits alternativement activés ou réparateurs) sous l'effet de l'IL-4 et/ou de l'IL-13. Les effets des DEP sur la polarisation M1/M2 des M $\phi$  restent peu documentés.

Nous avons dans un premier temps caractérisé l'expression des marqueurs des M $\phi$  différenciés *in vitro* en présence de M-CSF à partir de monocytes humains et polarisés en sous-type M1 ou M2. Nos principaux résultats montrent que les M $\phi$  différenciés au M-CSF considérés comme des M $\phi$  anti-inflammatoires, sont en réalité capables de s'activer vers un phénotype M1 après une stimulation au LPS/INF $\gamma$ . De plus, les marqueurs mis en évidence au cours de ce travail ont permis d'évaluer l'impact d'extraits organiques de DEP (DEPe) sur la polarisation des M $\phi$  et plus généralement sur leur physiologie. Les DEPe altèrent l'expression de certains marqueurs M1 et M2 des M $\phi$ , sans toutefois provoquer d'inhibition globale des processus de polarisation M1 et M2 ou de transition d'un phénotype vers un autre. Cette altération du phénotype est associée à une diminution de la réponse inflammatoire LPS-dépendante dans les M $\phi$  M1 et des capacités chimiotactiques des M $\phi$  M2. Les DEPe diminuent la sécrétion de certaines cytokines et chimiokines comme l'IL-6, l'IL-12p40 et le CCL18 *via* l'activation d'AhR et/ou de Nrf2. Parallèlement, nous montrons que les M $\phi$  M1 et M2 exposés aux DEPe sécrètent le platelet derived growth factor B (PDGF-B), un facteur de croissance profibrosant, *via* l'activation d'AhR en quantité suffisante pour stimuler la prolifération de fibroblastes pulmonaires.

Au total, ces travaux démontrent que les DEP possèdent des propriétés immunotoxiques vis-à-vis de la physiologie des macrophages humains polarisés *in vitro*. Cette immunotoxicité pourrait participer aux effets délétères de ces contaminants environnementaux urbains sur la santé humaine.

**Mots-clés:** particules diesel, macrophages polarisés, M-CSF, AhR, Nrf2, PDGF-B, fibroblastes pulmonaires

## Abstract

---

Macrophages (M $\phi$ ), well-known to play a key role in immune response, also respond to environmental toxic chemicals such as diesel exhaust particles (DEP), an air pollutant recently classified as carcinogenic to humans. M $\phi$  are heterogeneous and plastic cells which activate according to their microenvironment into either an M1 subtype (so called classically activated or pro-inflammatory) under IFN $\gamma$  and LPS stimulation or an M2 subtype (so called alternatively activated or anti-inflammatory) under IL-4 and/or IL-13 stimulation. However, potential effects of DEPs on M1/M2 M $\phi$  polarization remain poorly documented.

First, we characterized the expression marker of *in vitro* M-CSF-differentiated M $\phi$  from human monocytes and activated into the M1 or M2 subtypes. Our main results show that M-CSF-generated M $\phi$  considered as anti-inflammatory are actually able to switch to an M1 phenotype after IFN $\gamma$ /LPS stimulation. Furthermore, the markers identified in this study were used to assess the impact of organic extracts of DEP (DEPe) on M $\phi$  polarization and more generally on their physiology. DEPe alter some M1 and M2 markers expressed by polarized M $\phi$ , without causing the overall inhibition of the M1 and M2 polarization process or the switch to a different phenotype. This phenotype alteration is associated with a decrease in the LPS-dependent inflammatory response in M1 M $\phi$  and the chemotactic capacities in M2 M $\phi$ . DEPe decrease the secretion of some cytokines and chemokines such as IL-6, IL-12p40 and CCL18 *via* AhR and/or Nrf2 activation. At the same time, we show that M1 and M2 M $\phi$  in response to DEPe are able to secrete a sufficient level of a pro-fibrotic growth factor, the platelet derived growth factor B (PDGF-B) *via* AhR activation, leading to stimulation of lung fibroblast proliferation.

Finally, these works show that DEPe have immunotoxic properties with regards to the physiology of human *in vitro* polarized M $\phi$ . This immunotoxicity may then contribute to the deleterious effects of these urban environmental contaminants on human health.

**Keywords:** diesel particle, polarized macrophages, M-CSF, AhR, Nrf2, PDGF-B, lung fibroblasts

LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	7
LISTE DES FIGURES .....	10
LISTE DES TABLEAUX.....	11
<b>I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>12</b>
<b>I.1. La pollution aux particules atmosphériques .....</b>	<b>13</b>
<i>Avant-propos.....</i>	<i>13</i>
<i>I.1.1. Propriétés physicochimiques des particules atmosphériques .....</i>	<i>14</i>
<i>I.1.1.1. Formation des particules .....</i>	<i>14</i>
<i>I.1.1.2. Granulométrie des particules.....</i>	<i>16</i>
<i>I.1.1.2.1. La classification .....</i>	<i>16</i>
<i>I.1.1.2.2. Pénétration des particules dans l'appareil respiratoire .....</i>	<i>17</i>
<i>I.1.1.3. Composition des particules de type diesel .....</i>	<i>18</i>
<i>I.1.2. Sources d'exposition aux particules diesel.....</i>	<i>21</i>
<i>I.1.2.1. Exposition environnementale .....</i>	<i>21</i>
<i>I.1.2.2. Expositions professionnelles.....</i>	<i>22</i>
<i>I.1.2.3. Réglementation en vigueur et seuils d'exposition.....</i>	<i>22</i>
<i>I.1.3. Bases moléculaires et cellulaires des effets des DEP.....</i>	<i>26</i>
<i>I.1.3.1. Altération du statut redox par les DEP .....</i>	<i>26</i>
<i>I.1.3.2. Modulation de l'activité des récepteurs, des voies de signalisations et des facteurs de transcriptions par les DEP .....</i>	<i>29</i>
<i>I.1.3.3. La voie de signalisation AhR. ....</i>	<i>33</i>
<i>I.1.3.3.1. Fonction biologique d'AhR.....</i>	<i>33</i>
<i>I.1.3.3.2. Activation de la voie AhR.....</i>	<i>34</i>
<i>I.1.3.3.3. Régulation de l'activité d'AhR.....</i>	<i>35</i>
<i>I.1.3.4. La voie de signalisation Nrf2.....</i>	<i>36</i>

1.1.3.4.1. Fonctions biologiques de Nrf2 .....	36
1.1.3.4.2. Activation et régulation de la voie Nrf2 .....	37
1.1.3.5. Activation des voies AhR et Nrf2 par les DEP .....	39
Conclusion .....	40
<b>I.2. Toxicité des particules de type Diesel.....</b>	<b>41</b>
Avant-propos.....	41
1.2.1. Cancérogénicité.....	42
1.2.1.1. Cancers associés à l'exposition chronique aux DEP .....	42
1.2.1.2. Mécanismes de cancérogénèse .....	42
1.2.2. Pathologies respiratoires non tumorales associées à une exposition aux DEP.....	44
1.2.3. Pathologies cardiovasculaires associées à une exposition aux DEP .....	46
Conclusion .....	46
<b>I.3. Les monocytes et les macrophages (M<math>\phi</math>).....</b>	<b>49</b>
Avant-propos.....	49
1.3.1. Présentation du système immunitaire .....	50
1.3.2. Définition et caractérisation du système monocyte/M $\phi$ .....	50
1.3.2.1. Origines des monocytes et des M $\phi$ .....	52
1.3.2.2. Hétérogénéité des monocytes.....	53
1.3.2.3. Les macrophages humains dérivés des monocytes .....	55
1.3.2.4. Facteurs de croissance et différenciation des macrophages (M $\phi$ ).....	57
1.3.3. Propriétés fonctionnelles des monocytes/macrophages (M $\phi$ ) .....	58
1.3.3.1. Les pattern recognition receptors (PRR).....	58
1.3.3.1.1. Les récepteurs Toll-Like (TLR).....	58
1.3.3.1.2. Les récepteurs lectine de type-C (RLC) .....	62
1.3.3.1.3. Les récepteurs scavenger (SR).....	63
1.3.3.2. La phagocytose.....	64
1.3.3.3. La production d'espèces activées de l'oxygène (EAO) et de l'azote (EAN) par les M $\phi$ .....	66

<b><i>1.3.3.4. Les cytokines et chimiokines</i></b> .....	<b>68</b>
<i>1.3.3.4.1. Les cytokines</i> .....	69
1.3.3.4.1.1. L'interleukine-12 (IL-12) et l'interleukine-23 (IL-23) .....	69
1.3.3.4.1.2. L'interleukine-6 (IL-6) .....	70
1.3.3.4.1.3. Le Tumor Necrosis Factor $\alpha$ (TNF $\alpha$ ) .....	70
1.3.3.4.1.4. L'interleukine-10 (IL-10).....	71
<i>1.3.3.4.2. Les chimiokines</i> .....	71
1.3.3.4.2.1. L'interleukine-8 (IL-8) .....	72
1.3.3.4.2.2. Les chimiokines CCL17, CCL18 et CCL22.....	72
<b><i>1.3.4. La polarisation des macrophages (M<math>\phi</math>)</i></b> .....	<b>74</b>
<b><i>1.3.4.1. Nomenclature</i></b> .....	<b>74</b>
<b><i>1.3.4.2. Les macrophages de type M1</i></b> .....	<b>74</b>
<b><i>1.3.4.3. Les macrophages de type M2</i></b> .....	<b>77</b>
<i>1.3.4.3.1. Les M<math>\phi</math> activés alternativement ou M2a</i> .....	78
<i>1.3.4.3.2. Les M<math>\phi</math> régulateurs M2b et M2c</i> .....	81
<b><i>1.3.4.4. Régulation transcriptionnelle de la polarisation des M<math>\phi</math></i></b> .....	<b>82</b>
<b><i>1.3.4.5. Limites du concept de polarisation M1/M2 des M<math>\phi</math></i></b> .....	<b>83</b>
<b><i>1.3.4.6. Rôles physiopathologiques des M<math>\phi</math></i></b> .....	<b>85</b>
<b><i>Conclusion</i></b> .....	<b>86</b>
<b><i>1.3.5. Immunotoxicité des DEP</i></b> .....	<b>86</b>
<b><i>1.3.5.1. DEP et lymphocytes T (LT)</i></b> .....	<b>87</b>
<b><i>1.3.5.2. DEP et cellules dendritiques (DC)</i></b> .....	<b>90</b>
<b><i>1.3.5.3. DEP et monocytes/macrophages (M<math>\phi</math>)</i></b> .....	<b>92</b>
<b><i>Conclusion</i></b> .....	<b>94</b>

## **II. OBJECTIFS DES TRAVAUX DE RECHERCHE..... 95**

### **III. TRAVAUX DE RECHERCHE PERSONNELS ..... 97**

**III.1. Article 1:** Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin..... **97**

*III.1.1. Contexte de l'étude..... 97*

*III.1.2. Manuscrit ..... 99*

*III.1.3. Discussion et perspectives..... 100*

**III.1.3.1. Apport du travail..... 100**

**III.1.3.2. Questionnements à approfondir... 102**

*III.1.3.2.1. Pourquoi faire le choix d'un modèle de M $\phi$  différencié au M-CSF ? ..... 102*

*III.1.3.2.2. Le M $\phi$  M1-M constitue-t-il un modèle pertinent et fonctionnel de M $\phi$  activé classiquement ? ..... 105*

*III.1.3.2.3. Comment compléter et caractériser le répertoire d'expression des M $\phi$  humains polarisés M1 et M2 ?..... 107*

*III.1.3.2.4. Comment appréhender et transposer les différences Homme vs souris ? ..... 110*

**III.1.3.3. Limite de l'étude..... 112**

**III.1.3.4. Conclusion et perspectives..... 112**

**III.2. Article 2:** Exposure to diesel exhaust particle extracts (DEPe) impairs some polarization markers and functions of human macrophages through activation of AhR and Nrf2. .... **114**

*III.2.1. Contexte de l'étude..... 114*

*III.2.2. Manuscrit ..... 117*

*III.2.3. Discussion et perspectives..... 118*

**III.2.3.1. Apport du travail..... 118**

**III.2.3.2. Effets géniques et phénotypiques des DEPe dans les M $\phi$ ..... 118**

**III.2.3.3. Questionnements à approfondir... 119**

*III.2.3.3.1. Les DEPe affectent-ils la signalisation induite par l'IFN $\gamma$  ou l'IL-4 ? ..... 119*

III.2.3.3.2. <i>Ahr ou Nrf2 jouent-ils un rôle inhibiteur direct sur l'expression des cytokines et des chimiokines dans les Mφ exposés au DEPe ?</i> .....	119
III.2.3.3.3. <i>Les effets des DEPe sur les cytokines M1 résultent-ils d'un défaut d'activation de la voie NF-κB ?</i> .....	120
III.2.3.3.4. <i>La modification des interactions d'AhR avec ses partenaires potentiels peut-elle expliquer les effets des DEPe sur les cytokines et les chimiokines.....</i>	120
III.2.3.3.5. <i>La diminution de l'expression des cytokines pro-inflammatoires par les DEPe dans les Mφ M1 implique-t-elle l'activation d'un répresseur de la réponse inflammatoire ?</i> .....	121
III.2.3.3.6. <i>La diminution Nrf2-dépendante de l'IL-6 par les DEPe dans les Mφ M1 est-elle liée à une activation de l'AMP-activated protein kinase (AMPK) ?</i> .....	123
III.2.3.3.7. <i>Un stress du réticulum causé par l'exposition des Mφ aux DEPe peut-il favoriser l'activation de Nrf2 et induire les effets décrits sur les cytokines et les chimiokines ?.....</i>	124
<b>III.2.3.4. Conclusion et perspectives</b> .....	124
<b>III.3. Article 3: AhR-dependent secretion of PDGF-B by human M1 and M2 macrophages exposed to DEP extracts stimulates lung fibroblast proliferation.....</b>	<b>126</b>
<b>III.3.1. Contexte de l'étude</b> .....	126
<b>III.3.2. Pourquoi s'intéresser à PDGF-B ?</b> .....	126
<b>III.3.3. Le Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)</b> .....	128
<b>III.3.3.1. La famille des ligands PDGF et leurs récepteurs</b> .....	128
<b>III.3.3.2. Expression, synthèse et biodisponibilité des ligands PDGF</b> .....	129
<b>III.3.3.3. Signalisation induite par le PDGF</b> .....	130
<b>III.3.3.4. Fonctions physiologiques de PDGF</b> .....	132
<b>III.3.3.5. Rôles physiopathologiques des PDGF</b> .....	132
III.3.3.5.1. <i>PDGF et cancers</i> .....	133
III.3.3.5.2. <i>PDGF et athérosclérose</i> .....	134
III.3.3.5.3. <i>PDGF et fibroses</i> .....	135
III.3.3.5.3.1. <i>PDGF et fibrose pulmonaire</i> .....	136
III.3.3.5.3.2. <i>PDGF et fibrose hépatique</i> .....	139
III.3.3.5.3.3. <i>PDGF et fibrose cardiaque</i> .....	139
III.3.3.5.3.4. <i>PDGF et autres pathologies fibrosantes</i> .....	139

<i>III.3.4. Manuscrit .....</i>	<i>140</i>
<i>III.3.5. Discussion et perspectives.....</i>	<i>141</i>
<i>III.3.5.1. Apport du travail.....</i>	<i>141</i>
<i>III.3.5.2. Questionnements à approfondir... ..</i>	<i>141</i>
<i>III.3.5.2.1. Quels composants des DEP peuvent induire la production de PDGF par les M<math>\phi</math> ? .....</i>	<i>141</i>
<i>III.3.5.2.2. Par quels mécanismes AhR pourrait-il réguler l'expression induite de PDGF-B ? .....</i>	<i>142</i>
<i>III.3.5.2.3. L'effet prolifératif du PDGF-BB produit par les M<math>\phi</math> exposés aux DEPe sur les fibroblastes pulmonaire est-il spécifique ?.....</i>	<i>143</i>
<i>III.3.5.2.4. Les fibroblastes pulmonaires cultivés en présence de milieux conditionnés de M<math>\phi</math> exposés aux DEPe acquièrent-ils un phénotype de myofibroblastes ?.....</i>	<i>144</i>
<i>III.3.5.2.5. L'induction de PDGF-B après une exposition aux DEP est-elle retrouvée in vivo et dépend-t-elle également de AhR ? .....</i>	<i>144</i>
<i>III.3.5.3 Conclusion et perspectives.....</i>	<i>145</i>
<b>IV. CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>146</b>
<b>V. BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>146</b>

---

## LISTE DES ABREVIATIONS

---

<b>1-NP:</b> 1 -Nitropyrene	<b>CMH II:</b> Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II
<b>8-oxodG:</b> 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine	<b>CMLV:</b> Cellules Musculaires Lisses Vasculaires
<b>ABC:</b> ATP-binding-cassette	<b>CNC:</b> Cap 'N' Collar
<b>ADN:</b> Acide DésoxyriboNucléique	<b>COL1A1:</b> collagène de type 1 alpha 1
<b>AhR:</b> Aryl hydrocarbon Receptor	<b>CPA:</b> Cellules Présentatrices d'Antigène
<b>AhRR:</b> AhR Repressor	<b>CSF:</b> Colony Stimulating Factor
<b>AMP:</b> Adénosine MonoPhosphate	<b>CSF-1R:</b> Colony Stimulating Factor-1 Receptor
<b>AMPK:</b> AMP-activated protein kinase	<b>CTLD:</b> Domaines de Type Lectine C
<b>AP-1:</b> Activated Protein-1	<b>Cul3:</b> cullin-3
<b>APC:</b> Allophycocyanin	<b>CYP450:</b> cytochromes P450
<b>ApoE:</b> Apolipoprotéine E	<b>dA:</b> la déoxyAdénosine
<b>ARE:</b> Antioxydant Responsive Element	<b>DAMP:</b> Danger-Associated Molecular Patterns
<b>arg1:</b> Arginase 1	<b>DC:</b> Cellules Dendritiques
<b>ARN:</b> Acide RiboNucléique	<b>DC-SIGN:</b> Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin (ou CD209)
<b>ARNT:</b> Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator	<b>DEP:</b> Diesel Exhaust Particle
<b>ATF:</b> Activating Transcription Factor	<b>DEPe:</b> Diesel exhaust Particle extract
<b>ATP:</b> Adénosine TriPhosphate	dG: déoxyGuanosine
<b>B(a)P:</b> Benzo(a)pyrène	<b>DJ1:</b> DnaJ homolog 1
<b>B(e)P:</b> Benzo(e)pyrène	<b>DSS:</b> Dextran sulfate sodium
<b>bHLH:</b> basic Helix-Loop-Helix	<b>EAN:</b> Espèces Activées de l'Azote
<b>BIP:</b> Immunoglobulin Binding Protein	<b>EAO:</b> Espèces Activées de l'Oxygène
<b>BPCO:</b> Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive	<b>EGFR:</b> Epidermal Growth Factor Receptor
<b>BPDE:</b> B(a)P 7,8-dihydrodiol-9,10 Epoxyde	<b>EGF-TM7:</b> Epidermal Growth Factor-7 Transmembrane (récepteur)
<b>BPDE-N<sub>2</sub>-dG:</b> BPDE-N <sup>2</sup> -déoxyGuanosine	<b>Egr2:</b> Early growth response 2
<b>Bzip:</b> Basic region leucine zipper	<b>EIF2<math>\alpha</math>:</b> eukaryotic Initiation Factor 2 alpha
<b>CaMK:</b> Calcium calmoduline Kinases	<b>ELK-1:</b> ETS domain-containing protein
<b>CAT:</b> Catalase	<b>EMHV:</b> Ester Méthylique d'Huiles Végétales
<b>CBP:</b> CREB Binding Protein	<b>EpRE:</b> Electrophile Responsive Element
<b>CCR:</b> Récepteur aux chimiokines de type CC	<b>ERK:</b> Extracellular signal-Regulated Kinases
<b>CD:</b> Cluster de différenciation	<b>FAP:</b> Filtre à Particules
<b>CHOP:</b> CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein	<b>Fc<math>\gamma</math>R:</b> Récepteur au Fragment constant (Fc) gamma
<b>CIRC:</b> Centre International de Recherche sur le Cancer	<b>FGF2:</b> fibroblast growth factor 2 (basic)
	<b>FICZ:</b> 6-formylindolo[3,2-b]carbazole

**FITC:** Fluoresceine Isotiocyanate  
**FNII:** Fibronectine de type II (domaine)  
**FPI:** Fibrose Pulmonaire Idiopathique  
**GalNAC:** Galactose-N-acétylglucosamine  
**GCL:** Glutamate Cystéine Ligase  
**GM-CSF:** Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor  
**GPI:** Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol  
**GPL:** Gaz de Pétrole Liquéfié  
**GPrx:** Glutathion Peroxydase  
**GPx:** Glutathion Peroxydase  
**GR:** Glutathion Réductase  
**Gr1:** Granulocyte antigen 1  
**GS:** Glutathion Synthase  
**GSH:** Glutathion  
**GSK-3 $\beta$ :** Glycogen Synthase Kinase-3  $\beta$   
**GSSH:** Glutathion Disulfide  
**GST:** GlutathionTransférase  
**GTP:** Guanosine TriPhosphate  
**HAP:** Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques  
**HIF-1 $\alpha$ :** Hypoxic Inducible Factor 1 alpha  
**HO-1:** Hème Oxygénase 1  
**ICAM:** InterCellular Adhesion Molecule  
**IDO1:** Indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase 1  
**IFN $\gamma$ :**  $\gamma$  Interféron gamma  
**Ig:** Immunoglobulines  
**IKK:** I $\kappa$ B kinases  
**IL:** Interleukine  
**iNOS:** NO-Synthase inductible  
**INSEE:** Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques  
**IRAK:** IL-1R Associated Kinase  
**IRE1:** Inositol-Requiring Protein-1  
**IRF:** Interferon Regulatory Factor  
**JAK:** Janus Kinase  
**Jmjd3:** Jumonji domain containing 3  
**JNK:** c-Jun N-terminal Kinase  
**Keap1:** Kelch-like ECH-associated protein 1  
**Klf:** Krueppel-like factor  
**LB:** Lymphocytes B  
**LBD:** Ligand Binding domain  
**LBP:** LPS Binding Protein  
**Lox-1:** Lectin-type oxidized LDL receptor 1  
**LPS:** LipoPolySaccharide  
**LT:** Lymphocytes T  
**LTA:** Acide Lipoteichoïque  
**LTreg:** Lymphocytes T régulateurs  
**M $\phi$ :** Macrophages  
**Maf:** musculo-aponeurotic fibrosarcoma  
**ManLAM:** lipoarabinomannane mannosylé  
**MAPK:** Mitogen Activated Protein Kinase  
**M-CSF:** Macrophage-Colony Stimulating Factor  
**M-CSFR:** Macrophage-Colony Stimulating Factor Receptor  
**MD2:** Myeloid Differentiation Factor  
**MDC:** Macrophage Derivated Chemokine (ou CCL22)  
**MEC:** Matrice Extracellulaire  
**MGL:** Macrophage galactose-type C-type lectin  
**MIP1 $\alpha$ :** Macrophage Inflammatory Protein 1 alpha (CCL3)  
**MIP-2:** Macrophage Inflammatory Protein-2 (ou CXCL2)  
**MMP2:** Matrix MetalloProteinase-2  
**MPO:** Myélopéroxydase  
**MR:** Récepteur au Mannose (ou MRC1 ou CD206)  
**MyD88:** Myeloid Differentiation factor 88  
**NAC:** N-acétylcystéine  
**NADPH oxydase (ou Nox):** Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate oxydase  
**NADPH:** Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate  
**NER:** Nucleotide Excision Repair  
**NF- $\kappa$ B:** Nuclear Factor kappa B  
**NK:** Natural Killers  
**NLS:** Nuclear Localization Signal  
**NOS:** NO Synthase  
**NOx:** oxydes d'azotes

**NPC1:** Niemann Pick type C1

**NQO1:** NADPH quinone oxydoréductase 1

**Nrf2:** Nuclear factor-erythroid 2 related factor 2

**OCDE:** Organisation de Coopération et de Développement Economique

**OMS:** Organisation Mondiale de la Santé

**OxLDL:** Lipoprotéines oxydées

**PAMP:** Pathogen Associated Molecular Patterns

**PARC:** Pulmonary and Activated Regulated Chemokine (ou CCL18)

**PAS:** Per ARNT Sim

**PCB:** PolyChloroBiphényles

**PCR:** Polymerase Chain Reaction

**PDGF-B:** Platelet Derived Growth Factor-B

**PDGF-R:** Récepteur aux PDGF

**PE:** Phycoérythrine

**PERK:** Protein kinase RNA-like ER Kinase)

**PI3K:** Les PI3 Kinases

**PKC:** Protéine Kinase C

**PLC $\gamma$ :** Phospholipase C $\gamma$

**PM:** Particulate Matter

**PMA:** Phorbol 12-Myristate 13 Acetate

**PPAR $\gamma$ :** Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma

**PRR:** Pattern Recognition Receptors

**PTK:** Protéines Tyrosine Kinase

**PTP:** Permeability Transition Pore

**RANTES:** Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted (ou CCL5)

**RE:** Réticulum Endoplasmique

**RLC:** Récepteurs Lectines de type-C

**ROFA:** Residual oil fly ash

**RT-qPCR:** RetroTranscription-quantitative Polymerase Chain Reaction

**SAPK:** Stress-Activated Protein Kinases

**SDF-1 $\alpha$ :** stromal cell-derived factor 1 alpha

**SEM:** Standard Error of the Mean

**SOCS:** Suppressors Of Cytokine Signalling

**SOD:** SuperOxyde Dismutase

**Sp1:** Specific Protein 1

**SR:** Récepteurs Scavengers

**SR-B1:** Scavenger Receptor B1

**STAT:** Signal Transducer and Activator of Transcription

**TAM:** Macrophages Associés aux Tumeurs

**TARC:** Thymus and Activation Regulated Chemokine (ou CCL17)

**tBHQ:** tert-ButylHydroQuinone

**TCDD:** 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine

**TCR:** T Cell Receptor

**TGF $\beta$ :** Transforming Growth Factor-beta

**TIR:** Toll Interleukin-1 Receptor

**TIRAP:** TIR adaptor protein

**TLR:** Toll Like Receptor

**TNF:** Tumor Necrosis Factor

**TNF $\alpha$ :** Tumor necrosis factor alpha

**TRAF:** TNF Receptor Associated Factor

**TRIFF:** TIR-domain-containing adaptater-inducing interferon- $\beta$

**TSLP:** Thymic Stromal LymphoPoietin

**UPR:** Unfolded Protein Response

**VCAM:** Vascular Cell Adhesion Molecule

**VEGF:** Vascular Endothelial Growth Factor

**WLTP:** Worldwide harmonized Light vehicles Test Procedures

**XRE:** Xenobiotic Response Element

**$\alpha$ -SMA:** Smooth Muscle- alpha-Actin



## LISTE DES FIGURES

---

Figure 1: Mécanisme de formation des particules diesel.....	15
Figure 2: Modèle de déposition des différentes fractions de particules inhalée dans les régions nasopharyngée, trachéo-bronchiques et alvéolaire des voies respiratoires humaines lors d'une respiration nasale.....	17
Figure 3: Distribution granulométrique typique des particules issues d'un moteur diesel en masse (traits pointillés) et en nombre (traits pleins).....	18
Figure 4: Schéma des particules diesel (DEP). Les DEP sont formées d'un cœur carboné sur lequel s'adsorbent des hydrocarbures, des sulfates et des traces de métaux. ....	19
Figure 5 : Composition des particules diesel.....	20
Figure 6 : Répartition mondiale des concentrations annuelles moyennes de PM10 en 2009 par densité de la population.....	21
Figure 7: Evolution des valeurs limites d'émission de particules autorisées par la norme Euro pour les véhicules diesel en Europe. ....	23
Figure 8: Déséquilibre de la balance redox dans une cellule.....	26
Figure 9: Modèle hiérarchique de réponse cellulaire au stress oxydant produit par une exposition aux DEP. ....	28
Figure 10 : Représentation schématique de la structure d'AhR.....	33
Tableau 2: Phénotypes observés chez les souris AhR <sup>-/-</sup> .....	34
Figure 11: Mécanisme d'activation de la voie AhR par les DEPe.....	36
Figure 12: La voie de signalisation Nrf2 et mécanisme d'activation par les DEPe. ....	38
Figure 13: Formation d'adduits à l'ADN: exemple du B(a)P. ....	43
Figure 14: Mécanismes physiopathologiques généraux reliant l'exposition aux PM à la morbidité et la mortalité cardiopulmonaire. ....	48
Figure 15: Origine et différenciation des monocytes et des macrophages (M $\phi$ ). ....	53
Figure 16: Représentation biparamétrique des trois populations de monocytes humains par cytométrie de flux.....	54
Figure 17: Activation des voies de signalisation MyD88 et TRIF dépendantes par la reconnaissance de PAMPs par les TLR de surface et intracellulaires.....	60
Figure 18: Représentation schématique des membres de la famille des récepteurs scavenger.....	63
Figure 19: Modèle de liaison et de l'internalisation des particules IgG-opsonisées par les récepteurs de type FcR.....	65
Figure 20: Les principales étapes de la phagocytose d'une particule. ....	66
Figure 21: Mécanisme de formation des EAO par l'activation de la NADPH oxydase. ....	68
Figure 22: Production de péroxynitrite (OONO <sup>-</sup> ) par la réaction de l'anion superoxyde (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) avec le monoxyde d'azote (NO.).....	68
Figure 23: Les différentes formes d'activation des macrophages (M $\phi$ ).....	78
Figure 24: Les principales voies de signalisation contrôlant la polarisation M1/M2 des macrophages. ....	83
Figure 25: Le spectre chromatique de l'activation des macrophages.....	84
Figure 26: Schéma du protocole de polarisation des macrophages (M $\phi$ ).....	98
Figure 27: Expression du CD14 et du CD71 dans les monocytes et les macrophages différenciés au GM-CSF (M0-GM) et au M-CSF (M0-M). ....	103
Figure 28: Expression des antigènes de surface avant et après la polarisation des macrophages humains. ....	103
Figure 29: Sécrétion des chimiokines CCL2 et CCL22 par les macrophages non polarisés différenciés au GM-CSF (M0-GM) et au M-CSF (M0-M). ....	104
Figure 30: Effet du LPS sur la sécrétion d'IL-10 par les macrophages humains M1-M et M-2-M.....	107

Figure 31: Sécrétion des chimiokines CCL17 et CCL18 par les macrophages humains polarisés différenciés au M-CSF.....	109
Figure 32: Induction de l'expression d'ATF3 par les DEP et leurs composés organiques (DEPe) <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> .....	122
Figure 33: La famille des PDGF chez les mammifères.....	128
Figure 34: Interactions des différentes isoformes des ligands PDGF avec les récepteurs aux PDGF. ....	129
Figure 35: Voies de signalisations activées par les PDGFR.....	131
Figure 36: Inhibition de la surexpression de PDGF-B induite par les DEPe et la TCDD dans les macrophages M1 par la mithramycine, un inhibiteur de Sp1.....	143
Figure 37: Les DEP stimulent l'expression de PDGF-B <i>in vivo</i> . ....	145

## LISTE DES TABLEAUX

---

Tableau 1: Concentrations limites de PM <sub>10</sub> et PM <sub>2.5</sub> autorisées au sein de l'Union Européenne .....	23
Tableau 2: Phénotypes observés chez les souris AhR <sup>-/-</sup> .....	34
Tableau 3: Les TLR et leurs ligands connus chez l'Homme. ....	59
Tableau 4: Panel de marqueurs pour la caractérisation phénotypique des macrophages humains activés et non activés.....	101
Tableau 5: Phénotypes observés chez les souris PDGF-A <sup>-/-</sup> , PDGFR $\alpha$ <sup>-/-</sup> et PDGF-B <sup>-/-</sup> et PDGFR $\beta$ <sup>-/-</sup> ....	133

## REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

---

## **I.1. La pollution aux particules atmosphériques**

---

### *Avant-propos*

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), la pollution de l'air constitue « l'ensemble des contaminations de l'environnement intérieur ou extérieur par un agent chimique, physique ou biologique qui modifie les caractéristiques naturelles de l'atmosphère ». La pollution particulaire atmosphérique est formée de l'ensemble des particules solides et/ou liquides en suspension dans l'air. Contrairement à d'autres sources de pollution environnementale, les particules atmosphériques ne forment pas une entité chimique bien caractérisée, mais représentent un mélange complexe et hétérogène de substances organiques et minérales de tailles, de compositions et d'origines diverses. Ces particules se définissent par leur taille, encore appelé diamètre aérodynamique. Elles présentent une grande hétérogénéité de ce point de vue puisqu'elles recouvrent des diamètres allant de 0.001  $\mu\text{m}$  à 100  $\mu\text{m}$ . Cette classification granulométrique des particules, couramment utilisée, est pertinente au niveau toxicologique puisqu'elle traduit leur potentiel de pénétration dans l'appareil respiratoire. Cependant, d'autres critères fondamentaux tels que la composition chimique, l'origine ou la nature (physico-chimique ou biologique) sont à prendre en compte afin d'évaluer le potentiel toxique et l'impact sanitaire de cette pollution particulaire.

Dans ce contexte, notre étude se focalise sur les particules de type diesel (de l'anglais DEP pour Diesel Exhaust Particles) qui contribuent en milieu urbain de façon substantielle à la pollution atmosphérique. Ces particules émises par les échappements de véhicules à moteur diesel ou par les activités industrielles représentent plus de 50% des particules de tailles inférieures à 10  $\mu\text{m}$  contenues dans l'atmosphère urbaine et constituent de par leur nature chimique un risque sanitaire majeur.

### *1.1.1. Propriétés physicochimiques des particules atmosphériques*

#### *1.1.1.1. Formation des particules*

Les particules atmosphériques, en fonction de leur mécanisme de formation, peuvent être de type primaire ou secondaire. Les particules primaires c'est-à-dire directement émises dans l'atmosphère par une source peuvent être, soit d'origine naturelle, issues principalement du volcanisme ou d'autres sources terrigènes, soit de nature anthropique ayant comme origine la combustion de carburants classiques (essence, kérosène, gazole), de combustibles solides (charbon, bois) et les activités industrielles et agricoles (1, 2). Les particules secondaires peuvent également être d'origine naturelle et anthropique. Elles résultent de réactions chimiques mettant en jeu notamment la transformation de polluants gazeux tels que les oxydes d'azotes (NO<sub>x</sub>) ou de soufre (SO<sub>2</sub>) respectivement en nitrates et en sulfates. Ces polluants sont généralement rejetés dans l'atmosphère par les centrales électriques, les activités industrielles et la circulation automobile (3). Il existe une classification des particules liée aux différents mécanismes de leur formation qui divise cet ensemble en trois modes distincts (4):

- ✓ **Le mode de nucléation** : les particules se forment par nucléation de gaz atmosphériques en condition de sursaturation. Les particules secondaires formées ont une taille de l'ordre du nanomètre.
- ✓ **Le mode d'accumulation** : les particules secondaires issues de la nucléation vont croître par coagulation ou condensation.
- ✓ **Le mode grossier**: les particules secondaires sont générées par des processus mécaniques.

La formation des particules diesel dans les moteurs peut être attribuée à la forte hétérogénéité de la flamme dans la chambre de combustion. Les particules diesel peuvent être d'origine primaire et secondaire : elles sont générées par l'agglomération de particules primaires carbonées très poreuses issues de la combustion incomplète du mélange air/gazole dans le cylindre moteur formant ainsi des particules secondaires par mode d'accumulation. D'après Kittelson (5), le mécanisme de formation des particules diesel primaires présenté **Figure 1** se divise en 5 étapes :

1- Lors de la combustion, l'appauvrissement croissant en hydrogène provoque la reformation du carburant en composés aromatiques.

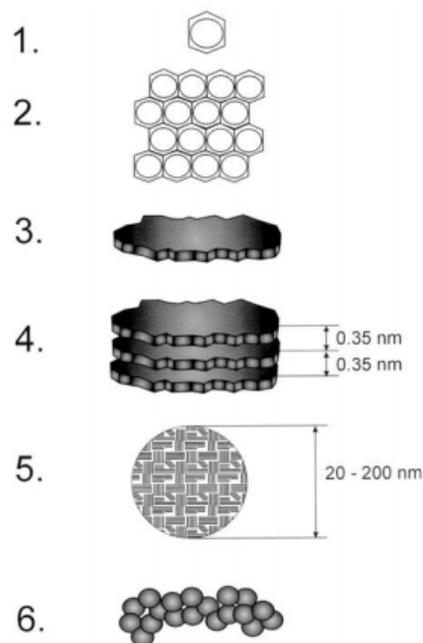
2- Localement, un environnement réducteur est créé par des teneurs élevées en carburant, ce qui favorise la réaction des composés aromatiques entre eux pour former des polymères de plus en plus lourds et pauvres en hydrogène.

3- Ces polymères s'agglomèrent en feuillets en absence d'hydrogène.

4- Les feuillets s'agglomèrent entre eux pour former une structure cristalline proche du graphite.

5- Ces micro-structures s'associent pour former des particules.

6- Les sphérules élémentaires s'agglomèrent pour former les particules diesel.



**Figure 1: Mécanisme de formation des particules diesel (5).**

De plus, lorsque le carburant contient du soufre, l'acide sulfurique formé par oxydation entraîne une absorption rapide de molécules d'eau du fait de son fort potentiel hygroscopique. Ces particules primaires qui sont créées dans des conditions de températures élevées et de fortes concentrations vont rapidement diffuser les unes vers les autres pour former des agglomérats constituants des particules secondaires.

Les particules diesel de type secondaire, suivant les conditions de fonctionnement des moteurs, sont générées selon les trois modes de formation précédemment cités. Le mode de nucléation génère principalement des particules à partir des gaz d'échappement froids ou faiblement dilués lors par exemple de point de ralentissement et dans les tunnels. Les particules formées par accumulation constituent le mode principal de formation en terme de masse des échappements diesel.

Les composés organiques plus ou moins volatils tels que les hydrocarbures aromatiques imbrûlés rejetés peuvent alors s'adsorber par condensation sur la couche poreuse de ces agglomérats secondaires. Ces particules diesel, une fois rejetées de la conduite d'échappement vont poursuivre leur évolution dans l'atmosphère vers des particules de plus grande dimension.

### ***1.1.1.2 Granulométrie des particules***

#### ***1.1.1.2.1 La classification***

La matière particulaire atmosphérique constitue un aérosol « polydispersé » c'est-à-dire un mélange non uniforme de particules dont le spectre dimensionnel s'étend sur des ordres de grandeur allant de 0.001  $\mu\text{m}$  à 100  $\mu\text{m}$  de diamètre.

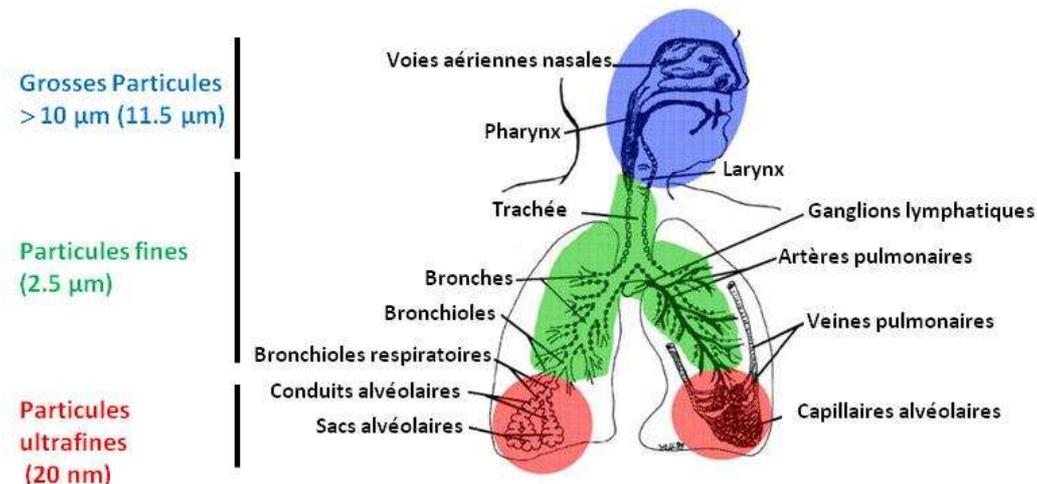
Deux classifications basées sur la taille granulométrique des particules sont communément utilisées. Une dénomination toxicologique faisant référence à la taille des particules par l'utilisation des termes « grossières, fines, ultrafines et/ou nano » et une terminologie appliquée dans les normes de qualité de l'air dite métrologique utilisant l'abréviation PM pour « Particulate Matter » suivi de l'indice de diamètre aérodynamique (1, 6). Cette classification suivant la taille des particules est un bon indicateur de leur pouvoir de pénétration dans l'arbre trachéo-bronchique et est directement lié à leurs effets délétères sur la santé.

- ✓ **Les  $\text{PM}_{10}$  (ou particules grossières)** correspondent aux particules dont le diamètre aérodynamique est inférieur à 10  $\mu\text{m}$ . Cette fraction de particules peut pénétrer l'appareil respiratoire jusqu'aux bronches et bronchioles (7) (**Figure 2**).
- ✓ **Les  $\text{PM}_{2,5}$  (ou particules fines)** correspondent aux particules dont le diamètre aérodynamique est inférieur à 2.5  $\mu\text{m}$ . Cette fraction pénètre profondément dans l'appareil respiratoire pour se déposer au niveau des alvéoles pulmonaires (1, 7) (**Figure 2**).
- ✓ **Les  $\text{PM}_{0,1}$  (ou particules ultrafines et/ou nanoparticules)** correspondent aux particules dont le diamètre aérodynamique est inférieur à 0.1  $\mu\text{m}$ . Cette fraction dont la taille est inférieure aux structures cellulaires a une capacité de pénétration au niveau intracellulaire (4, 8, 9).

### *1.1.1.2.2 Pénétration des particules dans l'appareil respiratoire*

L'appareil respiratoire permet la respiration c'est-à-dire les échanges gazeux entre l'organisme et l'environnement. Il est de ce fait le lieu de dépôt privilégié des particules présentes dans l'atmosphère une fois inhalées. L'arbre respiratoire se compose des voies aériennes supérieures et inférieures (ou intrathoraciques) qui forment la partie conductrice permettant à l'air de circuler jusqu'aux alvéoles pulmonaires, lieu d'échanges gazeux (**Figure 2**). Les recherches montrent que 3 caractéristiques importantes déterminent la probabilité de dépôt pulmonaire d'une particule inhalée :

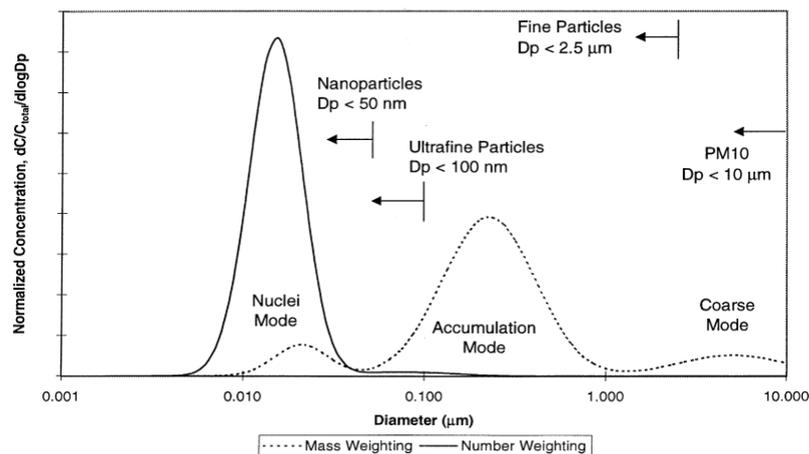
- ✓ **Le diamètre aérodynamique de la particule** : la probabilité de dépôt des particules dans les poumons est inversement proportionnelle à leur taille. Les particules fines ( $2,5 \mu\text{m}$ ) sont retrouvées à 83% dans les poumons tandis que seulement 31% des grosses particules ayant une taille de l'ordre de  $11,5 \mu\text{m}$  y parviennent (11) (**Figure 2**). Près de 50% des particules de  $20 \text{ nm}$  sont retrouvées au niveau des sacs alvéolaires. Les particules de taille intermédiaire ( $5 \text{ nm}$ ) se répartissent équitablement entre ces 3 sites de dépôt (10) (**Figure 2**).
- ✓ **Les mouvements respiratoires** peuvent également influencer sur le dépôt des particules dans les poumons. Il peut être accru lors par exemple d'un exercice physique ou encore chez des sujets atteints de pathologies obstructives des voies aériennes (12).
- ✓ **La morphologie du poumon**, altérée chez les patients atteints de pathologies pulmonaires pourrait également entraîner une déviation dans l'absorption des particules inhalées et ainsi constituer un facteur accentuant le dépôt des particules dans les poumons (12).



**Figure 2: Modèle de dépôt des différentes fractions de particules inhalées dans les régions nasopharyngées, trachéo-bronchiques et alvéolaires des voies respiratoires humaines lors d'une respiration nasale. Adapté de (10).**

La fraction adsorbée sur la particule qu'elle soit lipophile ou soluble dans les liquides cellulaires et extracellulaires peut ensuite être absorbée et diffuser à travers les membranes ou se lier à des protéines ou autres structures subcellulaires. Ces composés peuvent ainsi passer dans la circulation sanguine ou lymphatique entraînant leur distribution dans tout le corps (10). Les particules les plus fines peuvent également, une fois déposées, transloquer vers des sites extrapulmonaires et atteindre d'autres organes cibles *via* la circulation sanguine et lymphatique (13).

Le diamètre aérodynamique des particules diesel varie selon les conditions de fonctionnement des moteurs. Kittelson (1998) (14) a modélisé cette distribution granulométrique montrant qu'il existe deux principales tailles de particules : celles formées par nucléation (entre 5 et 50 nm) et les particules issues de l'accumulation qui correspondent comme précédemment évoqué à l'agglomération de particules primaires carbonées issues de la combustion incomplète du carburant et dont la taille varie entre 50 et 300 nm. Dans une moindre mesure, des particules de type grossière (ou PM<sub>10</sub>) avec un diamètre aérodynamique moyen de 5 µm sont également générées par le relargage de la couche de suie déposée dans les canalisations d'échappement des moteurs diesel (**Figure 3**).

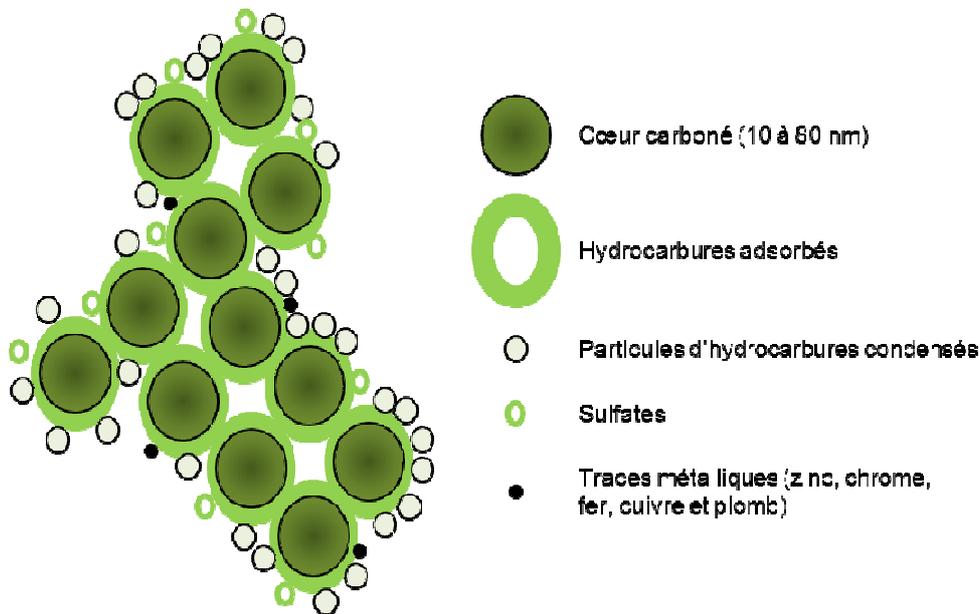


**Figure 3: Distribution granulométrique typique des particules issues d'un moteur diesel en masse (trait pointillé) et en nombre (trait plein) (14).**

### ***1.1.1.3 Composition des particules de type diesel***

La corrélation entre les composants chimiques et les caractéristiques physiques des PM<sub>10</sub> et des PM<sub>2.5</sub> est faible. Au niveau des composants chimiques, la fraction grossière (PM<sub>10</sub>) regroupe des sources naturelles (poussières en suspension, matières biologiques comme les pollens, les bactéries) tandis que les fractions fines et ultrafines (PM<sub>2.5</sub> et PM<sub>0.1</sub>) sont dominées par des émissions anthropiques (15).

Les particules diesel sont constituées d'un cœur carboné sur lequel va s'adsorber une fraction organique soluble composée essentiellement d'hydrocarbures aromatiques, de sulfates, d'eau, d'éléments métalliques (Figure 4).



**Figure 4: Schéma des particules diesel (DEP).** Les DEP sont formées d'un cœur carboné sur lequel s'adsorbent des hydrocarbures, des sulfates et des traces de métaux. Adapté de (14).

La composition des particules diesel est fortement liée aux conditions de fonctionnement des moteurs, au type de carburant et au système de post-traitement comme la présence d'un pot catalytique. Généralement, plus la charge du moteur est grande, plus la masse de la fraction organique soluble adsorbée sur la particule élémentaire est importante. La masse totale de cette fraction de carburants et d'huiles de moteur imbrûlés varie entre 10 et 90% (en absence de catalyseur d'oxydation en sortie moteur). Elle représente un mélange très complexe de plus de 1000 composés différents issus essentiellement de l'évaporation puis de la re-condensation des carburants après combustion plus ou moins incomplète. La composition de cette fraction organique soluble comprend ainsi des composés aliphatiques dont la chaîne carbonée est constituée de 9 à 28 carbones pour le gazole. Mais surtout, elle est majoritairement constituée de composés mono et poly-aromatiques notamment des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) tels que le fluoranthène, le pyrène, le benzo(a)pyrène, le benz(a)anthracène et les nitro-HAP comme le nitropyrène. Ces HAP sont présents à l'origine dans le carburant ou peuvent être reformés lors de la combustion du carburant et non intégrés aux feuillets lors de la formation de la particule diesel. On retrouve également, dans ce mélange complexe, des composés partiellement oxydés issus de l'huile de lubrification évaporée ou

encore des aldéhydes et des alcènes. Les composés soufrés présent sur les particules dépendent de la composition initiale en soufre du carburant. Ce sont majoritairement des sulfates résultant de l'oxydation du soufre du gazole en  $\text{SO}_2$ , une petite fraction, oxydée en  $\text{SO}_3$  forme de l'acide sulfurique une fois hydratée. De nombreux éléments métalliques (zinc, chrome, cuivre, fer et plomb) entre dans la composition des particules diesel. Ils proviennent des huiles de lubrification et de l'usure du moteur (Figure 5).

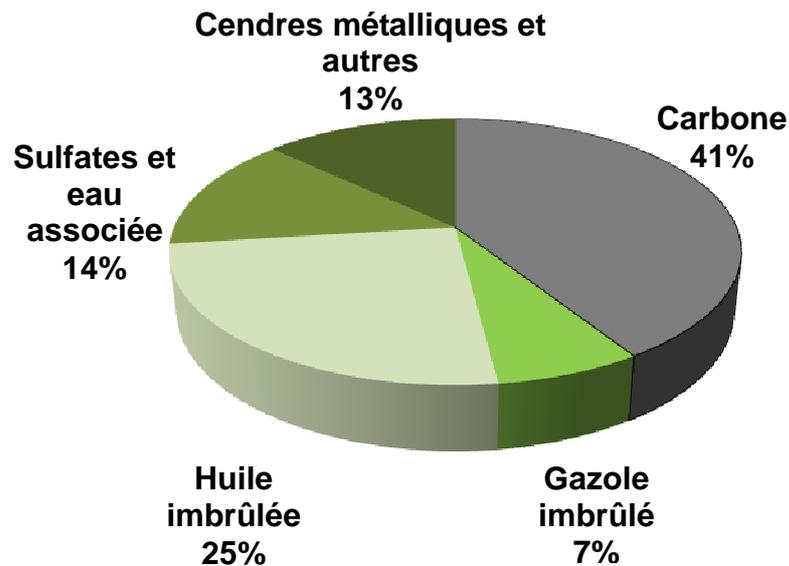


Figure 5 : Composition des particules diesel. (D'après (14))

Ces particules présentent une très grande surface de réactivité de 10 à 100  $\text{m}^2/\text{g}$ . Globalement, plus la dimension des particules est faible, plus la surface capable d'adsorber des composés est grande.

Ainsi, ces particules de petites tailles générées par les moteurs diesel vont se propager dans l'atmosphère et subir d'autres modifications. Il peut se produire une dégradation photochimique des composés organiques qui peuvent alors interagir avec d'autres composés présents dans l'atmosphère. L'ozone ( $\text{O}_3$ ) atmosphérique, par exemple, peut s'adsorber sur les particules diesel et dans l'atmosphère, ou encore le carbone élémentaire peut catalyser la réaction d'oxydation du  $\text{SO}_2$  en acide sulfurique. Il faut également ajouter à ce mélange complexe, les composés d'origine biologique tels que les endotoxines et les allergènes qui sont également capables de s'adsorber sur les particules diesel (16).

## 1.1.2. Sources d'exposition aux particules diesel

### 1.1.2.1. Exposition environnementale

Les particules diesel sont rejetées dans l'atmosphère *via* les gaz d'échappements des moteurs, ainsi l'air est le principal vecteur de cette pollution.

Les niveaux d'exposition à la pollution atmosphérique varient en fonction de la saison et de la localisation. En effet, durant l'hiver, les émissions de particules fines dues aux chauffages domestiques s'ajoutent aux autres sources d'émission. Au niveau de la localisation, l'exposition à la pollution atmosphérique est plus importante dans les pays qui n'appartiennent pas à l'Organisation de Coopération et de Développement Économique (OCDE) c'est à dire le Brésil, la Russie, l'Inde, l'Indonésie, la Chine et l'Afrique du Sud, ainsi que les pays en développement dans le reste du monde. Il y a ainsi des régions densément peuplées dans le monde qui ont des concentrations élevées de pollution de l'air, en particulier les mégapoles des pays en développement. L'urbanisation et l'essor industriel rapide dans ces pays a donné lieu à une demande énergétique croissante et une augmentation de la consommation de biens matériels. Par conséquent, les mégapoles combinent des émissions concentrées de polluants de l'air et un grand nombre de personnes exposées (Figure 6). Des zones de forte pollution particulaire sont également retrouvées dans les milieux urbains des pays développés, mais dans une moindre mesure (17).

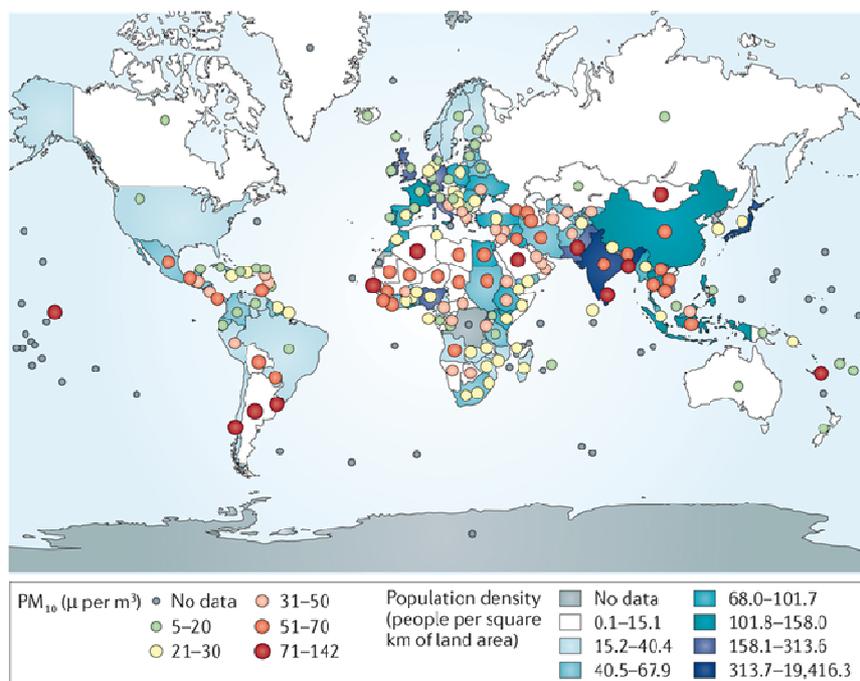


Figure 6 : Répartition mondiale des concentrations annuelles moyennes de PM<sub>10</sub> en 2009 par densité de la population (18).

### *1.1.2.2. Expositions professionnelles*

Certains milieux professionnels sont fortement exposés aux émissions de particules diesel. Dans l'industrie du charbon, une étude a montré que les mineurs de fond étaient exposés à des concentrations moyennes de particules diesel comprises entre 40 et 384  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  (19). Les travailleurs de l'industrie du pétrole, des transports routiers et ferroviaires sont également concernés par une exposition professionnelle aux particules diesel (20).

**En résumé, la croissance économique mondiale, l'augmentation de l'industrialisation et de l'urbanisation font que la population mondiale est de plus en plus exposée à la pollution atmosphérique et en particulier aux particules de type diesel, malgré les recommandations et réglementations nationales ou internationales.**

### *1.1.2.3. Réglementation en vigueur et seuils d'exposition*

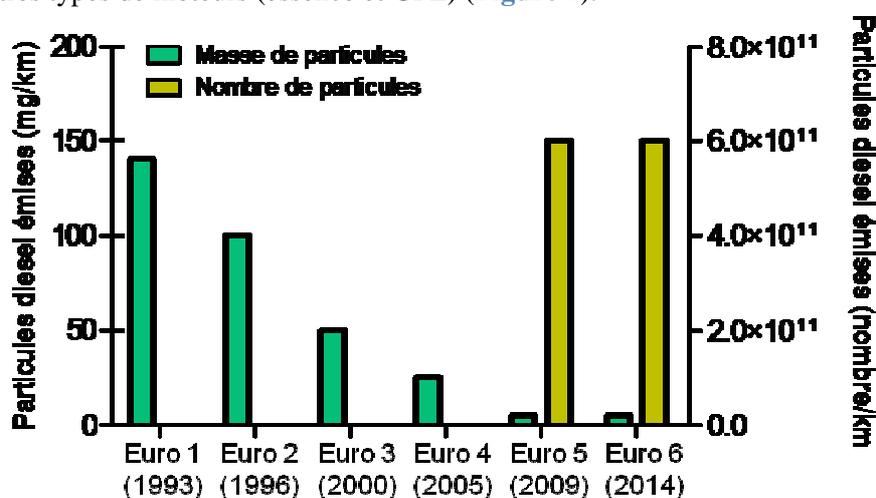
Pour tenter d'influer sur les politiques sanitaires publiques, l'OMS établit régulièrement des recommandations de seuils d'exposition aux particules atmosphériques. Cette organisation établit les lignes directrices relatives à la qualité de l'air et évalue les effets de la pollution atmosphérique sur la santé à l'aide de données scientifiques pour fixer des valeurs seuils au-delà desquelles, cette exposition engendre des effets sanitaires nuisibles. Les dernières recommandations de l'OMS datant de 2006 placent le seuil de concentration pour les  $\text{PM}_{2.5}$  à 10  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  de moyenne annuelle et 25  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  de moyenne sur 24 heures (21).

Au niveau européen, deux valeurs limites ont été fixées pour les  $\text{PM}_{10}$ , la première est de 50  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  sur 24 heures et cette valeur ne doit pas excéder plus de 35 jours par an. La seconde est une moyenne de 40  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  annuelle dont aucun dépassement n'est autorisé. En ce qui concerne les  $\text{PM}_{2.5}$ , la commission a fixé en 2010 pour les Etats membres une valeur limite de 25  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  (**Tableau 1**).

POLLUANT	CONCENTRATION	PÉRIODE MOYENNE	NATURE JURIDIQUE	DÉPASSEMENTS AUTORISÉS PAR AN
PM <sub>10</sub>	50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	24 heures	Valeur limite est entrée en vigueur le premier janvier 2005	35 jours
	40 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	1 an	Valeur limite est entrée en vigueur le premier janvier 2005	0
PM <sub>2.5</sub>	25 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	1 an	Valeur cible est entrée en vigueur le premier janvier 2010 Valeur limite entre en vigueur le premier janvier 2015	0

**Tableau 1: Concentrations limites de PM<sub>10</sub> et PM<sub>2,5</sub> autorisées au sein de l'Union Européenne (d'après <http://ec.europa.eu/environment/air/quality/standards.htm>)**

Les normes européennes d'émission, appelées normes Euro, fixent des limites maximales de plus en plus strictes d'émission de polluants pour les véhicules motorisés nouvellement mis sur le marché. Ces normes ont pour but de réduire la pollution atmosphérique due au transport routier. Elles se succèdent depuis 1993 et diffèrent en fonction du type de moteur (essence, GPL, diesel). Actuellement, la législation correspond à la norme Euro 6 entrée en vigueur le premier janvier 2014. Elle limite le niveau massique d'émission de particules à 5 mg/km. Cette limitation n'a pas évolué depuis la norme Euro 5. Cependant depuis la norme Euro 5, une limitation de nombre de particules émises a été introduite. La norme Euro 6 a simplement étendu cette limitation du nombre de particules émises aux autres types de moteurs (essence et GPL) (Figure 7).



**Figure 7: Evolution des valeurs limites d'émission de particules autorisées par la norme Euro pour les véhicules diesel en Europe.**

Cette limitation en nombre tient compte de la diminution de la taille des particules (plus nocives) sous l'effet de l'installation quasi systématique d'injection directe sur les moteurs diesel et essence. Ces particules fines et ultrafines produites n'étaient pas représentées dans la répartition massique des particules diesel (cf Figure 3). Par exemple, la masse des particules émises aux Etats-Unis était diminuée d'un facteur 10 quand, dans le même temps, leur nombre était multiplié par 20 (22). Actuellement, le nombre de particules émises par kilomètre est limité en Europe à  $6.10^{11}$  pour les véhicules diesel.

Plusieurs réponses techniques dites de « post-traitement » ont été apportées par les constructeurs automobiles pour répondre aux préoccupations politiques et environnementales qui ont entraîné l'adoption de ces normes d'émission :

- **Le filtre à particules (FAP)** dont l'utilisation est obligatoire depuis 2011 sur les véhicules diesel. Le FAP a pour rôle de filtrer les gaz d'échappement des moteurs diesel en réduisant certains composés dont les particules solides. Celles-ci sont piégées mécaniquement au travers d'un filtre. Une stratégie de régénération permettant d'éliminer les suies recueillies est alors nécessaire.

- **Le pot catalytique (ou catalyseur)** en vigueur en France depuis 1997 pour les automobiles à moteur diesel. Ce dispositif vise à éliminer, sélectionner ou retraiter les émissions nocives des gaz d'échappement. Ces catalyseurs provoquent une triple action, d'où leur nom de catalyseurs trois voies : **(1)** transformation du CO en CO<sub>2</sub>, **(2)** des NOx en N<sub>2</sub> (azote) et CO<sub>2</sub>, et **(3)** des hydrocarbures imbrûlés en CO<sub>2</sub> et en eau. Cependant, sur les moteurs diesel, ces dispositifs sont généralement à 2 voies seulement et ne prennent pas en charge les oxydes d'azote.

Ces procédés semblent la solution idéale et on pourrait penser que le problème lié à la pollution particulaire est alors résolu mais plusieurs critiques peuvent être apportées :

Les éléments accumulés au niveau du FAP ont tendance à boucher le filtre, il est donc nécessaire de le « nettoyer » régulièrement (on parle de « régénération »). La régénération du filtre s'effectue généralement à intervalle régulier (tous les 500 km par exemple) soit par une combustion à haute température des gaz d'échappement, soit en ajoutant des additifs. Le filtre doit, en plus de ces régénérations, être nettoyé en profondeur tous les 80.000 km ce qui n'est pas rigoureusement le cas du fait du coût de la maintenance. Par ailleurs, bien que très efficace en masse, les FAP ont une efficacité limitée si l'on considère le nombre de particules filtrées, notamment pour les particules les plus fines. Seulement 1 à 5 % (en masse) des particules échappent aux filtres, cependant, leur nombre est considérable étant donné leur petite taille ( $\geq 1\mu\text{m}$ ). Celles-ci sont d'autant plus nocives pour la santé puisqu'elles pénètrent plus profondément dans l'appareil respiratoire. On estime le nombre de particules qui échappent aux FAP à près de 600 milliards de particules par km (masse des particules échappant au filtre / la masse d'une particule de 0.5  $\mu\text{m}$ ).

Les pots catalytiques sont quant à eux très peu adaptés à la conduite sur des trajets courts comme en ville, surtout en hiver puisque leur température optimale d'utilisation doit atteindre les 300°C. Ils sont également très exigeants en terme d'entretien.

**D'après l'Institut National de la Statistique et des Études Économiques (INSEE), la part des véhicules personnels à moteur diesel dans le parc automobile français représente plus de 62.1% au premier janvier 2014 et la durée de vie des véhicules particuliers atteint 8.5 ans. On peut donc considérer que la majorité des voitures circulant à l'heure actuelle ne sont pas équipées de FAP (obligatoire en 2011). L'exposition à ces types de polluants particuliers reste donc une problématique majeure.**

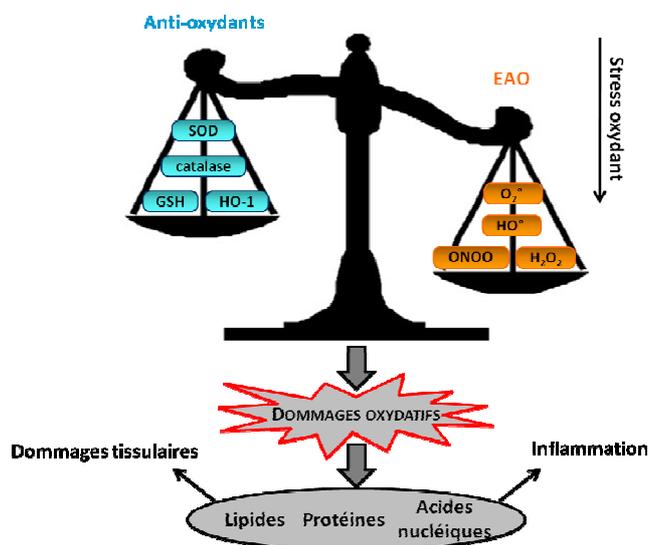


### I.1.3. Bases moléculaires et cellulaires des effets des DEP

#### I.1.3.1. Altération du statut redox par les DEP

Le stress oxydant est considéré comme le mécanisme principal à l'origine des effets toxiques des polluants atmosphériques comme les particules diesel. Les DEP sont composées d'HAP, de quinones et de métaux de transition qui sont des agents pro-oxydants capables de perturber le statut redox des cellules en activant la production d'espèces réactives de l'oxygène (EAO).

Le stress oxydant décrit par Sies en 1991 (23) est un phénomène caractérisé par un déséquilibre dans la balance entre systèmes pro-oxydants et anti-oxydants (statut redox) en faveur des systèmes pro-oxydants pouvant conduire à des altérations cellulaires (**Figure 8**). Ce déséquilibre peut être causé par deux événements étroitement liés, à savoir une production accrue de molécules pro-oxydantes comme les EAO ainsi qu'une inhibition des systèmes protecteurs anti-oxydants (24).



**Figure 8: Déséquilibre de la balance redox dans une cellule. D'après (24–26).**

Les EAO sont issues de la métabolisation de l'oxygène et regroupent les espèces radicalaires comme l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) ou le radical hydroxyle (OH<sup>•</sup>) possédant un ou plusieurs électrons non appariés et les espèces non radicalaires telles que le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ou l'oxygène singulet (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>). Ces molécules vont pouvoir hautement réagir avec les différentes macromolécules biologiques (lipides, protéines, ADN). Il existe de multiples sources endogènes d'EAO au niveau cellulaire. Elles peuvent être formées par la réduction mono-électrique du dioxygène au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale, ou encore produites au niveau des péroxysomes et du réticulum

endoplasmique (RE). Les systèmes enzymatiques comme la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase (ou Nox) des cellules immunitaires activées de même que les enzymes de métabolisation de phase 1 de la famille des cytochromes P450 (CYP450) constituent une source importante d'EAO (27, 28). L'exposition à des facteurs exogènes tels que les radiations, les agents cancérigènes ou infectieux, les médicaments, le tabac ou encore les polluants atmosphériques peut aussi aboutir à une surproduction d'EAO responsable d'un stress oxydant (27, 29).

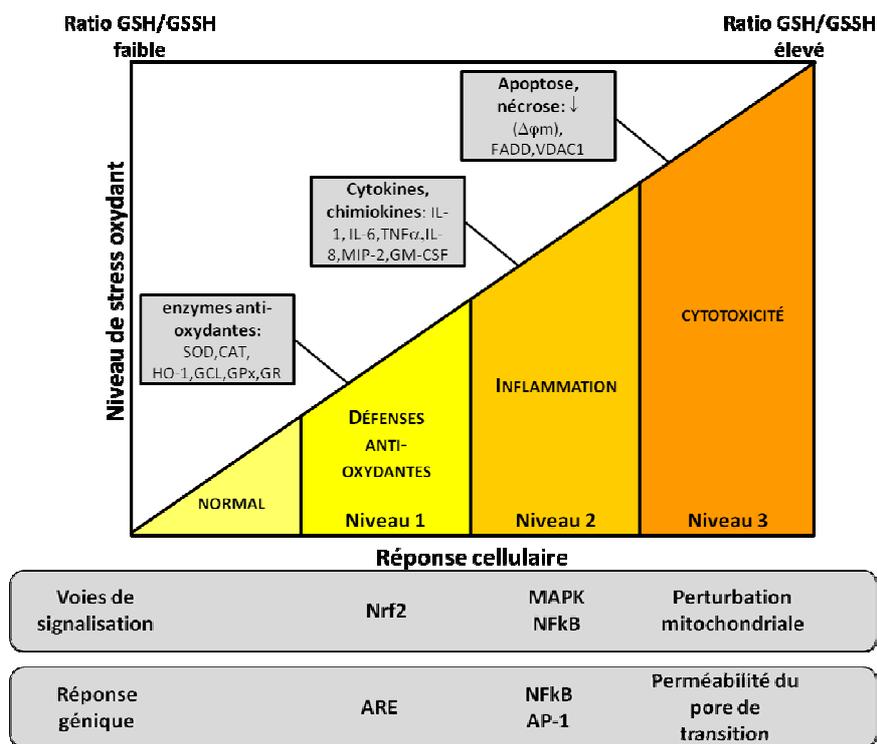
Produites en faibles doses, les EAO peuvent jouer un rôle de messagers secondaires intracellulaires dans différents processus biologiques, en modifiant des molécules sensibles aux variations de statut redox. Ces modifications peuvent ainsi conduire à la modulation de diverses voies de signalisation (27). Cependant, une production excessive d'EAO et notamment du radical hydroxyle engendre des atteintes cellulaires comme la formation d'aldéhydes. Ces composés ainsi formés vont générer des adduits aux molécules biologiques en réagissant avec les groupements nucléophiles de l'ADN, les fonctions thiols des protéines et en favorisant la peroxydation des phospholipides membranaires (30). Ces altérations cellulaires par un stress oxydant non contrôlé conduisent à la mort cellulaire par nécrose ou apoptose.

La production d'EAO ( $O_2^\circ$ ,  $OH^\circ$  et  $H_2O_2$ ) après exposition aux DEP a été mise en évidence dans différents modèles cellulaires comme les macrophages ( $M\phi$ ), les cellules épithéliales bronchiques, les cardiomyocytes et les microsomes de poumons (31–35). Bien que les caractéristiques physiques des particules (taille et surface de réactivité) jouent un rôle dans cette production d'EAO, la fraction chimique des DEP est en grande partie responsable de leur potentiel pro-oxydant (29, 36). En effet, à partir des quinones la réaction de Fenton catalyse la production de  $OH^\circ$  et de  $H_2O_2$  en présence de fer ou de cuivre ionique et de NADH (37). Les HAP adsorbés sur les DEP sont aussi responsables de la production d'EAO ( $O_2^\circ$ ,  $OH^\circ$  et  $H_2O_2$ ) après conversion métabolique en dérivés de quinones par les CYP450, l'époxyde hydrolase et la dihydrodiol déhydrogénase (28, 38). Les métaux de transition présents dans les DEP participent aussi de manière importante à leur pouvoir pro-oxydant (39, 40). Les DEP peuvent également générer indirectement des EAO et notamment de l'anion superoxyde en stimulant l'activité de la NADPH oxydase par les  $M\phi$  (41). Cette production enzymatique d' $O_2^\circ$  permet la destruction d'agents pathogènes mais peut également conduire à des dommages des tissus sains.

En plus d'un stress oxydant, les DEP peuvent aussi induire un stress nitrosant par la production accrue de peroxyxynitrite (ONOO). Une étude montre une augmentation de la production d' $O_2^\circ$  chez des souris exposées aux DEP et à un cocktail de cytokines inflammatoires. Cette surproduction d' $O_2^\circ$  serait due à une augmentation de l'expression de la xanthine déhydrogénase ainsi qu'à la diminution de l'activité cytosolique de la superoxyde dismutase (SOD). L'interaction de l' $O_2^\circ$

ainsi formé avec le monoxyde d'azote (NO) lui-même produit *via* l'activation de la NO-synthase inductible (iNOS) par des cytokines inflammatoires augmente la production de peroxynitrite (ONOO) (42).

L'exposition des Mφ et des cellules épithéliales aux composés chimiques des DEP entraîne une réponse biologique hiérarchisée au stress oxydant (43) (**Figure 9**). L'augmentation du niveau de stress oxydant conduit à une transition des effets protecteurs vers des effets délétères ; lorsque la production d'EAO dépasse la capacité du tissu à les neutraliser, cela peut entraîner un stress oxydant *via* la déplétion en Glutathion (GSH). Le GSH est un système antioxydant non enzymatique majeur. Ce tripeptide ( $\gamma$ -L-Glutamyl-L-cystéinyglycine) possède des propriétés réductrices grâce à la présence du groupement thiol sur sa cystéine. En formant des conjugués spontanément ou catalysés par des GSH-transférases avec des métabolites électrophiles, il permet la détoxification de nombreux xénobiotiques (44). Il favorise aussi l'élimination des EAO : la réduction du  $H_2O_2$  en  $H_2O$  par la glutathion peroxydase (GPx) conduit à la formation d'une forme oxydée du GSH, le glutathion disulfide (GSSH). Cette forme oxydée peut alors être réduite à son tour par une réaction catalysée par la glutathion réductase (GR). La proportion relative de ces deux formes du GSH reflète ainsi le niveau de stress oxydant auquel les cellules sont exposées (45) (**Figure 9**):



**Figure 9: Modèle hiérarchique de réponse cellulaire au stress oxydant produit par une exposition aux DEP. Adapté de (37, 46).**

Au plus faible niveau de stress oxydant causée par une exposition aux DEP (**Niveau 1** correspondant à 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), les enzymes anti-oxydantes et de détoxification de phase II sont induites pour restaurer l'homéostasie redox intracellulaire. Ces enzymes sont impliquées notamment dans la synthèse du GSH comme la GS (Glutathion Synthase) et la GCL (Glutamate Cystéine Ligase) qui se compose d'une sous-unité catalytique (la GCLc) et d'une sous-unité régulatrice (la GCLm). Cette enzyme conditionne le maintien des niveaux intracellulaires de GSH. Le stress oxydant généré par les DEP induit aussi l'expression de la NADPH quinone oxydoréductase 1 (NQO1) qui catalyse la réduction des quinones en hydroquinones limitant ainsi la formation d'espèces radicalaires semiquinones ( $\text{Q}^\cdot$  et QH). L'exposition aux DEP stimule également l'expression d'autres enzymes anti-oxydantes et détoxifiantes comme la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion transférase (GST), la catalase et l'Hème Oxygénase 1 (HO-1). Cette dernière est une enzyme qui, en dégradant l'hème en bilirubine et biliverdine (des composés antioxydants), possède une fonction cytoprotectrice (47, 48). L'augmentation de l'expression de ces enzymes est contrôlée au niveau transcriptionnel par le facteur de transcription Nrf2 (Nuclear factor-erythroid 2 related factor 2) dont les modalités d'activation et de régulation sont détaillées au paragraphe I.1.3.4 de ce chapitre.

À un niveau intermédiaire de stress oxydant (**Niveau 2** équivalent à 50  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), la production d'EAO par les cellules épithéliales pulmonaires et les M $\phi$  exposés aux DEP et à leurs composés chimiques active des cascades de signalisation intracellulaire telles que les Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) et la voie NF- $\kappa$ B. L'activation de ces voies sensibles au potentiel redox peut conduire à l'activation de la transcription de gènes pro-inflammatoires (43).

Finalement, une exposition à de fortes concentrations de DEP ( $\geq 100 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) induisant un niveau très élevé de stress oxydant (**Niveau 3**) provoque des perturbations du fonctionnement de la mitochondrie. Ces dommages impliquent une diminution du potentiel de membrane mitochondriale, une ouverture du pore de transition (PTP pour Permeability Transition Pore), une désorganisation de la chaîne de transfert des électrons et la production accrue d'anion superoxyde (32, 36). Ces altérations favorisent la libération par la mitochondrie de molécules pro-apoptotiques comme le cytochrome c et engagent la cellule dans des processus de mort cellulaire par apoptose ou nécrose (37, 39).

### ***I.1.3.2. Modulation de l'activité des récepteurs, des voies de signalisations et des facteurs de transcriptions par les DEP***

Le stress oxydant subi par les cellules lors d'une exposition aux DEP et à ses composants chimiques peut moduler l'activité de certaines voies de signalisation comme celles des MAPK ou de facteurs de transcription tels que Nuclear Factor kappa B (NF- $\kappa$ B) ou Activated Protein-1 (AP-1). Ces

différentes protéines ont comme point commun d'être sensibles aux variations intracellulaires du statut redox.

Les DEP peuvent induire la phosphorylation et ainsi l'activation certains récepteurs membranaires comme l'Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) dans des cellules pulmonaires humaines par des mécanismes impliquant une inhibition de l'activité des phosphatases chargées habituellement de déphosphoryler ce récepteur (49).

Les MAPK sont des sérine/thréonine kinases impliquées dans de nombreux processus cellulaires comme la prolifération, la différenciation, la survie ou l'apoptose (50). Chez les mammifères, on distingue 3 classes majeures de MAPK : extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK 1 et 2), c-Jun N-terminal kinases/stress-activated protein kinases (JNK/SAPKs) et les p38-kinases. Généralement, une cascade de signalisation impliquant des MAPK kinase kinases et MAPK kinases conduit à l'activation de ces différentes kinases par phosphorylation. Une fois activées par différents stimuli (facteurs de croissance, cytokines, facteurs de stress), les MAPK régulent l'expression de gènes *via* la phosphorylation du facteur de transcription AP-1.

L'exposition aux DEP peut activer les 3 classes de MAPK, cependant cette activation est dépendante de différents paramètres comme la composition des particules, le type cellulaire et la dose d'exposition. La teneur en métaux de transition joue un rôle déterminant dans la capacité des particules à activer les MAPK. Une étude montre une activation des MAPK (ERK1/2, JNK et p38) à la fois *in vivo* sur des coupes de poumon de rats et *in vitro* sur des cellules épithéliales pulmonaires humaines (HAEC) exposés au ROFA (Residual oil fly ash), un polluant particulaire avec une forte concentration en métaux de transition généré par la combustion d'huiles et de diesel (51). L'activation des MAPK par les DEP peut également différer selon le type cellulaire considéré. Wang *et al.*, (2005) (52) montrent que l'exposition *in vitro* à des doses identiques d'extraits organiques des DEP (DEPe) active les trois MAPK (JNK, p38 et ERK) dans la lignée épithéliale pulmonaire BEAS-2B alors que seules JNK et p38 sont activées dans la lignée macrophagique murine RAW 264.7. La dose d'exposition conditionne aussi l'activation des MAPK par les DEP. Seule des concentrations intermédiaires ou élevées ( $\geq 50 \mu\text{g/ml}$ ) de DEPe sont capables d'induire l'activation de JNK dans différentes lignées cellulaires humaines (52, 53). De plus, l'exposition à  $50 \mu\text{g/ml}$  de DEP montre une activation de JNK mais pas de ERK1/2 au niveau d'explants de trachée de souris Balb/C (54).

Le facteur de transcription AP-1, un substrat des MAPK peut aussi être une cible des particules. L'exposition de M $\phi$  alvéolaires de rat aux particules ultrafines stimule la phosphorylation de AP-1 conduisant à l'induction de l'expression d'une cytokine pro-inflammatoire, le TNF $\alpha$  (Tumor necrosis factor alpha) (55). Une autre étude montre une augmentation de l'activité de liaison de AP-1 sur le promoteur du gène de l'IL-8 dans des cellules HAEC exposées aux DEPe (56). Plusieurs

mécanismes d'activation des MAPK par les polluants particulaires ont été avancés et d'une manière générale, ils impliquent un stress oxydant. L'utilisation d'un antioxydant ou d'un chélateur de calcium intracellulaire bloque l'activation d'AP-1 induite par les particules ultrafines suggérant que la production d'EAO pourrait favoriser la libération intracytosolique de calcium et conduire à l'activation de MAPK et de facteurs de transcription comme AP-1 (55). La présence de métaux comme le vanadium pourrait aussi inhiber directement ou indirectement l'activité de phosphatases chargées de réprimer l'activation des MAPK (49, 51).

La famille des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B est activée en réponse à la stimulation de nombreux récepteurs membranaires tels que les Toll Like Receptor (TLR) et jouent un rôle essentiel dans l'expression de nombreuses cytokines pro-inflammatoires. Cette famille regroupe plusieurs membres formant principalement des hétérodimères composés des sous-unités Rel (p65) et p50 qui sont séquestrés, à l'état latent, dans le cytoplasme par l'interaction avec la protéine inhibitrice I $\kappa$ B $\alpha$ . Lors d'une stimulation, la protéine inhibitrice I $\kappa$ B $\alpha$  est phosphorylée par des I $\kappa$ B kinases (IKK) et dégradée par le protéasome. L'hétérodimère libéré peut alors transloqué dans le noyau où il se lie à des éléments de réponse  $\kappa$ B et active la transcription de gènes en s'associant avec le coactivateur CREB Binding Protein (CBP/p300). Les DEP sont capables d'activer la voie NF- $\kappa$ B initiant ainsi la production de médiateurs pro-inflammatoires. Des études reportent une stimulation de l'activité de NF- $\kappa$ B favorisant sa liaison au promoteur de l'IL-8 dans des cellules HAEC et dans la lignée cellulaire BEAS-2B exposées aux DEP (56, 57). Cette activation conduit à la production d'une chimiokine pro-inflammatoire l'IL-8. Une autre étude portant sur des cellules épithéliales pulmonaires de souris montre aussi une augmentation de la liaison de NF- $\kappa$ B radiomarqué sur les éléments de réponse  $\kappa$ B du promoteur d'une autre chimiokine MIP-2 pour pro-inflammatoire macrophage inflammatory protein-2 (ou CXCL2) après exposition des cellules au PM<sub>2.5</sub> (58). Pourazar *et al.*, (2005) (59) exposent des sujets sains aux DEP et l'immunomarquage des biopsies des bronches avec un anticorps dirigé contre p65 révèle une translocation nucléaire de la protéine. Par ailleurs, l'exposition de souris aux DEP augmente l'expression des protéines p65 et p50 dans les extraits nucléaires des poumons entiers (60). L'activation de la voie NF- $\kappa$ B par les DEP est ainsi largement démontrée dans les cellules épithéliales *in vitro* et l'origine cellulaire de cette activation *in vivo* reste mal identifiée. Il faut noter que peu ou pas d'étude montre une activation de la voie NF- $\kappa$ B par les DEP dans les M $\phi$  alvéolaires. Mondal *et al.* (2000) (61) ont comparé la réponse cellulaire des monocytes humains primaires et des M $\phi$  alvéolaires aux ROFA et ont mis en évidence une activation de NF- $\kappa$ B dans les monocytes mais pas dans les M $\phi$  alvéolaires. De plus amples études restent à effectuer pour trancher sur les capacités d'activation de NF- $\kappa$ B par les DEP dans les M $\phi$ . Le stress oxydant et la production d'EAO apparaît là encore comme le mécanisme à l'origine d'une telle activation dans les cellules épithéliales pulmonaires (58, 62). Il semblerait que les cellules épithéliales bronchiques soient plus sensibles que

les M $\phi$  aux EAO produites lors de l'exposition aux DEP. Cette susceptibilité de ces cellules s'expliquerait par leur incapacité à convertir un précurseur du GSH, la N-acétylcystéine (NAC) en GSH qui bloque l'activation des voies NF- $\kappa$ B et MAPK (53). Cela pourrait contribuer à expliquer la différence d'activation de la voie NF- $\kappa$ B par ces polluants pro-oxydants dans ces deux types cellulaires.

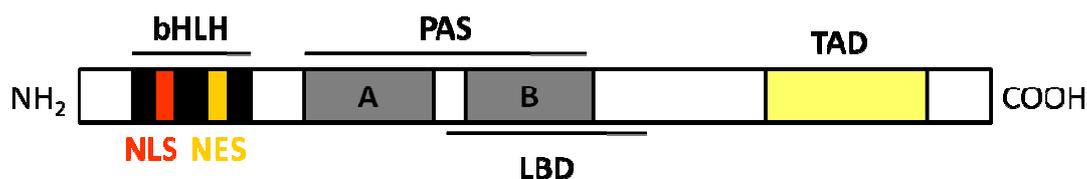
D'autres facteurs de transcription sont également activés par les DEP: Nrf2 par l'altération du statut redox de la cellule et AhR par la présence de composés chimiques ligands de ce récepteur cytosolique.

### ***1.1.3.3. La voie de signalisation AhR.***

#### ***1.1.3.3.1. Fonction biologique d'AhR***

Comme nous l'avons évoqué précédemment, la fraction organique des DEP contenant principalement des HAP est responsable d'une grande partie des effets toxiques associés à une telle exposition. Ces effets cellulaires des HAP sont communément liés à l'activation du récepteur aux hydrocarbures aromatiques (AhR pour Aryl hydrocarbon receptor). Il a été identifié pour la première fois par l'équipe de Poland en 1976 à partir d'étude sur des souris exposées à la TCDD (2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine) un hydrocarbure aromatique halogéné très affiné pour AhR (63).

Ce récepteur de type basic Helix-Loop-Helix /Per ARNT Sim (bHLH/PAS), possède un domaine basique de liaison à l'ADN fusionné à un domaine de dimérisation HLH en région N-terminal. Il est également composé de 2 domaines de dimérisation PAS mais aussi d'un domaine de liaison au ligand (LBD) ainsi que d'un domaine de transactivation TAD (**Figure 10**).



**Figure 10 : Représentation schématique de la structure d'AhR.**

AhR participe à la détoxification en régulant un ensemble de gènes impliqués dans le métabolisme de composés endogènes et de xénobiotiques. Il joue un rôle majeur dans le métabolisme et la bioactivation des HAP conduisant aux effets délétères de ces composés. Ses gènes cibles sont principalement les enzymes de la famille des CYP450 comme le CYP1A1, le CYP1A2 et CYP1B1 (64, 65). AhR contrôle aussi l'expression de transporteurs ATP-binding-cassette (ABC) comme ABCG2 (66) et des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, de la prolifération cellulaire, de l'inflammation et encore de l'apoptose (67, 68).

L'étude du phénotype des souris AhR<sup>-/-</sup> a permis de mettre en évidence un rôle physiologique de ce récepteur en plus de sa fonction toxicologique. Ces études font ainsi apparaître un rôle d'AhR dans le développement embryonnaire, du foie, du système immunitaire et du système vasculaire (69, 70). Mais AhR est également impliqué dans la prolifération et l'adhésion cellulaire ainsi que dans le développement neuronal (67, 71), il est aussi nécessaire à la fonction de reproduction (72) (**Tableau 2**).

CIBLE	PHÉNOTYPE OBSERVÉ
Foie	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Réduction de l'expression basale du CYP1A1 et de l'UDPGT6</li> <li>- Atrophie et fibrose</li> <li>- Augmentation du taux de TGFb1 et TGFb3</li> <li>- Adénocarcinome</li> <li>- Augmentation du taux d'acide rétinoïque</li> <li>- Hyperprolifération des vaisseaux près de la veine porte</li> </ul>
Système immunitaire	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Réduction du nombre de LBs et LTs dans la rate et les ganglions lymphatiques</li> <li>- Infections bactériennes opportunistes</li> </ul>
Peau	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hyperplasie sévère de l'épiderme avec hyperkératose</li> </ul>
Estomac	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hyperplasie du pylore</li> <li>- Polypes gastriques</li> </ul>
Cœur	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hypertrophie cardiaque</li> <li>- Fibrose du myocarde</li> </ul>
Poumon	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Adénocarcinome</li> </ul>
Utérus	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fibrose</li> <li>- Calcification</li> </ul>

**Tableau 2: Phénotypes observés chez les souris AhR<sup>-/-</sup>. D'après (70, 73–75).**

#### *1.1.3.3.2. Activation de la voie AhR (Figure 11)*

AhR est un récepteur qui se comporte comme un facteur de transcription dont l'activation dépend de sa liaison à un ligand. Il est considéré à l'heure actuelle comme un récepteur orphelin puisqu'aucun ligand physiologique endogène n'a été clairement identifié même si les dérivés du tryptophane comme le 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ), la kynurenine ou de l'acide arachidonique tels que la prostaglandines G2 ou encore les métabolites de l'hème tels que la bilirubine sont des candidats potentiels au vue de leur forte affinité (de l'ordre du nM) pour AhR (76). Cependant, de nombreux ligands synthétiques ou naturels sont connus. Les polluants de l'environnement sont des agonistes de synthèse d'AhR: ceci inclue les hydrocarbures aromatiques qu'ils soient polycycliques comme le B(a)P ou halogénés comme la TCDD et une autre classe de polluants, les polychlorobiphényles (PCB) (77). La TCDD compte parmi les agonistes les plus affins pour AhR. Il existe par ailleurs de nombreux agonistes naturels d'AhR comme par exemple les flavonoïdes, la curcumine, l'indirubine ou le resveratrol (76).

A l'état quiescent, c'est-à-dire en absence de ligand, AhR est séquestré dans le cytosol où il forme un complexe avec différentes protéines chaperonne (HSP90, XAP2 et p23). La liaison de ce complexe avec un agoniste entraîne son changement de conformation qui expose le domaine de localisation nucléaire NLS (nuclear localization signal) et provoque sa translocation nucléaire. AhR se dissocie alors de ses protéines chaperonnes pour se dimériser avec des partenaires nucléaires tels que

l'Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator (ARNT). L'hétérodimère ainsi formé se fixe sur des éléments de réponse de type Xenobiotic Response Element (XRE) et recrute des coactivateurs de la famille p160/SRC et CBP/p300. Ce recrutement modifie l'état de conformation de la chromatine afin d'initier la transcription des gènes cibles d'AhR (**Figure 11**). Les cibles géniques d'AhR possèdent au niveau de leur promoteur une séquence consensus XRE (5'-TNGCGTG-3'). Il existe toutefois des séquences dites « XRE-like » ayant de légères différences avec la séquence consensus mais sur lesquelles l'hétérodimère AhR/ARNT peut tout de même se fixer. Le promoteur de l'IL-6 porte ainsi de nombreux sites XRE-like (78).

La dégradation d'AhR est un mécanisme moléculaire qui se met ensuite en place afin de stopper son activité transcriptionnelle et participe au rétrocontrôle de la voie. En effet, dans de nombreux modèles cellulaires et *in vivo* chez la souris, l'expression protéique d'AhR est fortement diminuée après fixation de son ligand. Cette diminution ne dépend pas de la transcription des ARNm d'AhR mais de mécanismes protéolytiques par lesquels, après exportation dans le cytoplasme, AhR est ubiquitiné et dégradé par le protéasome 26S (79–81).

#### *1.1.3.3.3. Régulation de l'activité d'AhR*

Différents mécanismes moléculaires permettent de moduler l'activité de la voie AhR. Ainsi, l'activation d'AhR par des ligands comme la TCDD induit l'expression de la protéine AhR Repressor (AhRR) de la famille bHLH/PAS. Cette protéine réprime l'activité d'AhR soit par un mécanisme de compétition en interagissant avec son partenaire l'ARNT bloquant ainsi sa liaison à l'ADN (82), soit en interagissant directement avec AhR pour bloquer le recrutement des co-facteurs (83).

Il existe également des régulations non génomiques d'AhR impliquant un large éventail de kinases dont l'implication est gène- et tissu-spécifique. Ces régulations interviennent précocement et ne nécessitent pas de processus transcriptionnels. En effet, des études *in vitro* ont montré que l'utilisation de phosphatases inhibe la liaison d'AhR à l'ADN (84, 85) mettant ainsi en évidence l'importance de l'état de phosphorylation de ce récepteur pour son fonctionnement. Différentes études reportent une modulation de l'activité d'AhR en réponse à différents agonistes par des protéines kinase C (PKC), des protéines tyrosine kinase (PTK), des MAPK telles que ERK ou JNK ou encore des calcium calmoduline kinases (CaMK) (86–92).

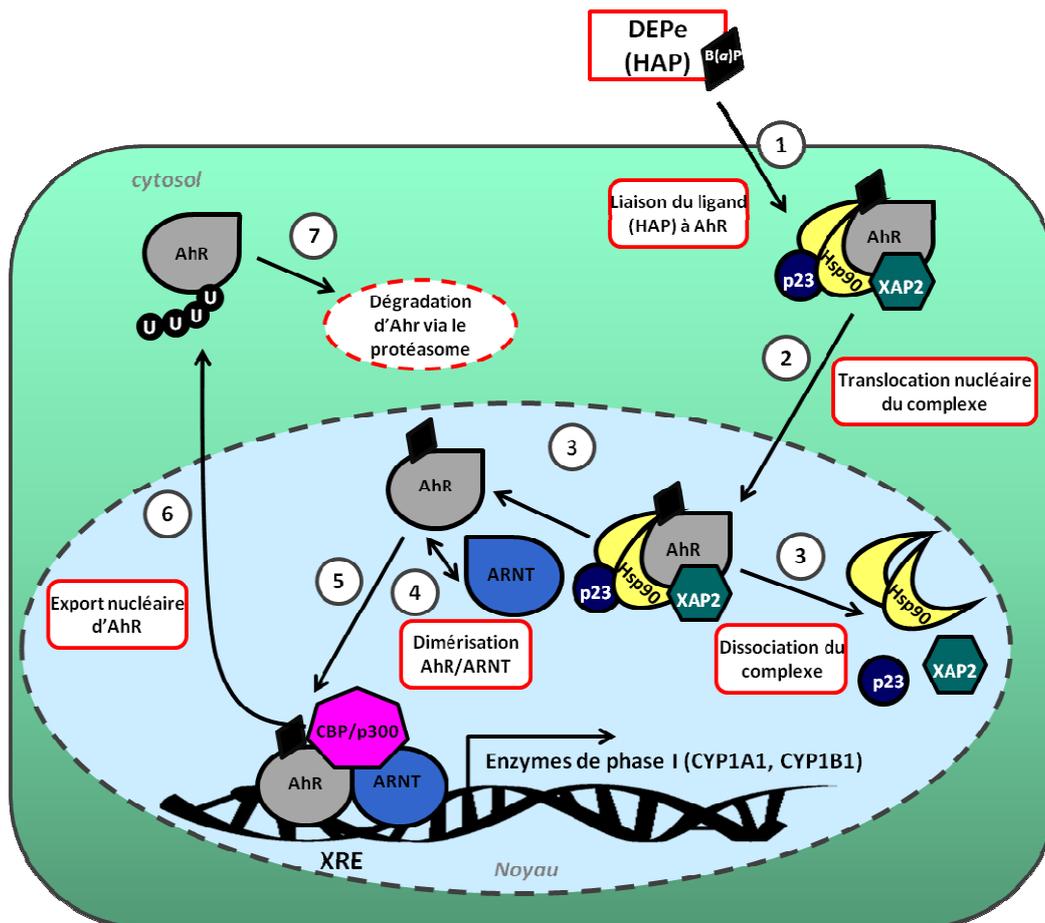


Figure 11: Mécanisme d'activation de la voie AhR par les DEPe. Adapté de (67, 68, 81).

#### 1.1.3.4. La voie de signalisation Nrf2

##### 1.1.3.4.1. Fonctions biologiques de Nrf2

Nuclear factor-erythroid 2 related factor 2 (Nrf2) est un facteur de transcription de la famille des cap'n'collar/basic region leucine zipper (CNC/Bzip) décrit pour la première fois par Moi *et al.*, en 1994 (93). Nrf2 agit comme un régulateur essentiel dans la réponse cellulaire au stress oxydant ou métabolique (94). Son expression est relativement abondante dans les tissus où des réactions de détoxification se déroulent constamment comme les poumons, les reins ou les intestins. Nrf2 exerce son rôle majeur dans la cytoprotection contre le stress oxydant exogène ou endogène par l'induction de l'expression d'un très large éventail de protéines impliquées dans la survie cellulaire répertoriées dans une revue par Brigelius et Flohé (2011) (95). Cela comprend des enzymes qui : (i) exercent directement ou indirectement une fonction anti-oxydante en inhibant les EAO générés comme HO-1, la SOD et la catalase, (ii) stimulent la synthèse et la régénération du GSH telles que GCLc, GCLm,

GPrx et GR, (iii) participent au métabolisme et à l'élimination des xénobiotiques électrophiles comme les enzymes de détoxification de phase II (NQO1 ou GST), (iv) reconnaissent, réparent et éliminent les dommages protéiques et nucléiques (système du protéasome et de réparation NER pour Nucleotide Excision Repair) et (v) d'autres protéines régulant l'expression de facteurs de transcription et de croissance, inhibant l'inflammation induite par des cytokines ainsi que l'autophagie.

L'essor de la génétique inverse et la génération de souris  $Nrf2^{-/-}$  a permis de mieux caractériser le rôle physiologique de Nrf2. Il a été montré que Nrf2 confère une protection contre les dommages précoces pendant l'inflammation. Les souris déficientes pour Nrf2 sont viables et au niveau basal, leur phénotype ne présente aucun signe d'altération du statut redox (96) cependant, elles présentent une diminution de la résistance à de nombreux facteurs de stress (97). Une étude chez des souris  $Nrf2^{-/-}$  stimulées au Dextran sulfate sodium (DSS) montre que ces souris mutées développent une inflammation intestinale plus sévère que les souris sauvages suggérant un rôle protecteur de Nrf2 dans l'inflammation et la cancérogénèse induite par l'inflammation (98). L'hépatotoxicité du paracétamol ainsi que la toxicité pulmonaire induite par le butyl-hydroxytoluène est également accrue chez les souris  $Nrf2^{-/-}$  (99, 100). La déficience en Nrf2 plus particulièrement au niveau de la lignée myéloïde induit la production d'EAO par les  $M\phi$  et exacerbe la réponse inflammatoire après stimulation au LPS. Ce phénomène accroît la susceptibilité à l'inflammation pulmonaire et la mortalité causée par un choc septique (101, 102). **L'ensemble de ces données mettent en évidence le rôle crucial de Nrf2 dans la cytoprotection vis-à-vis d'un stress oxydant causé notamment par des xénobiotiques.**

#### *1.1.3.4.2. Activation et régulation de la voie Nrf2 (Figure 12)*

En condition basale, Nrf2 est localisé dans le cytosol où il interagit avec sa protéine inhibitrice Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1). Cette protéine adaptatrice associe Nrf2 avec le complexe cullin-3 (Cul3) E3 ubiquitine ligase qui permet l'ubiquitination et la dégradation constante de Nrf2 par le protéasome 26S, maintenant ainsi un niveau cytosolique de Nrf2 très faible. Keap1 agit comme un senseur de stress oxydant ou électrophile grâce à la présence chez l'Homme de 27 résidus cystéine dont 9 sont très sensibles aux variations intracellulaires du statut redox. Ainsi, après un stress oxydant, nitrosant ou électrophile, les trois groupements thiols (SH) de Keap1 portés par les cystéines 151, 273 et 288 sont oxydés induisant un changement de conformation de la protéine. L'association du complexe Nrf2/Keap1/cul3 est alors atténuée et conduit à la stabilisation de Nrf2. Des modifications post-traductionnelles de Nrf2 peuvent également favoriser sa stabilisation. Nrf2 peut notamment subir des phosphorylations par des PKC résultant de l'inhibition de phosphatases par un stress électrophile (103). De plus, la dimérisation de Nrf2 avec DnaJ homolog 1 (DJ1) inhibe sa dégradation en bloquant

sa liaison avec Keap1. Nrf2 transloque et s'accumule alors dans le noyau où il interagit avec d'autres partenaires de la famille bZIP comme les petites protéines Maf (musculo-aponeurotic fibrosarcoma), ATF4 (activating transcription factor 4) ou JunD. L'hétérodimère ainsi formé se fixe sur des éléments de réponse ARE (Antioxydant Responsive Element) ou plus justement renommés EpRE pour Electrophile Responsive Element situés au niveau des promoteurs des gènes cibles. Le recrutement de coactivateurs tels que p300/CBP active la transcription de ces gènes. L'achèvement de cette signalisation intervient lorsque la tyrosine kinase Fyn activée par la kinase Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) s'accumule au niveau nucléaire et phosphoryle Nrf2 au niveau de la Tyrosine 568 ce qui conduit à son export nucléaire. Dans le cytosol, Nrf2 peut à nouveau s'associer à Keap1 et être dégradée.

En plus des nombreuses régulations post-traductionnelles, la voie de signalisation Nrf2 est également régulée au niveau transcriptionnel. Le promoteur du gène Nrf2 lui-même possède des EpRE, ce qui stimule sa transcription par des activateurs classiques de Nrf2 comme le tert-Butylhydroquinone (tBHQ) formant ainsi une boucle d'amplification suite à la présence d'un stress oxydant ou électrophile. La protéine Nrf2 synthétisée *de novo* transloque directement dans le noyau où elle induit également la transcription des gènes cibles (104). La présence d'éléments de réponse  $\kappa$ B dans le promoteur de Nrf2 favorise aussi son induction par des activateurs de la voie NF- $\kappa$ B comme le LPS (105).

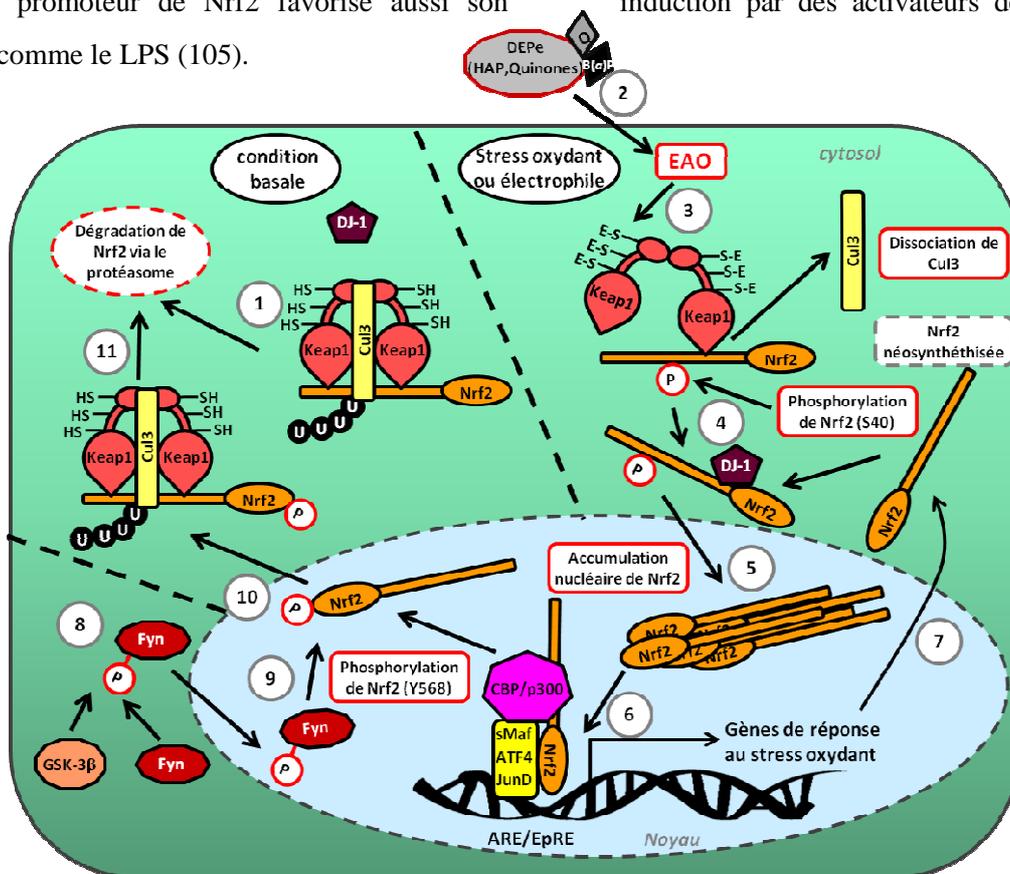


Figure 12: La voie de signalisation Nrf2 et mécanisme d'activation par les DEPe. D'après (95, 103, 106).

### ***1.1.3.5. Activation des voies AhR et Nrf2 par les DEP***

Les DEP contiennent de nombreux composés pro-oxydants et carcinogènes tels que les dérivés de quinone et les HAP. Il est communément admis que certains HAP lipophiles contenus dans ce mélange activent directement la voie AhR conduisant à l'induction de l'expression d'enzymes de métabolisation comme les CYP de la famille 1A1 et 1B1 (107, 108). De même, l'expression des gènes de réponse au stress régulés par Nrf2 tels que de HO-1, GST ou d'autres enzyme de phase II est induite dans les M $\phi$  alvéolaires et les cellules épithéliales exposés aux DEP (106), démontrant également une activation de la voie Nrf2. Les mécanismes d'activation de cette voie par les DEP sont moins bien caractérisés. D'une manière générale, les DEP agiraient *via* la génération d'un stress oxydant qui activerait la voie Nrf2. L'activation de Nrf2 par les HAP peut se faire indirectement, elle requiert au préalable l'implication de la voie AhR. En effet, la bioactivation des HAP par les CYP1A1 et CYP1B1 forme des métabolites oxydatifs comme les dérivés de quinone qui génèrent à leur tour des EAO capables d'activer la voie Nrf2 (109, 110). La présence de quinones et de métaux dans les extraits des émissions diesel peut également activer Nrf2 directement par la production d'EAO sans métabolisation préalable (40, 111). Il n'a pas été montré à ce jour d'action directe des DEP sur Nrf2 en absence d'un stress oxydant. Cependant, la perturbation de nombreuses voies de signalisation par ces composés pourrait altérer la régulation transcriptionnelle mais surtout post-traductionnelle de Nrf2 ainsi que de ses partenaires et participer à son activation.

Des études montrent également que l'exposition à des polluants inhalables comme les DEP ou la fumée de cigarette peut induire un stress du réticulum endoplasmique (RE) qui pourrait conduire à l'activation de Nrf2 (112–114). L'accumulation de protéines endommagées dans le RE suite à différents facteurs de stress (oxydant, privation en glucose, accumulations de protéines mutées) induit un stress du RE. Pour restaurer l'homéostasie du RE, les cellules possèdent un système de « contrôle qualité » très spécifique appelé Unfolded protein response (UPR) qui (i) atténue la traduction des protéines, (ii) facilite le repliement ou l'élimination des protéines endommagées, (iii) prévient leur agrégation ou (iv) induit la mort cellulaire dans le cas d'un stress du RE prolongé (115). Trois récepteurs situés sur la membrane du RE composant ce système sont alors activés : IRE1 (inositol-requiring protein-1), ATF6 (activating transcription factor 6) et PERK (protein kinase RNA-like ER kinase) (116). Une étude reporte que l'exposition de souris aux PM<sub>2.5</sub> conduit à l'activation de la kinase PERK et de CHOP, un facteur de transcription impliqué dans l'apoptose induite par le stress du RE *via* un mécanisme dépendant de la production d'EAO (114). Il a été démontré par ailleurs que la phosphorylation de Nrf2 par PERK conduisait à sa dissociation de Keap1 et favorisait sa stabilisation (112). Les DEP pourraient ainsi activer la voie Nrf2 par des mécanismes impliquant le stress du réticulum et l'activation de voies de signalisation du système UPR.

## *Conclusion*

**Les DEP et leurs extraits organiques constituent un mélange complexe capable d'induire un stress cellulaire aussi bien électrophile qu'oxydatif favorable à la perturbation de nombreuses voies de signalisation ainsi qu'à la modulation d'un grand nombre de gènes.**

**L'activation de Nrf2 par une telle exposition contrecarre les effets du stress induit et peut en même temps contribuer au développement d'une tolérance vis-à-vis de stimuli inflammatoires. Parallèlement, les HAP présents dans ces mélanges sont métabolisés *via* l'activation d'Ahr en composés hautement réactifs et potentiellement cytotoxiques. La combinaison de ces différents mécanismes de toxicité participe en partie à l'émergence et à l'exacerbation de pathologies chez les individus exposés.**

## I.2. Toxicité des particules de type diesel

---

### *Avant-propos*

Des épisodes de pollution de l'air extrêmes comme a connu Londres en hiver 1952 lors du « grand smog de Londres » ont permis d'établir clairement un lien entre impact sur la santé et pollution atmosphérique. Depuis cet évènement marquant en terme de mortalité et morbidité, les pouvoirs publics ont pris conscience de la nécessité de développer la recherche sur l'impact environnemental de la pollution atmosphérique, d'établir des réglementations sur la qualité de l'air ainsi que de sensibiliser la population à ces enjeux. La pollution de l'air et plus particulièrement celle associée aux émissions de particules diesel représente toujours un risque environnemental majeur pour la santé. Dans une étude publiée en 2010 dans the Lancet, Lim *et al.*, (117) en font l'un des 10 principaux facteurs de risque responsable des maladies au niveau mondial. Ainsi, l'OMS estimait en 2012 à 3.7 millions le nombre de décès imputable à la pollution de l'air dans le monde. La plupart des maladies qui lui sont associée sont d'origines respiratoires et cardiovasculaires compte tenu des voies d'entrée principales de cette pollution aérienne, mais cette pollution est aussi capable d'engendrer des cancers. De plus, les particules les plus fines ainsi que les éléments adsorbés sur celles-ci peuvent traverser l'épithélium pulmonaire pour rejoindre la circulation sanguine et favoriser le développement de pathologies systémiques.

Cette partie, consacrée à la toxicité des particules diesel, s'appuie sur des études à la fois épidémiologiques et expérimentales *in vivo* et *in vitro*. Elle est destinée à donner une vision globale de l'état actuel des connaissances quant aux risques toxicologiques pour la santé associés à l'exposition à ce type de polluants.

### *1.2.1. Cancérogénicité*

#### *1.2.1.1. Cancers associés à l'exposition chronique aux DEP*

En 1988, la première évaluation du Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) avait classé les gaz d'échappement des moteurs diesel comme cancérigène probable pour l'Homme (groupe 2A) et avéré pour l'animal. Cette évaluation établissait chez le rat une relation causale entre exposition à des concentrations élevées de particules diesel ( $\geq 2000 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) et augmentation des cancers pulmonaires (118, 119). Chez l'Homme, il existait à l'époque seulement des preuves limitées associant exposition aux particules diesel et effet cancérigène pulmonaire. En effet, les études épidémiologiques sur le sujet mettant en évidence un risque relatif modéré de cancer du poumon (inférieur à 1.5) présentaient de nombreux biais notamment des facteurs de confusion tels que le tabagisme ou l'exposition à l'amiante. De plus, il n'existait pas de quantification de l'exposition aux particules diesel permettant l'étude rigoureuse de la relation effet-dose.

Depuis 1988, près de 50 études épidémiologiques ont été publiées et en juin 2012, le CIRC a réévalué les gaz d'échappement des moteurs diesel et les a surclassés comme cancérigène pour l'Homme (groupe 1). Le CIRC a estimé, avec des indications suffisantes, que l'exposition chronique aux échappements des moteurs diesel provoquait une augmentation de l'incidence des cancers pulmonaires. Il a également observé, avec des preuves plus limitées, une corrélation positive avec un risque accru de cancer de la vessie. Cette décision repose essentiellement sur les résultats de différentes études épidémiologiques de travailleurs exposés dans différents milieux professionnels (mineurs de fond, ouvriers du transport ferroviaire et routier), qui démontrent de façon concordante une augmentation du risque de décès par cancer du poumon chez ces travailleurs exposés chroniquement (19, 20, 120, 121).

**Ces différentes études retrouvent un excès de risque modéré (globalement inférieur à 1.5) de cancer du poumon mais néanmoins significatif chez les sujets exposés de façon chronique aux particules diesel. De plus ces études ont permis d'établir une relation dose-réponse entre le risque de cancer du poumon et la durée de l'exposition (122, 123).**

#### *1.2.1.2. Mécanismes de cancérogénèse*

Plusieurs mécanismes cellulaires et moléculaires peuvent expliquer les effets cancérigènes des DEP. Elles pourraient favoriser l'initiation et la transformation tumorale par des processus impliquant (i) des effets mutagènes favorisant une altération du génome indispensable à la promotion tumorale,

(ii) des effets génotoxiques directes causés par les HAP adsorbés sur la particule et (iii) des effets génotoxiques indirectes résultant d'un stress oxydant.

Les effets génotoxiques directes des particules diesel peuvent être globalement imputés à la présence des nombreux HAP adsorbés à la surface des particules qui sont libérés au niveau pulmonaire et dont le pouvoir pro-cancérogène *in vitro* et *in vivo* est bien établi (124, 125). En effet, leur métabolisation par des enzymes de phase I telles que le CYP1A1 et CYP1B1 va conduire à la bioactivation de ces HAP en composés génotoxiques extrêmement réactifs. Ces métabolites électrophiles vont alors pouvoir réagir avec les centres nucléophiles de macromolécules (ADN, protéines, lipides). Ces liaisons covalentes forment ainsi des adduits le plus souvent sur la déoxyGuanosine (dG) ou sur la déoxyAdénosine (dA) constituant l'ADN. L'exemple le plus classique est celui du B(a)P qui, une fois métabolisé par le CYP1A1 en diol époxyde (le B(a)P 7,8-dihydrodiol-9,10 époxyde ou BPDE) va pouvoir réagir avec les bases de l'ADN et former des adduits au niveau nucléaire dont le plus connu est le BPDE-N<sup>2</sup>-déoxyGuanosine (BPDE-N<sub>2</sub>-dG) (126) (Figure 13).

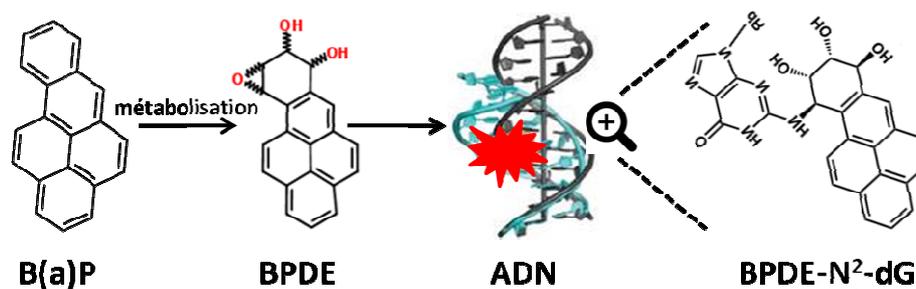


Figure 13: Formation d'adduits à l'ADN: exemple du B(a)P.

La présence d'adduits peut entraîner des liaisons entre 2 brins d'ADN bloquant ainsi la réplication et la transcription. Des systèmes de réparation comme le NER (Nucleotide Excision Repair) ou la O<sup>6</sup>-méthylguanine DNA méthyltransférase sont généralement chargés d'éliminer ces adduits. Toutefois, des mutations à l'origine de cancer peuvent survenir à cette étape si la réplication est engagée avant la réparation. Lors de la rencontre de l'ADN polymérase avec un adduit, 2 cas de figure peuvent se produire :

- ✓ Soit l'ADN polymérase est bloquée par l'adduit et interrompt la réplication de l'ADN entraînant alors la mort cellulaire ou une aberration chromosomique.
- ✓ Soit des ADN polymérases peu fidèles parviennent à franchir ces adduits et poursuivent la synthèse d'ADN mais avec un grand risque de mutations telles que des tranversion G : C → T : A ou des mutations « frameshift », qui sont des modifications du cadre de lecture lors de la transcription résultant de la formation d'adduits

volumineux (127).

Si ces mutations interviennent au niveau de gènes contrôlant la prolifération cellulaire, la réparation de l'ADN ou encore l'apoptose, elles peuvent conduire à l'initiation et à la progression tumorale. Il a ainsi été montré que l'apparition de transversions G : C → T : A sur le gène suppresseur de tumeur p53, caractéristique de mutations présentes dans le cancer du poumon était associées à une exposition aux HAP (128).

L'activation des CYP par les HAP peut également entraîner la génération d'EAO, ces molécules favoriseraient la progression tumorale en amplifiant l'instabilité génique.

Plusieurs études ont mis en évidence des niveaux élevés d'adduits ou de dommages oxydatifs à l'ADN tels que la présence de 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) ou encore de mutations dans le tissu pulmonaire de rats ou de souris exposés chroniquement aux DEP (129–132).

D'autres études ont démontré que les propriétés génotoxiques indirectes des DEP sont principalement clastogènes. Ces particules induisent des échanges de chromatides sœurs et des aberrations chromosomiques à la fois *in vitro* dans les lymphocytes humains notamment (133) et *in vivo* chez des travailleurs exposés aux émissions diesel (134). Ces effets génotoxiques indirectes des DEP résultent essentiellement d'une formation excessive d'EAO. Les différents mécanismes à l'origine de cette production incontrôlée incluent d'une part, une surcharge de particules déposées au niveau pulmonaire conduisant à l'inflammation et à la prolifération des cellules épithéliales alvéolaires (135, 136). D'autre part, les cellules inflammatoires activées (Mφ et neutrophiles) peuvent produire des EAO capables d'induire des dommages oxydatifs à l'ADN dans les cellules épithéliales pulmonaires (137, 138) ce qui entraîne également un état inflammatoire propice à l'initiation et à la croissance tumorale. La saturation des systèmes de défense antioxydants peut également favoriser la production d'EAO résultant en la formation de 8-oxodG pouvant conduire à des transversions G : C → T : A (129, 130).

### ***1.2.2. Pathologies respiratoires non tumorales associées à une exposition aux DEP***

La voie principale de pénétration des DEP dans l'organisme est l'inhalation. Ainsi, en plus des effets carcinogènes, l'exposition aux DEP qu'elle soit chronique ou aiguë favorise un ensemble de pathologies essentiellement respiratoires et cardiovasculaires.

De nombreuses études épidémiologiques portant sur des effets aigus, à court terme (quelques heures à quelques jours) ont reporté un lien entre exposition à des fortes concentrations de PM<sub>10</sub> et

augmentation de la morbidité et de la mortalité pour causes cardiorespiratoires (139, 140). Néanmoins, des effets similaires ont également été observés pour des expositions chroniques à de plus faibles concentrations. Schwartz et Zanobetti en 2000 (141) ont ainsi montré qu'une élévation moyenne de la concentration en PM<sub>10</sub> de 10 µg/m<sup>3</sup> augmentait la mortalité d'origine pulmonaire de 3.4%.

L'exposition à la pollution atmosphérique et particulièrement aux particules diesel constitue donc un facteur de risque pour le développement et l'exacerbation des maladies allergiques telles que l'asthme, les rhinites allergiques et les dermatites atopiques (142). L'asthme, dont la prévalence est plus importante dans les zones industrialisées (143) est associée en partie à l'exposition aux particules diesel (35). Particulièrement lors des épisodes de forte pollution, on constate une augmentation de l'hospitalisation d'urgence des sujets asthmatiques présentant une symptomatologie respiratoire telle qu'une constriction et une hyperréactivité des bronches. Par ailleurs, des études expérimentales chez l'animal ont démontré que les DEP exacerbèrent l'asthme (144, 145).

Les mécanismes moléculaires par lesquels les DEP favorisent ces pathologies semblent dépendre suivant les études concernées à la fois de la fraction organique adsorbée sur la particule (146) et du corps carboné (147). Indépendamment de cette distinction, les DEP peuvent favoriser l'asthme par plusieurs mécanismes : elles peuvent jouer le rôle (i) d'un transporteur pour les particules allergique, (ii) d'un adjuvant pour la production IgE lors de la phase précoce de la réponse inflammatoire, ou encore (iii) amplifier la réaction inflammatoire tardive pulmonaire impliquant des médiateurs inflammatoires tels que des cellules de l'immunité (éosinophiles, lymphocytes T, cellules présentatrices de l'antigène), des cytokines, des chimiokines et des immunoglobulines (148). Les effets immunotoxiques des DEP et particulièrement leurs effets immunosuppresseurs et pro-inflammatoires font l'objet d'un chapitre spécifique détaillé paragraphe I.2.5.

La broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) est une terminologie regroupant des pathologies pulmonaires qui se caractérisent par une réduction du diamètre des voies aériennes conduisant à des symptômes d'essoufflement. Plus de 200 millions de personnes souffrent de cette maladie dans le monde, et près de 3 millions de décès lui sont imputables chaque année. Elle était en 2008, la 4<sup>ème</sup> cause de mortalité dans le monde (149). Bien que le tabagisme en soit la principale cause, quelques études épidémiologiques suggèrent un lien entre les expositions professionnelles, notamment aux DEP et augmentation du risque de BPCO (150–152). Ces études montrent de manière intéressante, que cette association est plus forte chez les sujets non-fumeurs.

Par ailleurs, la BPCO a pour conséquence d'augmenter la susceptibilité à la pollution de l'air. Les patients atteints de BPCO présentent un taux accru de dépôt de particules dans les poumons en comparaison des sujets sains, principalement dû à une fréquence respiratoire et une ventilation augmentée chez ces patients (12). Cette plus forte propension au dépôt de particules dans les poumons

de patients atteints de BPCO renforcerait les effets nocifs d'une exposition à ces polluants particuliers.

### *1.2.3. Pathologies cardiovasculaires associées à une exposition aux DEP*

De nombreuses études épidémiologiques reportent que la pollution de l'air n'affecte pas seulement les voies respiratoires mais peut également avoir des effets délétères au niveau cardiovasculaire (139, 140, 153). Les atteintes cardiaques observées lors d'une exposition aiguë à la pollution atmosphérique et notamment aux DEP comprennent des cardiopathies ischémiques en particulier des infarctus du myocarde ainsi que des arythmies cardiaques (154–156). Une grande étude portant sur plus de 300000 infarctus du myocarde dans 21 villes des Etats-Unis, montre qu'une augmentation de la concentration de PM<sub>10</sub> de 20 µg/m<sup>3</sup> est associée à un accroissement du risque d'infarctus du myocarde de 1.3% (157, 158). Au niveau vasculaire, l'exposition à la pollution atmosphérique peut aussi être à l'origine d'une vasoconstriction artérielle, d'augmentation de la pression artérielle, d'un dysfonctionnement de l'endothélium ainsi que d'une augmentation des taux circulants du peptide vasoactif, l'endothéline chez le rat (159, 160).

L'athérosclérose est une pathologie inflammatoire chronique des vaisseaux sanguins impliquant le système vasculaire, métabolique et immunitaire dont le développement est multifactoriel et progressif. Elle se caractérise par une accumulation de lipides et de matériel fibreux dans l'intima des artères élastiques et musculaires de gros et moyen calibre, on parle alors d'athérome. Au court du temps, ces plaques peuvent entraîner la lésion des parois artérielles (sclérose) et conduire à l'obstruction de ces vaisseaux. A terme, la déstabilisation et la rupture de ces plaques sont associées aux complications cliniques de la maladie, telles que les infarctus du myocarde, les accidents vasculaires cérébraux ou encore les artériopathies oblitérantes des membres inférieurs. L'exposition chronique de population résidant près de grands axes routiers à de fortes concentration de pollution de l'air (PM<sub>2.5</sub>) augmente également l'incidence de l'athérosclérose (161–164). Ainsi en 2010, Kunzli *et al.*, (163) notent que l'exposition à des PM<sub>2.5</sub> augmente de 4% l'épaisseur intima-media dans la carotide, ce marqueur clinique chez l'Homme indique la sévérité de l'athérosclérose. Par ailleurs, des études expérimentales, sur des modèles murins déficients en apolipoprotéine E (ApoE) avec une alimentation riche en lipides développant spontanément de l'athérosclérose, montrent que l'inhalation de particules diesel accélère le développement des lésions athérosclérotiques chroniques et favorise la déstabilisation des plaques avancées (165–168).

Les hypothèses avancées concernant les mécanismes impliqués dans ces effets des particules diesel sur le système cardiovasculaire sont de 3 ordres. Des données suggèrent d'une part un mécanisme direct et local, en effet, les particules les plus fines elles-mêmes ainsi que les composés adsorbés sur les particules, comme les métaux et les substances organiques pourraient transloquer

directement dans le système circulatoire et agiraient sur les premiers organes cibles rencontrés tels que le cœur, le foie ou encore le cerveau (169, 170). D'autre part, des études montrent une action systémique des particules inhalées. Leur dépôt au niveau pulmonaire provoque des réactions inflammatoires et un stress oxydant. Les médiateurs pro-inflammatoires ainsi libérés dans la circulation systémique contribuent à l'exacerbation des maladies pulmonaires chez les sujets sensibles. Ils provoquent également l'activation des plaquettes et un dysfonctionnement endothélial conduisant à augmenter la coagulation sanguine ce qui peut également expliquer les atteintes du système cardiovasculaire (171–173). Enfin, les particules peuvent aussi agir sur le système nerveux autonome : des études reportent une augmentation rapide de la fréquence cardiaque ainsi qu'une diminution de la variabilité de cette fréquence cardiaque lors d'exposition à pollution particulaire suggérant une atteinte de la fonction autonome cardiaque (155). Ces symptômes pourraient être associés à une diminution de la stimulation parasympathique, à des altérations de la repolarisation myocardique ou une dépression du segment ST et expliquer ainsi l'augmentation des arythmies et des accidents cardiovasculaires (140, 154). Il est par conséquent difficile de discriminer ces 3 processus et de déterminer la contribution de chaque voie dans le développement et l'exacerbation de ces pathologies.

## **Conclusion**

**Ainsi, les résultats de ces différentes études montrent un rôle prépondérant du stress oxydant dans les effets toxiques des DEP (Figure 14). Cependant, les phénomènes inflammatoires engendrés suggèrent également qu'un effet immunotoxique directe des DEP puisse contribuer au développement de ces pathologies.**

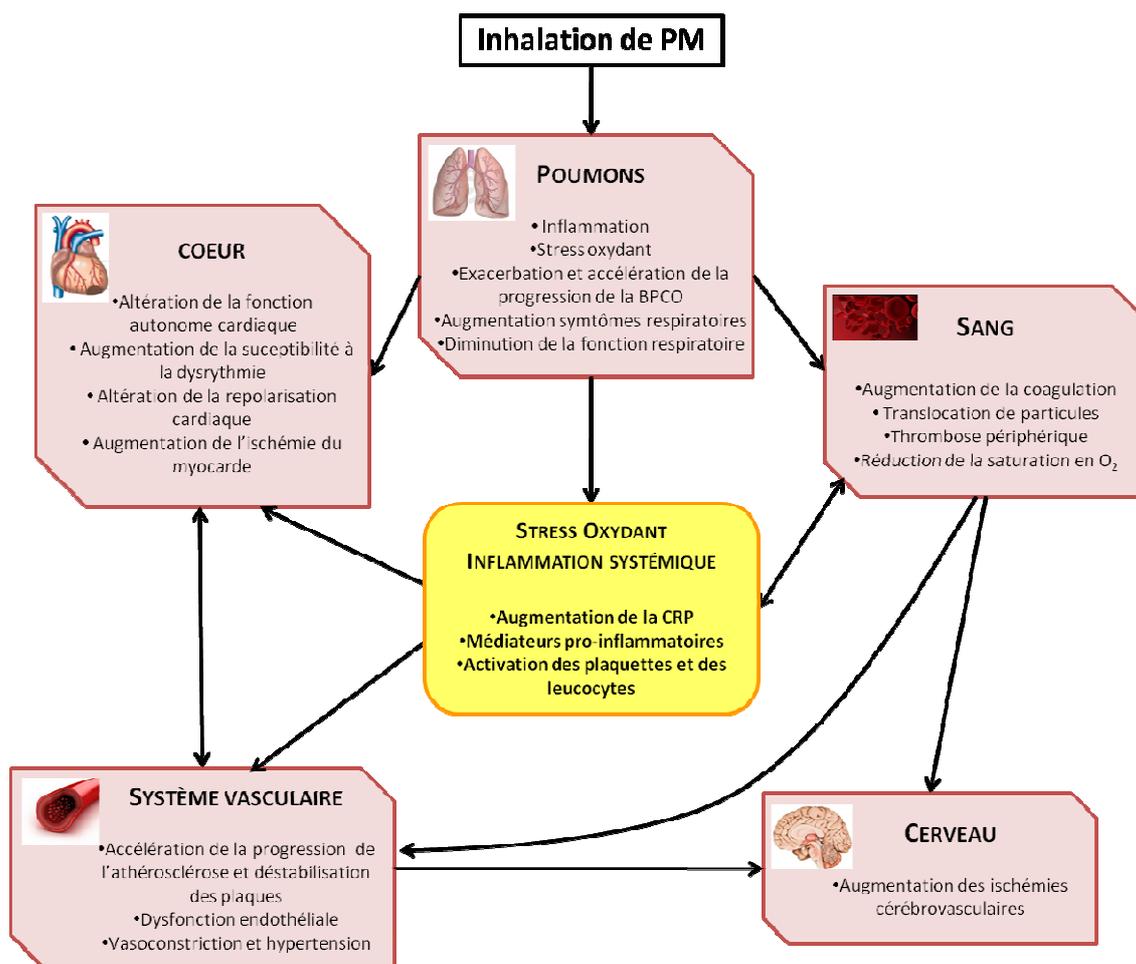


Figure 14: Mécanismes physiopathologiques généraux reliant l'exposition aux PM à la morbidité et la mortalité cardiopulmonaire. D'après (140)

### I.3. Les monocytes et les macrophages (M $\phi$ )

#### *Avant-propos*

La toxicité des DEP vis-à-vis du système immunitaire pourrait contribuer à ces effets néfastes sur la santé humaine. Les effets des particules diesel sur la balance pro-inflammatoire/anti-inflammatoire de la réponse immunitaire restent encore à caractériser, notamment en prenant comme objet d'étude le M $\phi$ . Ces effets dépendent ainsi de plusieurs facteurs incluant la composition des particules (endotoxines, HAP, métaux), la nature de l'exposition (aigüe, chronique), l'interaction des M $\phi$  avec d'autres types cellulaires mais surtout du phénotype et de l'état d'activation des M $\phi$  exposés. En effet, les M $\phi$  sont des cellules plastiques qui possèdent un large spectre d'état d'activation possible qui vont conditionner leur réponse à un agent donné.

Dans cette partie, après une brève présentation du système immunitaire, nous nous focaliserons sur les macrophages en abordant successivement

- L'ontogénie et l'hétérogénéité du système des phagocytes mononucléés en détaillant le rôle des facteurs de croissance dans la différenciation des monocytes en M $\phi$ .
- les propriétés fonctionnelles caractéristiques des cellules du système des phagocytes mononucléés.
- le concept de polarisation des M $\phi$  et ses limites.
- les rôles physiopathologiques des M $\phi$ .

En dernier lieu, nous détaillerons la toxicité des DEP sur la physiologie des cellules du système immunitaire

### *1.3.1. Présentation du système immunitaire*

Le système immunitaire permet de préserver l'intégrité de notre organisme en luttant contre les agressions qu'elles soient extérieures telles que des agents pathogènes (virus, bactéries ou parasites) ou des composés toxiques (particules) ou internes en limitant et en éliminant la prolifération de cellules cancéreuses. Ce système complexe repose sur la coordination très fine de nombreux acteurs à différents niveaux structurels (organes, tissus, cellules et molécules). Le système immunitaire doit en premier lieu discriminer le soi du non-soi afin (i) de reconnaître des agressions auxquelles l'organisme est confronté puis (ii) de lutter contre celles-ci en établissant rapidement des mécanismes de défense contre les antigènes du non-soi et assurer ainsi un bon fonctionnement. **La réponse immunitaire fait intervenir deux types de mécanisme, la réponse immunitaire innée, non-spécifique et immédiate et la réponse immunitaire adaptative dont la mise en place est retardée mais dirigée spécifiquement contre l'antigène à neutraliser.**

La réponse innée constitue la première ligne de défense de l'organisme. Lorsqu'un agent pathogène pénètre dans l'organisme en passant les premières barrières protectrices (peau, mucus et épithélium pulmonaire) il est confronté à un grand nombre d'acteurs cellulaires comme les phagocytes ( $M\phi$  et neutrophiles), les granulocytes (mastocytes, éosinophiles, basophiles) et les cellules NK (Natural Killers). Ces agents étrangers sont en temps normal éliminés par les phagocytes résidents et les phénomènes de clairance tissulaire. Cependant, présents en trop grande quantité, ils provoquent des lésions tissulaires locales et différents processus s'établissent pour permettre leur élimination.

La réaction inflammatoire notamment est un processus important comprenant un ensemble de mécanismes de défense complexe qui se met en place face à une agression exogène (agent infectieux, substance inerte, agent physico-chimique) ou face à un agent endogène (cellules endommagées). L'inflammation a pour but de détruire ces éléments étrangers *via* la mobilisation notamment des phagocytes circulants (neutrophiles, monocytes et  $M\phi$ ). Lorsque cet agent atteint les tissus conjonctifs, il y a alors sécrétion de médiateurs chimiques vasoactifs tels que l'histamine ou la sérotonine par les mastocytes et les basophiles présents, entraînant alors une augmentation du débit sanguin. Par la suite, un œdème dû à l'augmentation de la perméabilité vasculaire se forme ce qui permet le passage du plasma au niveau du foyer inflammatoire et favorise sa dilution. La vasodilatation brutale de la microcirculation locale combinée à la sécrétion de médiateurs chimiques (cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1, l'IL-6, le  $TNF\alpha$ ) et à l'expression de molécules d'adhésion (selectine, ICAM, VCAM) permettent le recrutement des phagocytes circulants qui vont traverser les parois vasculaires par diapédèse. Les neutrophiles, premières cellules à atteindre le site inflammatoire et les  $M\phi$  présents plus tardivement vont phagocyter et éliminer les pathogènes. Les peptides issus de

la dégradation du pathogène sont présentés à la surface des cellules présentatrices d'antigène (CPA) comme les M $\phi$  mais surtout les cellules dendritiques (DC).

Ces complexes sont reconnus par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (ou LT « helper » Th) qui jouent un rôle essentiel dans l'orchestration de la réponse immunitaire adaptative. Il existe deux types de réponse adaptative :

- ✓ **La réponse à médiation cellulaire** : cette réponse est dédiée à l'élimination des cellules du soi infectées ou tumorales. La présentation antigénique directe par les CPA ou la sécrétion indirecte de cytokines activatrices telles que l'IFN $\gamma$  permet l'activation des LT CD4<sup>+</sup> au sein de structures ganglionnaires. Cette activation de type Th1 des LT CD4<sup>+</sup> stimule *in fine* l'activité cytotoxique des LT CD8<sup>+</sup> puis la lyse des cellules infectées ou tumorales exprimant l'antigène spécifique.
- ✓ **La réponse à médiation humorale** : cette réponse a pour but de neutraliser les parasites, les bactéries et certaines molécules telles que les allergènes ou autres toxines. Elle est associée à une activation de type Th2 des LT CD4<sup>+</sup> caractérisée essentiellement par la production d'interleukine-4 (IL-4). Elle repose sur la production d'anticorps par les lymphocytes B (LB) en réponse à la présentation directe ou non de l'antigène. L'interaction LB-LT va permettre la prolifération et la différenciation des LB en plasmocytes spécialisés dans la sécrétion d'immunoglobulines (Ig) et plus particulièrement d'IgE.

Il existe d'autres sous-populations de LT CD4<sup>+</sup> effecteurs comme par exemple, les lymphocytes T régulateurs (LTreg) caractérisés par une production de TGF $\beta$ , qui sont responsables de la régulation des réponses immunitaires ou encore les lymphocytes Th17. L'inflammation causée par un recrutement des neutrophiles et la sécrétion d'IL-17 sont des caractéristiques de la réponse Th17. Elle est impliquée dans la lutte contre les infections extracellulaires bactériennes et fongiques mais elle peut également être responsable du développement de maladies auto-immunes et inflammatoires chroniques.

### *1.3.2. Définition et caractérisation du système monocyte/M $\phi$*

#### *1.3.2.1. Origines des monocytes et des M $\phi$*

À l'origine, les M $\phi$  ont été décrits par Elie Metchnikoff comme cellules effectrices majeures de la réponse immunitaire lorsqu'il caractérisa une fonction fondamentale de ces cellules, la phagocytose (237). Ces cellules sont conservées dans la plupart des espèces allant des invertébrés aux vertébrés (238, 239). Longtemps, les M $\phi$  ont été considérés comme «des éboueurs de l'organisme» : cette notion a cependant beaucoup évolué depuis les dernières décennies pour étendre leur champ de compétence. Ainsi, les M $\phi$  constituent une population essentielle dans la réponse inflammatoire et la réponse innée aux pathogènes, mais également dans le maintien et la restauration de l'homéostasie tissulaire. Ils sont également impliqués dans la genèse de pathologies inflammatoires chroniques. Les M $\phi$  et les monocytes font partie du système phagocyte mononucléé qui regroupe également les cellules dendritiques (DC) et les précurseurs de la lignée myéloïde dont ils sont issus. Les monocytes sont des cellules circulantes dans le sang et constituent le réservoir périphérique des précurseurs myéloïdes chargés du renouvellement des M $\phi$  résidents au sein des tissus et des DC d'origine myéloïde. Ils représentent 5 à 10% des leucocytes circulants chez l'homme et 4% chez la souris. L'origine ontogénique des monocytes se situe dans la moelle osseuse. Ils sont issus de cellules souches hématopoïétiques pluripotentes qui se différencient sous l'effet de différents facteurs de croissance en précurseurs myéloïdes communs aux lignées granulocytaires et monocytaires ou en précurseurs lymphoïdes (**Figure 15**). Le développement des monocytes est ensuite sous la dépendance d'un facteur de croissance, le Macrophage-Colony Stimulating Factor (M-CSF). Les souris déficientes pour le récepteur au M-CSF (appelé M-CSFR ou CSF-1R) ou pour ses ligands présentent un nombre de monocytes circulant très faible (240–242). Les précurseurs myéloïdes vont passer par le stade de différenciation monoblaste puis pro-monocyte avant d'atteindre celui de monocyte mature à partir duquel, ils pourront quitter la moelle osseuse et rejoindre la circulation sanguine (**Figure 15**).

La sortie de la moelle osseuse s'effectue sous l'effet de facteurs de croissance et de chimiokines. Les souris déficientes pour les récepteurs aux chimiokines CCR2, CCR5 ou CX3CR1 ont un nombre de monocytes circulants diminué par rapport aux souris sauvages (243, 244). Les monocytes circulent dans le sang 1 à 3 jours avant de migrer dans les différents tissus de l'organisme et d'achever leur différenciation en M $\phi$  résidents. Ce processus bien établi fut décrit dès 1939 par Ebert et Florey (245).

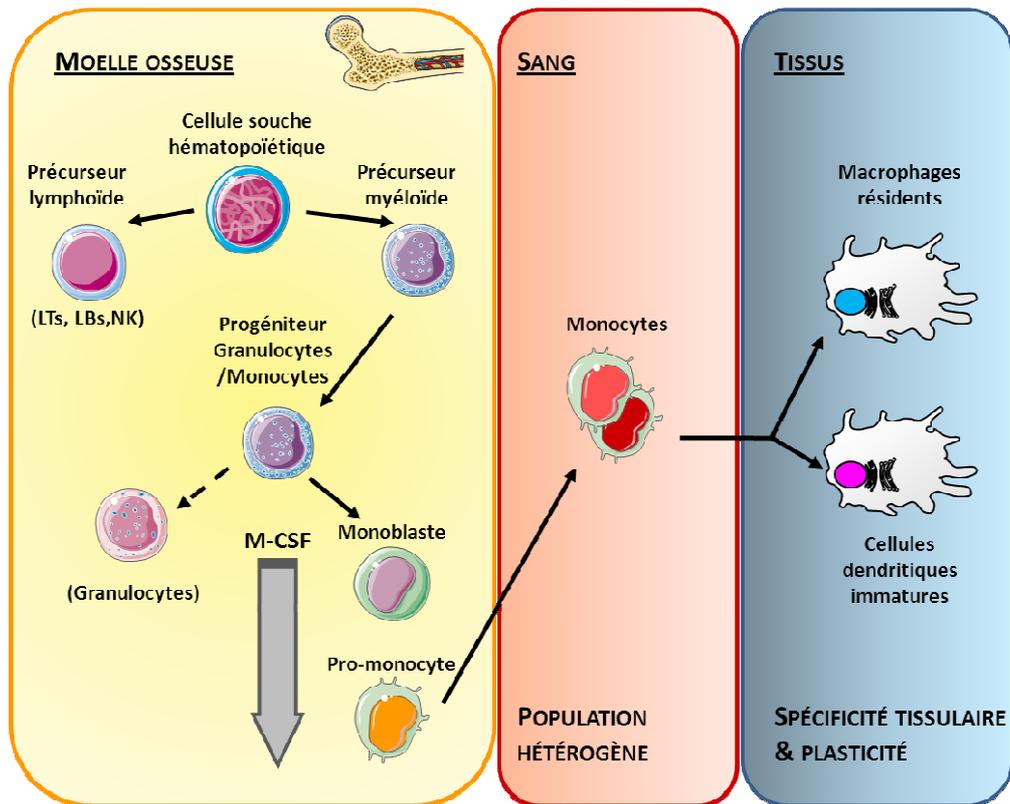
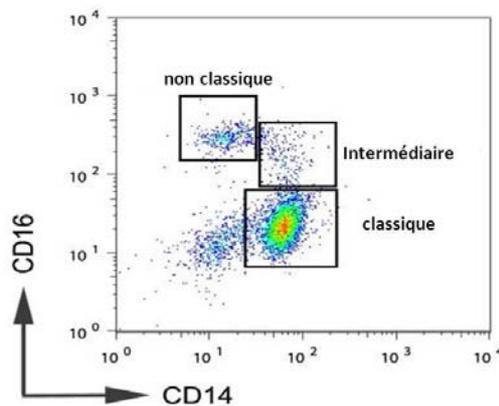


Figure 15: Origine et différenciation des monocytes et des macrophages (M $\phi$ ). D'après (246)

### 1.3.2.2. Hétérogénéité des monocytes

Les monocytes ont d'abord été considérés comme une population cellulaire homogène caractérisée au niveau morphologique par un aspect irrégulier avec un noyau ovale ou en forme de « rein », de nombreuses vésicules cytoplasmiques et un ratio cytoplasme/noyau élevé. Depuis, les travaux de différentes équipes basés sur la purification des cellules sur gradient de densité ont montré une forte hétérogénéité de cette population en termes de taille, de forme et de structure. Ils ont ainsi pu mettre en évidence une population majoritaire de monocytes d'aspect régulier et de grande taille présentant une forte activité de phagocytose ainsi qu'une production élevée d'anion superoxyde. Ils ont aussi distingué une autre population moins importante de monocytes de plus petite taille avec une faible activité peroxydase mais possédant une plus grande capacité de libération d'IL-1 (247–250). La faible sensibilité de ces techniques de purification a limité les études plus approfondies. Il a fallu attendre l'essor des techniques moléculaires utilisant les anticorps monoclonaux dirigés contre les antigènes à la surface des cellules pour permettre de caractériser ces deux populations de monocytes sur la base de leur expression différentielle de marqueurs de surface. Chez l'Homme, trois populations de monocytes ont été définies par l'expression différentielle du CD14 (un corécepteur du LPS) et du CD16 (Fc $\gamma$ RIII).

La première sous-population de monocytes est dite « classique » car son phénotype correspond à la description des monocytes initialement établie (**Figure 16**). Elle correspond à la population majoritaire de «grands» monocytes et se caractérise par une forte expression du CD14 combinée à une faible expression du CD16 ( $CD14^{\text{haut}}/CD16^{\text{bas}}$ ). Elle représente 80 à 90% des monocytes circulants et possède une forte expression du récepteur aux chimiokines CCR2 et une expression faible de CX3CR1 (récepteur à la fractalkine) (251, 252). Ces monocytes classiques ont une capacité de phagocytose importante et *in vitro*, ils sécrètent préférentiellement de l'IL-10 plutôt que du TNF $\alpha$  ou de l'IL-1 (253).



**Figure 16: Représentation biparamétrique des trois populations de monocytes humains par cytométrie de flux d'après (254).** Les monocytes humains dérivant du sang de donneurs sains ont été doublement marqués à l'aide d'anticorps anti-CD14 et anti-CD16 afin de détecter les différentes populations de monocytes humains.

Les travaux du groupe de Ziegler-Heitbrock (1992) (253) ont permis de caractériser la deuxième sous-population minoritaire de « petits » monocytes par l'expression du CD16. Ces monocytes ont une capacité de production de cytokines pro-inflammatoires plus importante que les autres monocytes après stimulation au LPS et sont donc considérés comme des monocytes « inflammatoires » (255). Ils sont retrouvés en plus forte proportion dans le sang de patients atteints d'inflammation aigüe (256) ou de maladies infectieuses (257). À l'inverse des monocytes classiques ( $CD14^+/CD16^-$ ), ces monocytes inflammatoires expriment fortement le récepteur CX3CR1 et faiblement CCR2 (251). Des études montrent que cette sous-population de monocytes exprimant le CD16 peut être subdivisée en deux populations distinctes possédant des fonctions propres (258). La première dite « intermédiaire » regroupe les monocytes exprimant à la fois le CD14 et le CD16 ( $CD14^+/CD16^+$ ) (**Figure 16**). Cette population exprime également des récepteurs aux fragments constants (FcR) tels que le CD64 et le CD32. Ces monocytes possèdent une activité de phagocytose et sont responsables de la sécrétion de TNF $\alpha$  et d'IL-1 en réponse au LPS. À l'inverse, une deuxième population « non classique » de monocytes caractérisée par une expression du CD16 mais de très faibles niveaux de CD14 ( $CD14^{\text{bas}}/CD16^{\text{haut}}$ ) (**Figure 16**) n'expriment pas les récepteurs Fc, ont une faible activité de phagocytose et ne sécrètent pas de TNF $\alpha$  et d'IL-1 après stimulation au LPS. A

l'heure actuelle la fonction de ces monocytes n'est pas élucidée, ils peuvent cependant être retrouvés en proportion plus importante dans le sang de patients atteints de choc septique (259).

Les cellules du système phagocytes mononuclées de souris sont caractérisées par l'expression du marqueur F4/80 qui appartient à la famille des EGF-TM7. La majorité des M $\phi$  résidents au sein des tissus expriment ce marqueur phénotypique (260). Les monocytes murins l'expriment également, mais dans une moindre mesure et sont caractérisés plus précisément par l'expression de F4/80, CD11b et CSF-1R. Il existe aussi une hétérogénéité de la population de monocytes chez la souris. Comme chez l'homme, on peut distinguer deux sous-populations de monocytes basées sur l'expression différentielle du CCR2, de CX3CR1, CD62L (L-selectin) et de Ly6c, un épitope du Granulocyte antigen 1 (Gr1).

La première population de monocytes murins ayant comme phénotype CCR2<sup>+</sup>/CD62L<sup>+</sup>/CX3CR1<sup>bas</sup>/Ly6c<sup>+</sup> correspond chez l'Homme à la population majoritaire de monocytes CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>-</sup> dit « classiques ». Ces monocytes sont associés à des fonctions inflammatoires du fait de l'expression du CCR2 et de CD62L (molécules connues pour être impliquées dans le recrutement de cellules inflammatoires). Parallèlement, la seconde population caractérisée par le phénotype CCR2<sup>-</sup>/CD62L<sup>-</sup>/CX3CR1<sup>haut</sup>/Ly6c<sup>-</sup> est associée aux monocytes CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup> humains. Ces monocytes joueraient le rôle de patrouilleur dans la circulation sanguine et seraient rapidement mobilisés vers les tissus en cas de lésions (261).

**Malgré de fortes similitudes dans les populations de monocytes humains et murins, les résultats des études chez la souris restent souvent difficiles à extrapoler complètement chez l'Homme, car les systèmes expérimentaux utilisés diffèrent entre les deux espèces.**

### *1.3.2.3. Les macrophages humains dérivés des monocytes*

La majorité des tissus possède des populations de M $\phi$  résidents. Ces cellules sont les plus grandes du système immunitaire et possèdent un appareil vacuolaire (lysosome, phagosome, phagolysosome, endosome) plus développé comparé à leur précurseur monocyte. Ces cellules sont bien caractérisées pour leur rôle de sentinelle du système immunitaire au niveau des premières lignes de défense tissulaires où ils résident et où ils sont transcriptionnellement programmés pour rencontrer les pathogènes et les toxiques environnementaux. Pour assurer ces fonctions, les propriétés principales des M $\phi$  sont leur capacité de phagocytose combinée à la présentation antigénique, leur mobilité et leur capacité sécrétrice. Les M $\phi$  sécrètent un large panel de médiateurs cellulaires comme des cytokines principalement, mais aussi des facteurs de croissance, des EAO et des EAN ainsi que des fractions du complément et des métabolites de l'acide arachidonique.

Les M $\phi$  jouent un rôle primordial dans le maintien de l'homéostasie tissulaire en assurant notamment la clairance des cellules sénescentes. Ils assurent également la restauration de l'homéostasie tissulaire en participant au remodelage et à la réparation de lésions tissulaires après une phase inflammatoire. Ces M $\phi$  résidents au sein des tissus sont extrêmement hétérogènes phénotypiquement. Cette grande diversité est une conséquence nécessaire des fonctions spécifiques de maintien de l'équilibre qu'ils assurent au niveau des différents tissus et niches au cours du développement et de la vie adulte. Les M $\phi$  associés aux tissus adipeux sont impliqués par exemple dans le contrôle de la sensibilité à l'insuline et de la thermogénèse adaptative (262, 263). Les ostéoclastes quant à eux, sont les M $\phi$  du tissu osseux qui sont des cellules multinucléées qui participent au remodelage osseux en résorbant l'os par dégradation de la matrice minérale (264). Enfin, les M $\phi$  alvéolaires présents dans les poumons sont caractérisés par une très forte expression de nombreux récepteurs de reconnaissance de motifs conservés pour permettre l'élimination de particules et de microorganismes de ce tissu continuellement exposé aux agressions extérieures. D'une manière générale, ces phénotypes et ces caractéristiques fonctionnelles uniques reflètent plus l'influence du microenvironnement cellulaire auxquels ils sont exposés qu'une origine distincte.

En effet, dans un contexte inflammatoire, l'origine des M $\phi$  résidents comme dérivant des monocytes sanguins circulants et recrutés aux niveaux des tissus reste la théorie prépondérante. Néanmoins, à l'heure actuelle de nombreux travaux viennent nuancer cette vision des choses. Des études chez la souris démontrent que certaines populations de M $\phi$  résidents adultes comme les cellules de Langerhans et celles de la microglie ont des origines embryonnaires. Ces populations seraient maintenues tout au long de la vie par un auto-renouvellement local (265, 266). Par ailleurs, après une greffe de moelle osseuse, l'observation de la reconstitution des populations de M $\phi$  tissulaires à l'aide de cellules marquées a permis de montrer que seul 61% des M $\phi$  alvéolaires et hépatiques sont remplacés par des cellules marquées du donneur un an après la transplantation. Ces résultats suggèrent un faible renouvellement de la population de M $\phi$  tissulaires en dehors de conditions inflammatoires (267, 268).

Dans un contexte inflammatoire de type Th2 associé à une infection parasitaire, des études ont mis en évidence une prolifération locale de M $\phi$  tissulaires dépendante de l'IL-4 (269).

Ainsi, dans des périodes d'homéostasie, dans des contextes infectieux particuliers ou lors de la résolution de l'inflammation, la contribution des M $\phi$  d'origine embryonnaire ainsi qu'un faible niveau d'auto-renouvellement semble suffisant pour maintenir une population de M $\phi$  résidents. Ce phénomène semble cependant tissu-spécifique. Néanmoins, lors de phase d'inflammation, la source majeure de M $\phi$  tissulaires reste toujours le recrutement des monocytes circulants.

#### ***1.3.2.4. Facteurs de croissance et différenciation des macrophages (M $\phi$ )***

Le M-CSF et le GM-CSF regroupés sous le terme de Colony Stimulating Factor (CSF) sont deux facteurs de croissance hématopoïétiques essentiels dans le contrôle du nombre et de la fonction des M $\phi$  (270, 271). Le M-CSF est produit de façon ubiquitaire par de nombreux tissus tandis que le taux de GM-CSF circulant est faible en condition normale et peut augmenter lors de réaction immunitaire inflammatoire (272). Ces deux CSF transduisent leur signal *via* des récepteurs et des voies de signalisation distinctes. Les deux types de récepteurs sont distribués différemment sur les populations cellulaires myéloïdes (273). Le M-CSF et le GM-CSF favorisent la différenciation, la survie, la prolifération et l'activation des M $\phi$  avec cependant des réponses différentes (271, 274). Les souris déficientes en M-CSF fonctionnel (op/op) montrent des atteintes majeures de nombreuses populations de M $\phi$ . Cette carence impacte gravement le développement de nombreux tissus, soulignant le rôle essentiel de ces cellules au cours du développement et pour le maintien de l'homéostasie (275). Les souris déficientes en GM-CSF présentent entre autre comme pathologie une protéinose alvéolaire, suggérant un rôle primordial du GM-CSF dans la maturation des M $\phi$  alvéolaires (276, 277).

En condition physiologique, les M $\phi$  sont susceptibles d'être exposés à ces deux cytokines simultanément. Les quelques études qui ont exposés *in vitro* la même population de monocytes à ces 2 CSF pour mimer cette situation montrent qu'ils peuvent entrer en compétition et avoir des effets opposés conduisant à la suppression de la réponse cellulaire à l'autre facteur de croissance (278, 279).

Les monocytes du sang exposés *in vitro* au M-CSF sont capables de se différencier en M $\phi$  en 5 à 6 jours. Ils constituent un bon modèle *in vitro* de M $\phi$  tissulaires (274, 280). En fin de culture, ces M $\phi$  dérivés des monocytes et différenciés au M-CSF sont adhérents et présentent un faible niveau d'expression membranaire du marqueur monocyttaire CD14 comparés aux monocytes. Ils possèdent une morphologie fusiforme de type fibroblastique. A l'état inactivé, ils sécrètent de très faibles quantités de médiateurs comme des cytokines et des chimiokines inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL-12, IL-8) ou des EAO. Les monocytes traités au GM-CSF sont couramment utilisés comme modèle pour la différenciation fonctionnelle des DC. Cependant, l'analyse *in silico* révèle que leur transcriptome est plus proche de celui des M $\phi$  que des DC inflammatoires (281, 282). Dans ce contexte, la costimulation avec de l'IL-4 permet de favoriser la différenciation des monocytes vers un profil de DC (283). Les M $\phi$  différenciés *in vitro* en présence de GM-CSF à partir de monocytes sanguins sont également adhérents et présentent une morphologie ronde, caractéristique dite en « œuf sur le plat ». Ils ont perdu l'expression membranaire du marqueur monocyttaire CD14 et ont une faible capacité de sécrétion de médiateurs en absence de stimulation. L'implication distincte de ces deux facteurs de croissance dans

le conditionnement transcriptionnel des M $\phi$  lors de leur activation sera discutée ultérieurement dans le paragraphe I.3.3.

### *1.3.3. Propriétés fonctionnelles des monocytes/macrophages (M $\phi$ )*

#### *1.3.3.1. Les pattern recognition receptors (PRR)*

A l'origine la réponse immunitaire innée était vue comme une réponse complètement aspécifique. Cependant, la découverte de grandes familles de récepteurs à la surface des M $\phi$  a montré que la reconnaissance des pathogènes par les effecteurs cellulaires du système immunitaire inné était spécifique. Cette spécificité s'appuie sur la reconnaissance de PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) qui regroupent des structures moléculaires exclusivement exprimées par les micro-organismes. Ces structures sont reconnues par une superfamille de récepteurs particuliers nommés PRR pour « Pattern Recognition Receptor ». Les PRR reconnaissent également des molécules endogènes comme des médiateurs libérés par des cellules endommagées, des lipides ou encore des cellules mortes. Une caractéristique fondamentale du système monocyte/M $\phi$  est leur large spectre d'expression de ces PRR. Les différents sous-types de M $\phi$  peuvent même être distingués en fonction de leur profil d'expression de ces PRR. Les PRRs comptent plusieurs familles de récepteurs incluant les TLR (Récepteurs Toll-like), les récepteurs lectines de type-C (RLC), les récepteurs scavengers (SR). L'activation de ces récepteurs à la surface des M $\phi$  conduit à des processus de phagocytose ou de sécrétion de molécules effectrices qui vont soutenir et orienter la réponse immunitaire adaptative.

##### *1.3.3.1.1. Les récepteurs Toll-Like (TLR)*

Les TLR forment une famille de récepteurs découverts dans les années 1990 comprenant 10 membres chez l'Homme et 12 chez la souris. Ces TLR sont des protéines transmembranaires de type I possédant un ectodomaine composé de motifs riches en leucine chargé de reconnaître les PAMPs. C'est ce domaine qui assure la spécificité des différents TLR pour des classes de PAMPs distinctes. Ils se composent également d'un domaine transmembranaire et d'un domaine intracytoplasmique Toll Interleukin-1 Receptor (TIR) chargé de la transduction intracellulaire du signal. Les différentes catégories de PAMPs reconnues par les TLR incluent des protéines, des lipides, des lipoprotéines et des acides nucléiques dérivés d'une grande diversité de micro-organismes comme les bactéries, les virus, les parasites et les champignons. Les différents TLR ont des spécificités distinctes en termes de

reconnaissance des PAMPs et de réponse immunitaire. Les TLR peuvent être divisés en deux sous-groupes en fonction de leur localisation cellulaire (**Tableau 3**).

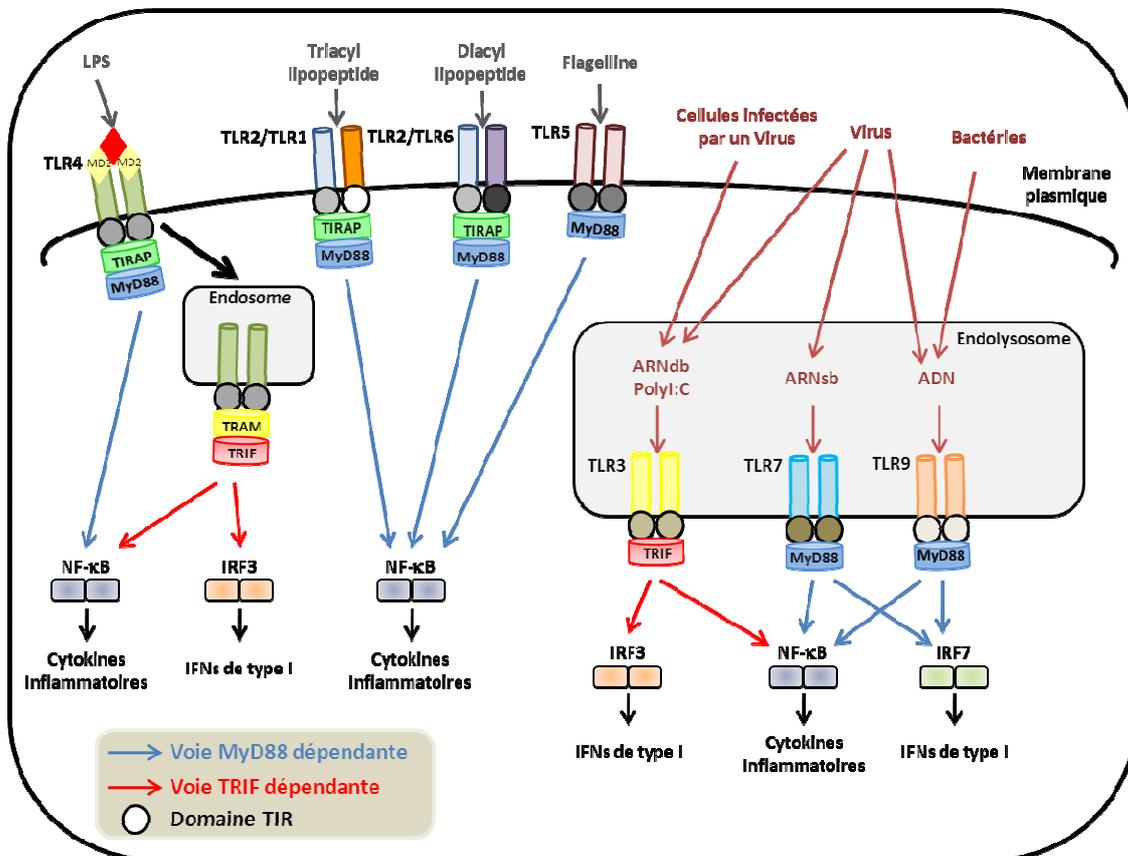
TLR	Localisation	Agonistes dérivés de pathogènes (PAMPs)	Agonistes endogènes	Agonistes synthétiques
TLR2/TLR1	Membrane plasmique	Bactéries : Peptidoglycane, lipoprotéines triacylées, LTA Levures : Zymosan	-	Pam <sub>3</sub> Cys
TLR2/TLR6	Membrane plasmique	Bactéries : Lipoprotéines diacylées	vériscan	MALP2
TLR3	Endolysosome	Virus : ARN double brin	ARNm	PolyI:C
TLR4	Membrane plasmique	Bactéries : LPS Virus : Protéines de fusion RSV Champignons : Mannane Protozoaires : Glyco-inositol-phospholipides	Acides gras saturés, β-défensines, oxLDL, amyloïdes-β	Dérivés de lipides A
TLR5	Membrane plasmique	Bactéries : Flagelline	-	-
TLR7 et TLR8	Endolysosome	Virus : ARN simple brin	ARN du soi	Imiquimod, R-848
TLR9	Endolysosome	Bactéries : ADN motifs CpG Virus : ADN motifs CpG Protozoaires : ADN motifs CpG	ADN du soi	CpG-ODN
TLR10	Endolysosome	-	-	-
TLR11	Membrane plasmique	Bactéries : Bactéries uropathogéniques Protozoaires : Molécules de types « profiline »	-	-

**Tableau 3: Les TLR et leurs ligands connus chez l'Homme (d'après (284)).**

Le premier groupe est composé des TLR 1, 2, 4, 5, 6 et 11 qui sont exprimés à la surface cellulaire, au niveau de la membrane plasmique et qui reconnaissent la plupart des composants des membranes et des parois microbiennes tels que les lipides, les lipoprotéines et les protéines. Le deuxième est formé des TLR 3, 7, 8 et 9 dont l'expression est exclusivement localisée dans des vésicules intracellulaires (ER, endosome, lysosome, endolysosome) où ils reconnaissent les acides nucléiques microbiens. La localisation subcellulaire des différents TLR est importante pour l'accessibilité à leur ligand spécifique, pour le développement d'une tolérance immunitaire vis-à-vis des molécules du soi ainsi que pour la transduction du signal.

Le TLR4 forme un complexe avec la protéine MD2 (Myeloid Differentiation Factor) et ensemble ils lient le LPS, un composant de la membrane externe des bactéries gram négative (285). Un complexe multimérique se forme alors, composés de deux ensembles TLR4/MD2/LPS et initie la transduction du signal par le recrutement de protéines adaptatrice intracellulaire. D'autres protéines peuvent favoriser cette interaction avec le LPS. Le CD14, une protéine dépourvue de domaine intracellulaire et ancrée à la membrane plasmique par un groupement Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI) lie la protéine LPS Binding Protein (LBP) en présence de LPS et le présente au complexe

TLR4/MD2 (286). Cette association permet la transduction du signal intracellulaire conduisant à l'activation des voies NF- $\kappa$ B et Interferon Regulatory Factor 3 (IRF3) (285) (**Figure 17**).



**Figure 17:** Activation des voies de signalisation MyD88 et TRIF dépendantes par la reconnaissance de PAMPs par les TLR de surface et intracellulaires. Adapté de (285).

Le TLR2 est impliqué dans la reconnaissance d'un grand nombre de PAMPs dérivés de bactéries, de parasites et de virus, il interagit aussi avec le zymosan, un composé de la membrane des levures (287). Le TLR2 forme généralement des hétérodimères avec le TLR1 ou le TLR6 permettant une reconnaissance plus spécifique des ligands. L'hétérodimère TLR2/TLR1 reconnaît les lipoprotéines triacylées dérivées des bactéries gram négatives et des mycoplasmes, tandis que l'hétérodimère TLR2/TLR6 reconnaît les lipoprotéines diacylées issues des bactéries gram positives et des mycoplasmes (**Figure 17**). L'activation du TLR2 par un agoniste induit la production de cytokines inflammatoires comme le TNF $\alpha$  par les M $\phi$  et les DC mais pas d'interféron de type I (285).

Le TLR5 reconnaît la flagelline, une protéine constituant les flagelles bactériens. Le TLR3 reconnaît les ARNs double brins, les TLR7/8 les ARNs simple brin provenant de virus à ARN (**Figure 17**).

Après l'engagement des TLR avec leur ligand, ces derniers induisent une réponse biologique spécifique en fonction de la protéine adaptatrice qui est recrutée au niveau du domaine TIR. Par exemple, le TLR4 et le TLR3 induisent la production d'interféron de type 1 et de cytokines inflammatoires alors que les TLR2/TLR1, TLR2/TLR6 et TLR5 induisent exclusivement l'expression de cytokines inflammatoires. La signalisation induite en aval des TLR peut être divisée en deux voies principales selon la protéine adaptatrice impliquée : une voie de signalisation est dépendante de la protéine adaptatrice myeloïd differentiation factor 88 (MyD88) et une autre dépendante de la protéine TIR-domain-containing adaptater-inducing interferon- $\beta$  ( $\square\square$ TRIF) (Figure 17).

La protéine MyD88 est utilisée par tous les TLR à l'exception du TLR3. Son recrutement au niveau du domaine TIR en partenariat avec d'autres protéines telles que TIR adaptor protein (TIRAP), IL-1R Associated Kinase 4, 1 et 2 (IRAK4, 1 et 2) et TNF receptor associated factor 6 (TRAF6) conduit à l'activation des voies NF- $\kappa$ B et MAPK stimulant *in fine* la production de cytokines inflammatoires.

La protéine TRIF est utilisée par le TLR3 et le TLR4 et active une voie de signalisation alternative conduisant à l'activation de NF- $\kappa$ B et de IRF3 qui stimulent la production de cytokines inflammatoires et d'interféron de type 1 respectivement.

Le TLR4 présente une originalité car il est le seul TLR capable d'activer ces deux voies. En effet le TLR4 recrute TIRAP à la membrane ce qui facilite le recrutement de MyD88 et active les voies NF- $\kappa$ B et MAPK de façon précoce (288). Le TLR4 est ensuite endocyté et acheminé vers un endosome où il forme un complexe de signalisation avec les protéines TRAM et TRIF qui conduit à l'activation d'IRF3 ainsi qu'à l'activation tardive de NF- $\kappa$ B et des MAPK (289, 290). L'activation de ces deux voies lors de l'engagement du TLR4 est nécessaire à la production de cytokines inflammatoires.

La régulation négative de la réponse induite par les TLR est importante pour limiter l'inflammation et les réponses immunitaires qui seraient à terme délétères. De nombreux régulateurs négatifs de la signalisation des TLR ont à ce jour été identifiés. Il s'agit entre autres de variants d'épissage pour les protéines de la signalisation, d'ubiquitine ligases, de microARNs ou encore de régulateurs transcriptionnels (285). Un exemple parmi d'autres est celui de la protéine Zc3h12a dont l'expression est induite par des agonistes des TLR et qui régule négativement la réponse inflammatoire induite par les TLR en affectant la stabilité des ARNm. Cette protéine possède un motif en doigt de zinc et un domaine RNase qui lui permettent de se fixer sur les régions 3' non transcrites des ARNm de l'IL-6 et de la sous-unité p40 de l'IL-12 et d'induire ainsi leur dégradation *via* son activité RNase.

De plus, les M $\phi$  déficients pour la protéine Zc3h12a produisent des quantités plus importantes d'IL-6 et d'IL-12p40 en réponse à une stimulation des TLR (291).

#### *1.3.3.1.2. Les récepteurs lectine de type-C (RLC)*

Les RLC représentent un autre groupe de PRR possédant un ou plusieurs domaines de type lectine-C. Ces récepteurs ont été caractérisés initialement par leur capacité à reconnaître des structures glucidiques associées à des pathogènes. Il est maintenant bien établi que ces récepteurs peuvent également interagir avec des molécules endogènes (292). Les RLC peuvent être divisés en 2 sous-groupes, les RLC pouvant lier le mannose et ceux pouvant lier le galactose. Les RLC ont été d'abord décrits comme nécessitant du calcium pour fonctionner cependant, de nombreux récepteurs découverts depuis ont montré une activité indépendante du calcium. Les membres de cette famille incluent des récepteurs tels que le récepteur au mannose (MR, MRC1 ou CD206), DC-SIGN (ou CD209) ou encore dectine-1 (ou  $\beta$ -glucan receptor).

Le récepteur au mannose (MRC1) est un récepteur transmembranaire de type 1 composé d'un domaine riche en cystéine (CR) en position N-terminale suivi d'un domaine fibronectine de type II (FNII) et d'une série de 8 domaines de type lectine (CTLD) arrangés en tandem. Le domaine CR est impliqué dans la liaison des glycanes sulfatés comme le galactose et le galactose-N-acétylglucosamine (GalNAC) sulfaté. Le domaine FNII composé de motifs répétitifs de fibronectine est capable de lier le collagène. Et enfin, les domaines CTLDs 4 à 8 sont chargés de reconnaître les glucoconjugués de mannose, de fucose ou de N-acétylglucosamine d'origine exogène ou endogène (293). Le MRC1 possède une courte queue cytoplasmique qui lui confère une capacité de recyclage rapide par endocytose (294).

Ce récepteur est exprimé par certaines populations de M $\phi$  et de DC ainsi que par les cellules endothéliales, lymphatiques et hépatiques (294). Il est capable de lier une grande variété de pathogènes comme par exemple *Candida albicans* ou *Leishmania donovani* et exerce ainsi son rôle de PRR. MRC1 joue un rôle important dans l'absorption et la présentation des antigènes. Il permet notamment l'adressage d'un antigène, le lipoarabinomannane mannosylé (ManLAM) issu de la paroi des mycobactéries à des vésicules endosomales précoces exprimant le CD1b (295). Le CD1b est une molécule de type CMH-like qui est spécialisée dans la présentation des antigènes atypiques tels que les glycolipides aux LT. Le MRC1 participe également au maintien de l'homéostasie et à la résolution de l'inflammation en interagissant avec des ligands endogènes sécrétés lors de phénomène inflammatoire comme l'hydrolase lysosomale, le tissu plasminogen activator (tPA) ou encore la myéloperoxydase issus des neutrophiles (294). En participant à la clairance de ces molécules, le MRC1 limite les dommages tissulaires qu'elles peuvent occasionner. Cette fonction est renforcée par le fait

que des médiateurs anti-inflammatoires comme la prostaglandine-E, l'IL-4, l'IL-10 et l'IL-13 induisent l'expression du MRC1 et favorisent ainsi cette clairance.

Les capacités de liaison des ligands peuvent être affectées par des glycosylations du MRC1 ou encore par le pH. Ce récepteur peut également subir des clivages protéolytiques conduisant à la libération d'une forme soluble fonctionnelle (293).

### 1.3.3.1.3. Les récepteurs scavenger (SR)

Les SR forment une super-famille de récepteurs capables de lier une grande diversité de ligands incluant initialement des molécules endogènes modifiées comme les lipides et des lipoprotéines oxydées (OxLDL) regroupées sous l'appellation de DAMPs (Danger-Associated Molecular Patterns). Par la suite, il a été montré que ces récepteurs peuvent également interagir avec des protéines et des lipoprotéines endogènes non modifiées aussi bien qu'avec des molécules exogènes comme certains PAMPs tels que le LPS ou l'acide lipoteichoïque (296). Les SR forment une famille structurellement très hétérogène qui peut être divisée en 6 classes de récepteurs allant de A à G (Figure 18).

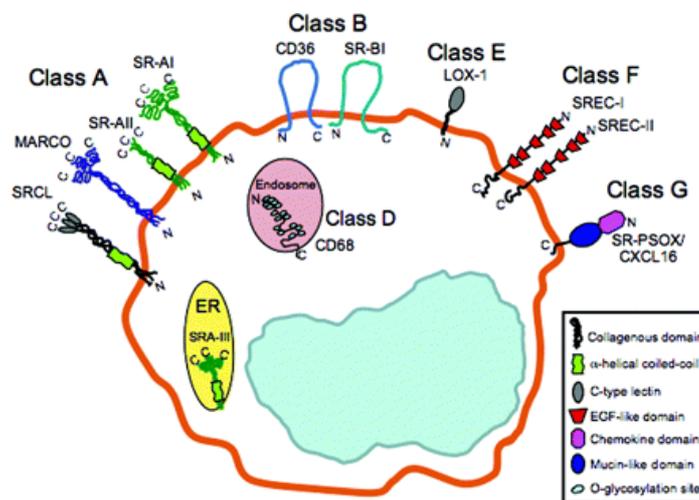


Figure 18: Représentation schématique des membres de la famille des récepteurs scavenger (297).

Considérant ces diversités de structures et de ligands, ces récepteurs participent à de nombreux processus biologiques comme la phagocytose et l'élimination des cellules apoptotiques, la clairance des pathogènes et le transport des lipides (296). Le comportement des SR de classe A comme SR-A1 ou de classe B comme SR-B1 ou CD36 peut être dichotomique et induire une réponse pro- ou anti-inflammatoire suivant la nature du corécepteur avec lequel ils s'engagent. Ainsi, une étude montre que l'interaction SR-A1 et TLR4 en présence de LPS est requise pour activer efficacement la voie NF- $\kappa$ B

(298), tandis que son association avec d'autres partenaires conduit à la clairance de cellules apoptotiques (299). Il en va de même pour CD36 qui induit des réactions inflammatoires en réponse au LTA ou à des lipoprotéines diacylées lorsqu'il est complexé avec l'hétérodimère TLR2/TLR6 (300). A l'inverse, l'internalisation dans les érythrocytes de *Plasmodium falciparum* médié par CD36 n'induit pas la production de cytokines pro-inflammatoires (301) et ceci est aussi le cas pour l'ingestion des corps apoptotiques médié par le CD36.

Le répertoire d'expression des différents PRR est propre à chaque sous-type de M $\phi$  et il existe une coopération entre les différents récepteurs qui est susceptible d'orienter ou de moduler l'intensité de la réaction immunitaire établit par ces cellules lors de leur activation.

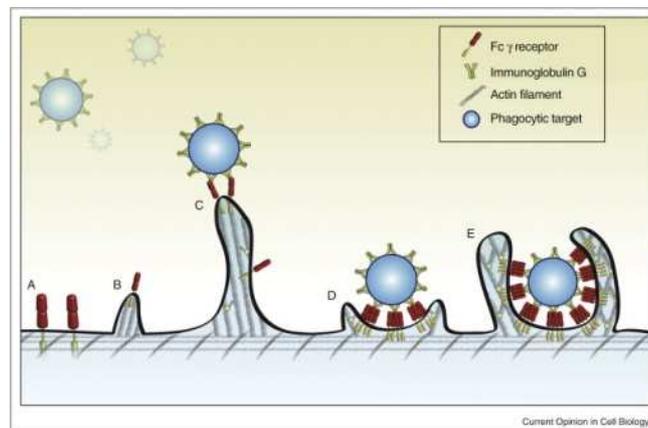
### ***1.3.3.2. La phagocytose***

La phagocytose est un processus cellulaire actif d'internalisation spécifique de particules par l'intermédiaire de divers mécanismes actine-dépendants. Les cibles qui ont une taille généralement supérieure à 0,5  $\mu\text{m}$  de diamètre peuvent inclure des micro-organismes, des cellules mortes ou sénescents (efférocytose) ou des débris de l'environnement. Cette propriété est restreinte à certaines cellules spécialisées de l'organisme comme les monocytes/ M $\phi$ , les DC ou les neutrophiles. La phagocytose est une fonction fondamentale des M $\phi$  aussi bien pour assurer le maintien de l'homéostasie que la défense immunitaire de l'organisme contre les agressions internes ou externes. Ce phénomène repose sur la reconnaissance, la capture et la dégradation des pathogènes associés à une présentation antigénique. La reconnaissance des particules s'effectue à l'aide de récepteurs spécifiques. L'interaction avec le récepteur peut dépendre de la reconnaissance des opsonines à la surface de la particule (**Figure 19**). Cette reconnaissance inclut notamment les récepteurs Fc comme Fc $\gamma$ RI (CD64) ou Fc $\gamma$ RIIA (CD32) qui reconnaissent les antigènes opsonisés par des anticorps. La liaison peut aussi se faire directement *via* la reconnaissance des PAMPs comme c'est le cas pour le récepteur dectine-1 reconnaissant les  $\beta$ -glucans fongiques, ou encore SR-A1 pouvant reconnaître des motifs bactériens. Les TLR peuvent également déclencher des processus de phagocytose.

Après cette liaison, le regroupement (ou clustering) des récepteurs déclenche une réorganisation locale du cytosquelette d'actine fournissant ainsi une force motrice pour la formation du phagosome et l'internalisation cellulaire de la particule (**Figure 19**). Deux types de mécanisme sont proposés pour expliquer l'internalisation de la particule : un premier modèle de type « zipper » repose sur l'idée que la surface de la particule recouverte d'IgG agit comme un chemin de fer pour guider les extensions de pseudopodes de la membrane des M $\phi$  autour de la particule. Un second modèle de type « trigger » propose un mécanisme de « tout-ou-rien » basé sur une interaction initiale entre le ligand et le récepteur déclenchant la formation du phagosome (302). L'extension des pseudopodes dépend de

l'activation de petites GTPases comme Rac1 et cdc42 qui sont impliquées dans la polymérisation des filaments d'actine (303). Une fois l'internalisation de la particule achevée par la fermeture du phagosome, celui-ci va subir une étape de maturation (**Figure 20**). Cette maturation repose sur une acidification du phagosome grâce à sa fusion avec des lysosomes et à l'activité des ATPases présentes. Le pH acide du phagolysosome formé permet le fonctionnement optimale d'enzymes protéolytiques telles que les protéases et les hydrolases assurant la dégradation du pathogène (**Figure 20**). De plus, les différentes sous-unités constituant le complexe de la NADPH oxydase phagocytaire peuvent s'assembler au niveau du phagolysosome et générer des EAO au potentiel hautement toxique et microbicide (304).

La dernière étape de ce processus est la présentation à la surface des CPA des peptides antigéniques issus de la dégradation du pathogène par le CMH de classe II permettant d'activer les lymphocytes CD4+ (305).



**Figure 19: Modèle de liaison et d'internalisation des particules IgG-opsonisées par les récepteurs de type FcR (306).** Les récepteurs à la surface des cellules phagocytaires (A) sont entraînés par les filaments d'actine (B) qui peuvent rencontrer et lier des particules opsonisées (C). Une fois que la particule est fixée, des récepteurs supplémentaires se regroupent en cluster et s'activent (D), ce qui déclenche une cascade de signalisation conduisant à un remodelage de l'actine qui propulse la membrane autour de la particule (E). Cette formation facilite ainsi l'engagement des récepteurs et l'internalisation des particules.

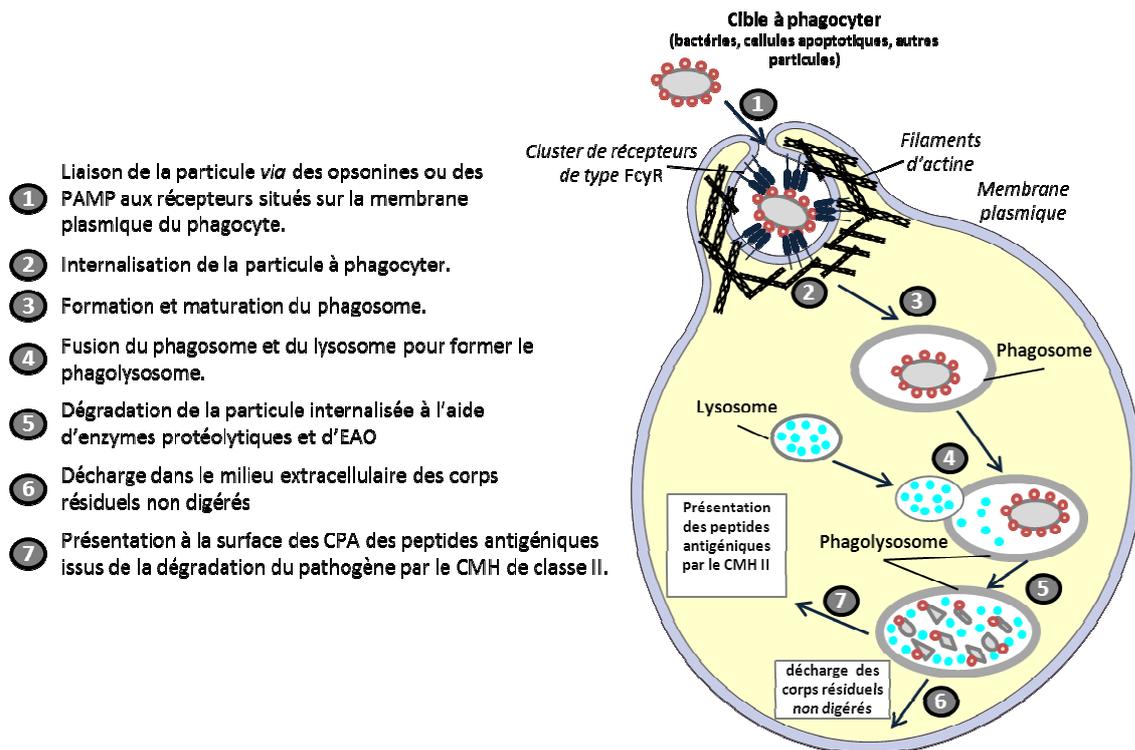


Figure 20: Les principales étapes de la phagocytose d'une particule. D'après (303, 305).

### 1.3.3.3. La production d'espèces activées de l'oxygène (EAO) et de l'azote (EAN) par les Mφ

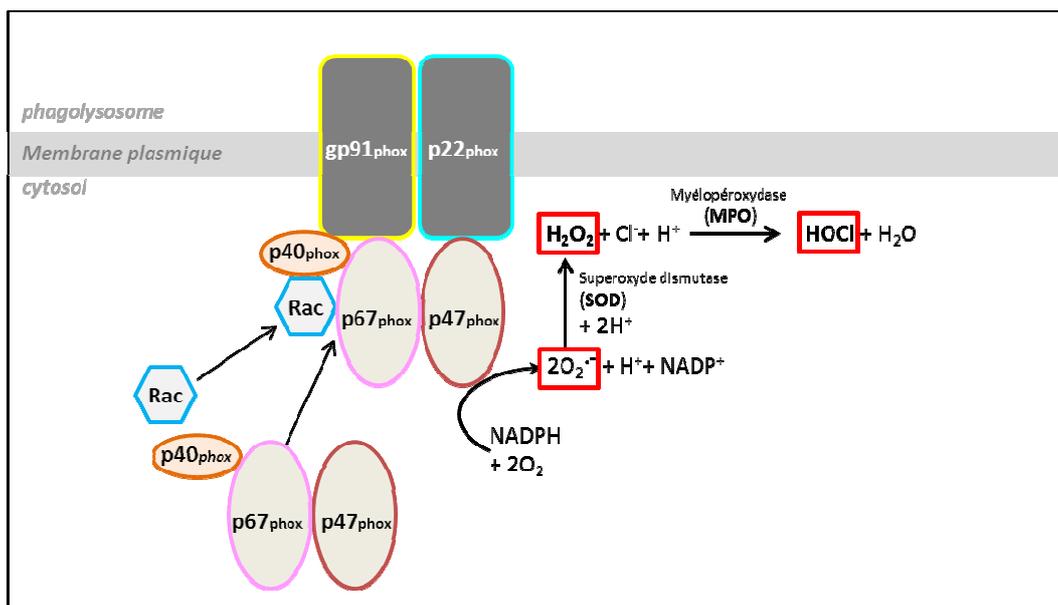
Le déroulement de réactions redox dans les phagosomes des Mφ est un phénomène fondamental couplé à la phagocytose pour détruire les pathogènes. Ces réactions sont initiées par la présence d'EAO comme l'anion superoxyde ( $O_2^{\circ-}$ ) et d'EAN tels que le monoxyde d'azote (NO).

La capacité à produire des EAO comme l' $O_2^{\circ-}$ ,  $OH^{\circ}$ , ou l' $H_2O_2$  est une caractéristique des Mφ. Au sein du phagosome, ces réactions sont catalysées majoritairement par des peroxydases, des superoxydes dismutases et l'activation d'un complexe enzymatique la NADPH oxydase (Nox). L'activation de ces enzymes engendre un phénomène nommé « burst oxydatif ». La Nox est un système enzymatique composé d'un complexe de sous-unités membranaires comprenant la sous-unité gp91phox et la sous-unité catalytique p22phox, et de quatre protéines cytosoliques p47phox, p67phox, p40phox ainsi que la GTPase Rac1 (103) (Figure 21). La formation des EAO requiert l'assemblage de ce complexe principalement sur la membrane des phagolysosomes lors de l'activation

des cellules myéloïdes. La Nox utilise des électrons du NADPH pour réduire l'oxygène moléculaire et former des anions superoxydes (**Figure 21**). Ces anions superoxydes sont convertis enzymatiquement en peroxyde d'hydrogène, qui est converti à son tour par la myéloperoxydase (MPO) en acide hypochloreux (HOCl), un puissant agent microbicide (**Figure 21**).

Il est à noter que les Mφ présentent une plus faible capacité à générer des EAO en comparaison de leurs précurseurs monocytaires, ce qui est en partie dû à une plus faible expression de la MPO (307).

En plus des EAO, les Mφ ont également la capacité de produire des espèces dérivées de l'azote (EAN), comme le monoxyde d'azote (NO). Ce NO peut réagir avec l'anion superoxyde pour former du peroxynitrite, une espèce radicalaire très réactive (**Figure 22**). La source majeure de NO provient de sa production enzymatique par des NO synthases (NOS) qui génèrent du NO et de la citrulline en présence de L-arginine, de NADPH et d'oxygène moléculaire (**Figure 22**). Il existe 3 isoformes de la NOS dont la NOS3 (ou NOS endothéliale) et NOS1 (ou NOS neuronale), initialement mises en évidence au niveau des systèmes cardiovasculaire et neuronal. Elles sont exprimées de façon constitutive et libèrent en continu ou de façon pulsatile de faibles quantités de NO (103). Dans les



cellules immunitaires et notamment dans les Mφ, la production de NO est sous le contrôle d'une NOS inductible (NOS2 ou iNOS) dont l'activation dépend de cytokines.

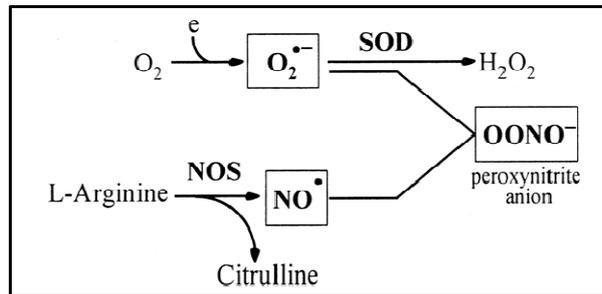


Figure 21: Mécanisme par l'activation de la D'après (103).

de formation des EAO NADPH oxydase.

Le métabolisme de la L-arginine à l'origine de la production de NO est un processus central dans le Mφ qui peut être modulé en fonction du contexte cytokinique et engendrer différents effets. D'une part, l'IFN $\gamma$  □ induit l'expression de la iNOS et conduit à la formation de NO qui va favoriser la destruction des pathogènes. D'autre part, l'IL-4 stimule l'expression de l'arginase-1 et induit un shift dans le métabolisme de l'arginine vers la production de la L-ornithine et de polyamines qui sont des médiateurs impliqués dans la réparation tissulaire.

Figure 22: Production de péroxynitrite (OONO<sup>-</sup>) par la réaction de l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) avec le monoxyde d'azote (NO<sup>•</sup>) (308). Les NO synthases (NOS) utilise la L-arginine et le dioxygène (O<sub>2</sub>) pour produire le NO<sup>•</sup> et la citrulline. Le NO<sup>•</sup> formé peut réagir avec l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) pour former du peroxynitrite (OONO<sup>-</sup>).

#### 1.3.3.4. Les cytokines et chimiokines

Les cytokines et les chimiokines représentent un ensemble de molécules de communication cellulaire fondamentale qui permettent notamment la différenciation et l'activation des cellules immunitaires. Ce dialogue, établi entre les cellules grâce à ces molécules de signalisation, oriente l'ensemble de la réponse immunitaire. La sécrétion de cytokines et de chimiokines est une caractéristique essentielle des monocytes/ Mφ qui joue un rôle fondamentale dans l'activation fonctionnelle de ces cellules et l'orientation de la réponse immunitaire.

#### *1.3.3.4.1. Les cytokines*

Les cytokines constituent une grande famille de protéines de faible poids moléculaire. Ces molécules de communication cellulaire exercent leurs actions de façon paracrine, exocrine ou autocrine par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques dont la signalisation en aval induit la transcription de gènes. Le pléiotropisme et la redondance des fonctions des cytokines permettent une régulation fine de l'orientation d'une réponse immunitaire complexe. Les monocytes/M $\phi$  sont constamment exposés à de nombreuses cytokines produites dans leur microenvironnement cellulaire et produisent en retour un panel de cytokines spécifiques, qui favorise et soutient l'orientation de la réponse immunitaire.

##### *1.3.3.4.1.1. L'interleukine-12 (IL-12) et l'interleukine-23 (IL-23)*

L'IL-12 est une cytokine pro-inflammatoire hétérodimérique formée par la liaison d'une petite sous-unité de 35 kDa (p35) et d'une plus grande de 40 kDa (p40). L'expression des sous-unités p35 et p40 est codée par deux gènes distincts, IL12A et IL12B respectivement. Ces deux gènes doivent être exprimés de manière coordonnée, dans les mêmes cellules pour produire la forme soluble biologiquement active, l'IL-12p70 (309). L'IL-23 est également une cytokine hétérodimérique de la famille de l'IL-12 formée par l'interaction de la sous-unité p40, commune avec l'IL-12 et de la sous-unité p19. L'expression de l'IL-12p40 est restreinte aux cellules inflammatoires activées produisant la forme active de l'IL-12 et de l'IL-23 telles que les monocytes/M $\phi$ , les DC et les neutrophiles. La sous-unité p40, qui est produite en large excès comparée aux sous-unités p35 et p19, peut être sécrétée sous forme de monomère ou d'homodimère en absence des autres sous-unités (309). Au contraire, la sécrétion de p35 comme celle de p19 est uniquement associée à p40 et constitue donc la sous-unité limitante pour la formation des hétérodimères IL-12 et IL-23. Les effets pro-inflammatoires de l'IL-12 dépendent de sa liaison avec son récepteur, l'IL-12R exprimé principalement par les LT activés, les NK et les NKT (309). La liaison de l'IL-12p70 à son récepteur composé de deux chaînes (IL-12R $\beta$ 1 et IL-12R $\beta$ 2) active la voie de signalisation Janus Kinase/ Signal Transducer and Activator of Transcription (JAK/STAT) et plus spécifiquement STAT4 (309). L'IL-12 stimule la prolifération et la cytotoxicité des LT activés et des NK, la différenciation de type Th1 des LT en favorisant l'expression et la production de cytokines de type Th1 telles que l'INF $\gamma$  par les LT et les NK. Cette production d'INF $\gamma$  induite par l'IL-12 stimule l'activité microbicide des M $\phi$  (310).

Les produits microbiens ligands des TLR sont de forts inducteurs de l'IL-12 dans les M $\phi$ , les DC, les monocytes et les neutrophiles. Cependant dans les phagocytes, l'engagement des TLR seul ne semble pas suffisant pour stimuler la production d'IL-12p70 et n'induit qu'une faible expression de

l'IL-12p40. La synergie avec un second signal cytokinique, médié notamment par l'IFN $\gamma$ , est alors requis pour augmenter la capacité de ces cellules à produire de l'IL-12 (311, 312). L'IFN $\gamma$  induit la transcription des gènes codant à la fois pour p40 et p35, mais il a un effet particulièrement marqué sur la production de l'hétérodimère IL-12p70.

#### *1.3.3.4.1.2. L'interleukine-6 (IL-6)*

L'IL-6 est une cytokine identifiée à l'origine comme un facteur de différenciation des LB. L'IL-6 est produite majoritairement par les monocytes/M $\phi$  et les cellules épithéliales, mais peut également être induite dans de nombreux types cellulaires comme les cellules endothéliales, les fibroblastes, les lymphocytes T et B, les mastocytes et les neutrophiles (313). Elle régule ainsi les fonctions physiologiques (prolifération, survie, différenciation et activation) de nombreux types cellulaires. L'IL-6 possède de multiples activités biologiques: elle stimule notamment la différenciation des cellules myéloïdes et des LT, elle favorise également la production d'Ig par les LB, et de protéines de la phase aiguë de l'inflammation dans le foie ainsi que l'élévation de la température corporelle (313). Elle est par conséquent impliquée dans la régulation immunitaire, l'hématopoïèse, l'inflammation et l'oncogénèse. Combinée avec du Transforming Growth Factor-beta (TGF- $\beta$ ), l'IL-6 favorise aussi la polarisation Th17 des LT (314). Du fait de ses propriétés inflammatoires, l'IL-6 participe également à la pathogenèse de diverses maladies autoimmunes ou associées à une inflammation chronique telles que la polyarthrite rhumatoïde (315, 313). L'IL-6 agit sur les cellules sous forme d'un homodimère en se liant à son récepteur multimérique spécifique, l'IL-6R composé de deux chaînes  $\alpha$  (IL-6R $\alpha$ ) et de deux sous-unités  $\beta$  chargées de la transduction intracellulaire du signal nommées gp130 (ou IL-6R $\beta$ ) (315). L'IL-6R $\alpha$  est principalement exprimée par les hépatocytes et les cellules hématopoïétiques (LT, monocytes/M $\phi$ , LB activés et neutrophiles), tandis que l'expression de gp130 est plus ubiquitaire. Une forme soluble de l'IL-6R $\alpha$  peut être produite par épissage alternatif ou par l'action de métalloprotéases. La liaison de l'IL-6 sur son récepteur active principalement la voie de signalisation JAK /STAT et plus spécifiquement STAT3 et STAT1 (315).

#### *1.3.3.4.1.3. Le Tumor Necrosis Factor $\alpha$ (TNF $\alpha$ )*

Le TNF $\alpha$  est une cytokine pro-inflammatoire appartenant à la super-famille des TNF, constituée de plus de 50 membres solubles et membranaires structurellement apparentés. Elle est sécrétée principalement par les M $\phi$  activés mais peut aussi être induite dans une large variété d'autres types cellulaires comme les DC, les NK, les LT et les LB. Le TNF $\alpha$  exerce de multiples effets mais sa fonction principale est de stimuler l'expression de nombreux médiateurs pro-inflammatoires incluant des cytokines, des chimiokines, des molécules d'adhésion et des facteurs de croissance

comme le GM-CSF. Ces effets sont dépendants de l'activation des voies MAPK et du facteur de transcription NF- $\kappa$ B. Une surexpression de TNF $\alpha$  est impliquée dans la pathogenèse de troubles inflammatoires chroniques comme par exemple la polyarthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, le psoriasis ou la BPCO (313).

#### *1.3.3.4.1.4. L'interleukine-10 (IL-10)*

L'IL-10 est une cytokine dont la structure est similaire à celle de l'IFN $\gamma$  (316). Elle est produite préférentiellement par les cellules myéloïdes et les lymphocytes (LT de type régulateur et Th2 mais également Th1, Th17, Th22 et LB). Elle peut aussi être sécrétée dans des quantités plus limitée par les granulocytes, les cellules NK et des cellules non immunitaires telles que les cellules épithéliales, les fibroblastes, et les kératinocytes (313). L'IL-10 est probablement la cytokine anti-inflammatoire la plus importante pour limiter les réactions immunitaires menant à des lésions tissulaires. Les dimères d'IL-10 s'associent avec leur récepteur, l'IL-10R, composé de deux chaînes (IL-10R1 et IL-10R2) et activent en aval la voie de signalisation JAK/STAT et principalement STAT3 (317). L'IL-10 exerce ses effets immunosuppresseurs en inhibant l'expression de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF $\alpha$ , IL-8) et réduit la capacité de présentation des antigènes par les DC en diminuant l'expression des molécules du CMH de classe II (313). L'IL-10 s'oppose également à la polarisation Th1 et Th17 des LT en inhibant la production d'IL-12 et d'IL-23 favorisant ainsi l'apparition d'une population de LT régulateurs (LTreg) (317).

#### *1.3.3.4.2. Les chimiokines*

Les chimiokines sont de petites protéines qui fonctionnent comme des cytokines chimiotactiques en dirigeant la migration cellulaire. Une telle migration s'effectue selon un gradient de concentration et est régulée par l'expression de récepteurs spécifiques à la surface des leucocytes. Ce mécanisme conditionne le recrutement de ces cellules dans les différents tissus de l'organisme. Les différentes chimiokines sont catégorisées en 4 sous-familles basées sur la localisation de leur 2 premiers résidus cystéines sur les 4 conservés : les chimiokines de type C, CC, CXC et CX<sub>3</sub>C. Elles sont essentielles pour la régulation de l'inflammation, l'angiogénèse, le recrutement de leucocytes et l'immunité anti-microbienne. Au moins 46 chimiokines ont été identifiées jusqu'à présent chez l'Homme. Leur activité biologique passe par leur liaison spécifique à des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG).

Les M $\phi$  présentent selon leur état d'activation un profil de sécrétion spécifique de nombreuses chimiokines (318). Par ailleurs, les différentes sous-populations de LT (Th1, Th2, Th17, Th22, Treg)

expriment un répertoire spécifique de récepteurs aux chimiokines. Le dialogue entre ces 2 types cellulaires par l'intermédiaire des chimiokines permet ainsi le recrutement sélectif de différentes populations de LT et contribue à l'élaboration et à l'amplification d'une réponse immunitaire polarisée.

#### *1.3.3.4.2.1. L'interleukine-8 (IL-8)*

L'IL-8 ou CXCL8 est la première chimiokine mise en évidence par différents groupes en 1988 (319). Cette chimiokine pro-inflammatoire est principalement impliquée dans l'attraction des neutrophiles. Elle est exprimée par différentes cellules immunitaires, comme les monocytes/M $\phi$  et les DC, et non immunitaires comme les cellules épithéliales, endothéliales et les fibroblastes. L'IL-8 exerce ses fonctions biologiques grâce à son interaction avec 2 récepteurs, CXCR1 et CXCR2, présents à la surface de différents types cellulaires tels que les neutrophiles, les LT, les cellules endothéliales et même certaines cellules cancéreuses et les M $\phi$  associés aux tumeurs (TAM) (320). Une expression accrue de l'IL-8 est retrouvée dans certaines tumeurs où elle favorise l'angiogenèse ; l'IL-8 mime la fonction du Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) et stimule la survie et la prolifération des cellules endothéliales (320). Son expression peut être induite par des cytokines inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL-6), des agonistes des TLR (LPS) ou encore des composés chimiques exogènes tels que l'arsenic ou le B(a)P (234, 321) et dépend principalement de l'activation des voies NF- $\kappa$ B et des MAPK.

#### *1.3.3.4.2.2. Les chimiokines CCL17, CCL18 et CCL22*

Les chimiokines CCL17 (ou TARC pour Thymus and Activation Regulated Chemokine) et CCL22 (ou MDC pour Macrophage Derived Chemokine) sont deux membres de la famille des chimiokines de type CC. Ces deux chimiokines ont beaucoup de caractéristiques communes : Les gènes encodant CCL17 et CCL22 sont localisés sur le même chromosome (16q13) et possèdent une séquence très similaire avec 32% d'homologie. De plus ces deux chimiokines exercent leurs effets biologiques en se liant au même récepteur CCR4 (322). L'expression de CCL17 et CCL22 est à la fois constitutive et inductible. CCL17 est exprimée constitutivement dans le thymus et produite après activation par différents type cellulaires comme les DC, certaines sous-populations de M $\phi$ , les cellules endothéliales, les kératinocytes, les cellules épithéliales bronchiques et les fibroblastes (323). CCL22 est produite par les M $\phi$ , les DC et les cellules épithéliales thymiques. Son expression est localisée dans les organes lymphoïdes (thymus, rate, ganglions lymphatiques) (322). L'expression de ces deux chimiokines peut également être modulée par des cytokines. L'IL-4 et d'autres cytokines de type Th2 comme l'IL-13 induisent l'expression de CCL17 et CCL22 dans les M $\phi$  et les LT (324–326). À

l'inverse, des cytokines associées à la polarisation de type Th1 comme l'IL-12 et l'IFN $\gamma$  inhibent la production de CCL22 (322). Le récepteur CCR4 est exprimé principalement par les LT de type Th2 et les LT régulateurs mais aussi par les cellules NKT, les plaquettes et les thymocytes. Les 2 chimiokines CCL17 et CCL22 ligands de CCR4 sont de puissants attracteurs des lymphocytes Th2 (326). Considérant leur régulation et leur activité biologique, CCL17 et CCL22 sont considérées comme des chimiokines favorisant la polarisation Th2. Par conséquent, leur surexpression conduit au développement et à l'exacerbation de pathologies allergiques comme l'asthme ou les dermatites allergiques (327, 328).

CCL18 est aussi une chimiokine de type CC qui porte de nombreux noms dont le plus courant est Pulmonary and Activated Regulated Chemokine (PARC). Cette chimiokine est présente chez l'Homme et le primate et il n'existe pas d'orthologue chez la souris. CCL18 présente une expression constitutive plus importante au niveau pulmonaire comparé au thymus ou aux ganglions lymphatiques. Les CPA (monocytes, M $\phi$  alvéolaires et DC) sont la source principale de CCL18, mais elle peut aussi être produite par les éosinophiles. En plus de son expression constitutive, CCL18 possède des caractéristiques de chimiokine inflammatoire. En effet, son expression peut être induite par différents stimuli comme des produits bactériens (LPS), des peptidoglycans ou des allergènes. De plus, la sécrétion de CCL18 est augmentée *in vitro* sous l'effet de cytokines Th2 (IL-4, IL-13 et IL-10) et inhibée par l'IFN $\gamma$  une cytokine de type Th1 (329). Une étude a montré qu'une cytokine aux propriétés plutôt Th2, l'IL-33 induisait également la production de CCL18 dans différents sous-types de M $\phi$  activés (330). Au niveau fonctionnel, CCL18 favorise le recrutement de LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> naïfs, de LT mémoires de la peau, de LB et de DC immatures. Le récepteur par lequel CCL18 exerce ses effets biologiques n'a pas encore été clairement identifié. CCL18 possède en plus de son activité chimiotactique des fonctions immunitaires intrinsèques. Elle favorise notamment la prolifération des monocytes, la production de cytokines, l'hématopoïèse dans des modèles de cultures et le remodelage tissulaire (329). Dans les poumons en condition normale, CCL18 joue un rôle dans la maintenance d'une tolérance vis-à-vis des antigènes inhalés. En condition inflammatoire, principalement de type Th2, elle peut favoriser des mécanismes de résolution en transformant les LT Th2 recrutés en LTreg. Le caractère Th2 de cette chimiokine l'implique dans de nombreuses pathologies inflammatoires chroniques et allergiques comme la polyarthrite rhumatoïde, l'hypersensibilité cutanée de contact, la fibrose pulmonaire idiopathique ou encore la dermatite atopique et l'asthme (329).

### *1.3.4. La polarisation des macrophages (M $\phi$ )*

#### *1.3.4.1. Nomenclature*

Les M $\phi$  expriment une multitude de récepteurs aux facteurs de croissance, aux cytokines ou aux composés microbiens. Cette caractéristique leur confère une grande plasticité et la capacité de s'activer en fonction d'une combinaison de stimuli pour acquérir des phénotypes fonctionnels distincts. Dans le cadre de la réponse immunitaire, l'état d'activation des M $\phi$  dépend de la réciprocité des interactions qu'ils établissent avec les LT et les LB activés. Ce dialogue coordonné favorise l'établissement, l'amplification et la régulation d'une réponse immunitaire aussi bien innée qu'adaptative. Le concept d'activation M1 et M2 des M $\phi$  a émergé par analogie avec la nomenclature des LT Th1 et Th2. Les M $\phi$  M1 et M2 ont initialement été classés le long de ce qui pourrait être considéré comme une échelle linéaire, sur laquelle ils représentent chacun une extrémité. Dans cette classification, la désignation M1 est réservée aux M $\phi$  activés dit « classiquement » sous l'effet de cytokines Th1 (IFN $\gamma$  et TNF $\alpha$ ) et la désignation M2 est un terme générique qui regroupe les M $\phi$  activés « alternativement » induits par des cytokines Th2, l'IL-4 et l'IL-13 ainsi que différentes formes d'activation autres que classique (246, 331).

#### *1.3.4.2. Les macrophages de type M1*

Le terme d'activation classique des M $\phi$  a été introduit dans les années 1960 par Mackaness dans un contexte infectieux pour décrire une activité microbicide renforcée des M $\phi$  contre le BCG (Bacille de Calmette et Guérin) et *Listeria monocytogenes* lors d'une exposition secondaire aux pathogènes (332). Ce renforcement immunitaire des M $\phi$  a plus tard été lié à une réponse Th1 et à la production d'IFN $\gamma$  par les LT activés (333). Les M $\phi$  M1 désignent ainsi des effecteurs produits lors de la réponse immunitaire à médiation cellulaire initialement caractérisée par une exposition à une combinaison de deux signaux, l'IFN $\gamma$  et le TNF $\alpha$ . Cette population de M $\phi$  présente une capacité microbicide, cytotoxique et tumoricide accrue et sécrètent des niveaux élevés de médiateurs et de cytokines pro-inflammatoires (334).

L'IFN $\gamma$  qui est la principale cytokine associée à l'activation M1, peut être produite par les cellules immunitaires innées ou adaptatives. En réponse à un stress ou à une infection, les cellules NK constituent une source initiale importante d'IFN $\gamma$  qui peut activer une production massive de cytokines pro-inflammatoires, d'EAO et d'EAN par les M $\phi$ , et par conséquent augmenter leurs capacités cytotoxiques (335). La production d'IFN $\gamma$ , généralement transitoire dans les cellules NK, est ensuite assurée par les LT Th1, et confèrent de façon plus durable aux M $\phi$  une capacité de défense de l'hôte

contre de nombreux pathogènes intracellulaires. La signalisation de l'IFN $\gamma$  dans les M $\phi$  dépend principalement de l'activation de JAK2, STAT1 et IRF1.

L'activation de type M1 requiert la combinaison de deux signaux à l'origine, l'IFN $\gamma$  et le TNF $\alpha$ . Néanmoins, certains ligands des TLR agissant *via* la voie MyD88 induisent la production de TNF $\alpha$  qui peut alors coopérer avec l'IFN $\gamma$  de manière autocrine et activer classiquement les M $\phi$ . Par ailleurs, l'activation de la voie dépendante de TRIF et d'IRF3 par certains TLR conduit à la production endogène d'IFN $\beta$  qui peut se substituer à l'IFN $\gamma$ . Par conséquent, certains ligands de TLR qui induisent à la fois TNF $\alpha$  et IFN $\beta$  comme le LPS (agoniste du TLR4), sont capables d'activer classiquement les M $\phi$  sans l'aide d'autres cellules effectrices.

Cependant, les effets synergiques de l'IFN $\gamma$  avec la signalisation des TLR conduit à une activation optimale des M $\phi$  M1. Le priming des M $\phi$  par l'IFN $\gamma$  correspond au fait que ce stimulus en tant que tel n'est pas optimal mais conditionne les capacités de réponse en termes d'inflammation des M $\phi$  à d'autres stimuli comme les ligands des TLR. Par exemple, l'IFN $\gamma$  stimule l'expression des TLR, de leur corécepteurs ainsi que des récepteurs du fragment Fc des Ig (FcR) dans les M $\phi$  (336, 337). Ce priming sensibilise les M $\phi$  à une activation des TLR et augmente la phagocytose des pathogènes par les M $\phi$  M1. De plus, en présence d'IFN $\gamma$ , l'activation de la voie NF- $\kappa$ B par le LPS est potentialisée comme l'illustre l'accélération de la dégradation de l'inhibiteur I $\kappa$ B $\alpha$  dans les cellules murines RAW264.7 ainsi que l'assemblage préférentiel de l'hétérodimère activateur p50-p65 de NF- $\kappa$ B dans les monocytes humains (338, 339). La co-stimulation IFN $\gamma$ /LPS induit également une sécrétion plus importante d'IL-12p70 par les M $\phi$  résultant d'une coopération des facteurs de transcription STAT1 et NF- $\kappa$ B possédant des éléments de réponse sur le promoteur des gènes codant pour les sous-unité p35 et p40 de l'IL-12 (311, 312).

Le GM-CSF peut aussi être considéré comme un facteur favorisant la polarisation M1 des M $\phi$  (280). En effet, le GM-CSF est un facteur de croissance inflammatoire qui stimule la capacité de présentation des antigènes, la phagocytose de particules osponisées, l'activité microbicide ainsi que l'attraction et l'adhérence des leucocytes (340). Le GM-CSF induit aussi la production de cytokines dans les monocytes et les M $\phi$  (IL-6, IL-8, G-CSF, M-CSF, TNF $\alpha$ , et IL-1 $\beta$ ). Cependant le niveau de sécrétion de ces cytokines pro-inflammatoires dans les M $\phi$  exposés au GM-CSF reste considérablement inférieur à celui retrouvé par exemple, lors d'une stimulation au LPS. Le GM-CSF peut alors être envisagé comme un stimulus de priming des M $\phi$  conduisant à une « pré-programmation » facilitant leur activation effective ultérieure.

**En général, les M $\phi$  M1 sont caractérisés phénotypiquement par une production importante de cytokines inflammatoires telles que l'IL-12, l'IL-23, l'IL-6 le TNF $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$**

ainsi qu'une faible capacité de sécrétion de l'IL-10. Ces cytokines, et notamment l'IL-12, contribuent efficacement à l'initiation et à l'amplification d'une réponse immunitaire à médiation cellulaire de type Th1. Ce phénotype favorise aussi l'élimination des pathogènes intracellulaires et des cellules tumorales. L'activation classique des M $\phi$  stimule également la production d'EAO et d'EAN, aux propriétés microbicides et cytotoxiques importantes: L'IFN $\gamma$  en présence de LPS favorise l'expression de la NOS2 conduisant à la production de NO par les M $\phi$  et des sous-unités p91 et p67phox de la Nox produisant de l'anion superoxyde (Figure 23).

La faible production d'IL-10 par les M $\phi$  M1 favorise aussi l'amplification de la réponse inflammatoire de type Th1. L'IFN $\gamma$  bloque la production d'IL-10 déclenchée par une activation soutenue des TLR aboutissant à une inhibition de l'expression notamment d'IL-6 et de TNF $\alpha$  par les M $\phi$  (336). La levée de ce rétrocontrôle négatif par l'IFN $\gamma$  favorise par conséquent la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les M $\phi$  M1.

Cette production de cytokines et de médiateurs inflammatoires par les M $\phi$  M1 peut aussi causer chez l'hôte de nombreux dommages tissulaires. En effet, l'IL-6 et l'IL-23 produites par les M $\phi$  activés classiquement peuvent contribuer au développement et à l'expansion d'un sous type de LT, les Th17 (314, 341). Ces cellules productrices d'IL-17 sont associées à des maladies inflammatoires auto-immunes comme la sclérose en plaque et la polyarthrite rhumatoïde (342).

Les M $\phi$  M1 produisent également un ensemble de chimiokines spécifiques permettant le recrutement des LT Th1, de LT cytotoxiques et de cellules NK nécessaires à l'établissement d'une réponse Th1 totale. La production de CXCL9, CXCL10 et CXCL11 typique de la polarisation M1 des M $\phi$  est dépendante de l'IFN $\gamma$  et du LPS (318). D'autres chimiokines comme CCL2, CCL3, CCL5 sont également sécrétées lors de l'activation classique des M $\phi$ . L'expression de certains récepteurs comme CCR1, CCR2 et CCR5 bloquant le recrutement de monocytes au niveau du site de l'inflammation est diminuée par les stimuli M1 (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ ) tandis que le récepteur CCR7 est considéré comme spécifique de la polarisation M1 (318, 343).

L'activation classique des M $\phi$  est également associée à une induction de l'expression de la cyclo-oxygénase-2 (Cox-2) une enzyme impliquée dans les processus inflammatoires qui permet la formation de prostaglandines à partir de l'acide arachidonique (343).

**En résumé, les M $\phi$  activés classiquement interviennent lors d'une réponse immunitaire à médiation cellulaire Th1 mais également lors d'une réponse innée sous l'effet de différents stimuli. Ces M $\phi$  M1 sont essentiels à la défense de l'hôte contre les pathogènes et les cellules tumorales.**

### *1.3.4.3. Les macrophages de type M2*

La polarisation M2 des M $\phi$  également désignée sous l'appellation « d'activation alternative » est initialement décrite comme une forme d'activation induite par des cytokines Th2 telles que l'IL-4 et l'IL-13 s'opposant à l'activation classique des M $\phi$ . Cependant, cet état d'activation alternatif n'est pas simplement inhibiteur de l'activation classique mais participe à l'élaboration de phénotypes fonctionnels propres (344). Rapidement, cette dénomination M2 s'est élargie et subdivisée en sous-groupe pour y inclure les autres phénotypes fonctionnels de M $\phi$ .

Afin de distinguer les différentes formes d'activation des M $\phi$  regroupés sous le terme générique M2, Alberto Mantovani et David M. Mosser ont proposé chacun une classification. Celle de Alberto Mantovani et ses collaborateurs (2004) (318) repose sur le stimulus d'activation des M $\phi$  et se subdivise en M2a, M2b et M2c. David M. Mosser et Justin P. Edwards (2008) (334) établissent une terminologie basée sur les fonctions fondamentales des M $\phi$  dans le maintien de l'homéostasie : les « wound-healing » M $\phi$  impliqués dans la cicatrisation tissulaire et les M $\phi$  « régulateurs » de la réponse immunitaire. Ces deux classifications sont complémentaires au niveau de la compréhension de la physiologie des M $\phi$  et peuvent se chevaucher à certains niveaux. **Les M $\phi$  M2a correspondant aux « wound-healing » M $\phi$  qui sont activés sous l'effet de l'IL-4 et/ou de l'IL-13 constituent l'activation alternative des M $\phi$  proprement dite. Les M $\phi$  M2b sont activés par la liaison de complexes immuns combinés aux ligands des TLR ou du récepteur à l'IL-1 (IL-1R) tandis que les M $\phi$  M2c acquièrent leur phénotype sous l'effet de l'IL-10 ou de glucocorticoïdes (Figure 23).** Les M $\phi$  M2b et M2c peuvent être regroupés sous le terme de M $\phi$  régulateurs caractérisés principalement par une sécrétion importante d'IL-10. Ces différents types de M $\phi$  possèdent cependant des caractéristiques communes comme leur faible capacité de production d'IL-12 (318, 334).

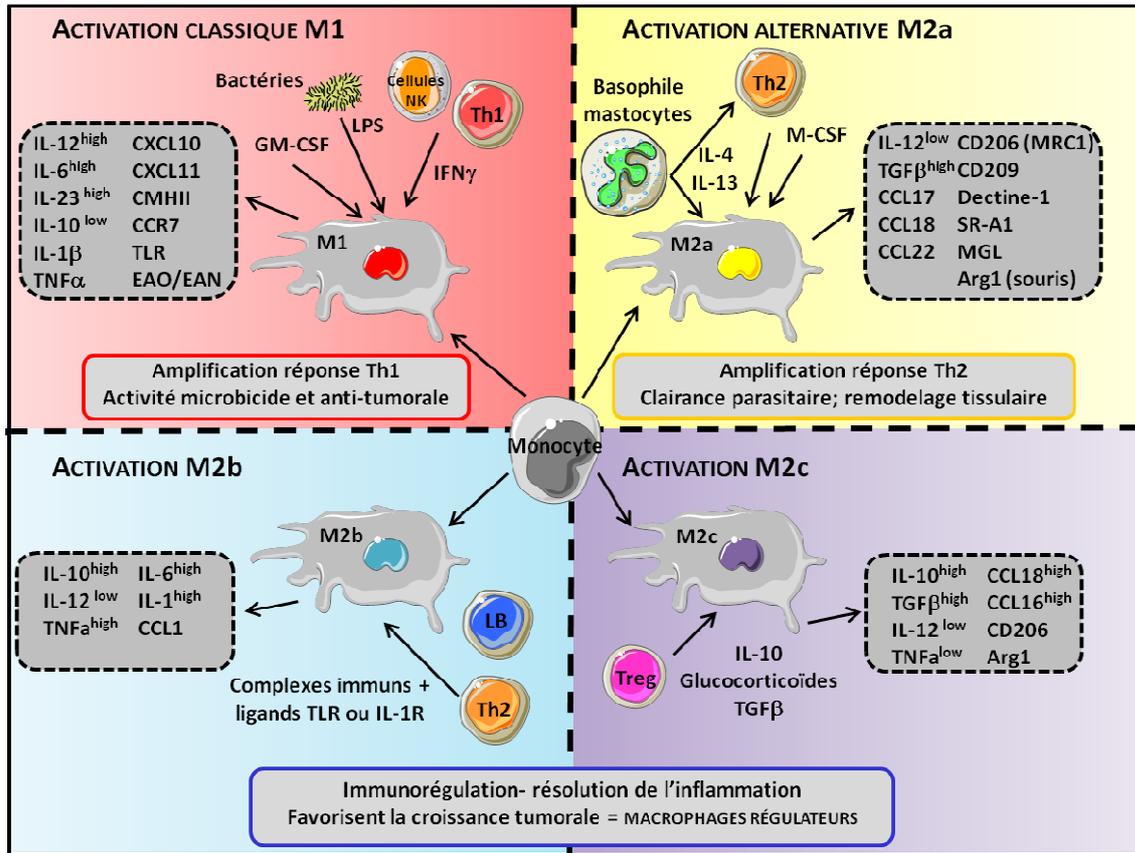


Figure 23: Les différentes formes d'activation des macrophages (M $\phi$ ). D'après (345, 346).

#### 1.3.4.3.1. Les M $\phi$ activés alternativement ou M2a

La découverte que l'IL-4 induisait le CMH de classe II et MRC1 dans les M $\phi$  a conduit à la définition originale de l'activation alternative (344). L'activation alternative des M $\phi$  est induite directement par l'IL-4 et l'IL-13, des cytokines produites lors de réponse immunitaire de type Th2 comme des épisodes allergiques ou des réactions cellulaires et humorales contre une infection parasitaire principalement contre les helminthes et les nématodes (347). D'autres cytokines, comme le M-CSF, l'IL-33 et l'IL-25 peuvent aussi contribuer indirectement à l'amplification de cette activation alternative (280, 343, 348, 340). L'IL-4 est produite par des cellules de l'immunité adaptative comme la sous-population Th2 de LT CD4<sup>+</sup> mais certaines cellules de l'immunité innée telles que les basophiles et les mastocytes constituent également une source importante d'IL-4 (Figure 23).

L'IL-4 et l'IL-13 possèdent de nombreuses activités similaires dans les M $\phi$ . Selon le type cellulaire, l'IL-4 se lie à la sous-unité alpha du récepteur à l'IL-4 (IL-4R $\alpha$ ) et recrute soit la chaîne IL-2R $\gamma$  pour former le récepteur de type I, soit la chaîne IL-13R $\alpha$ 1 formant le récepteur de type II (349). L'IL-13 peut également agir *via* le récepteur de type II en se liant à la sous unité IL-13-R $\alpha$ 1 et en

recrutant l'IL-4R $\alpha$  (350). La transduction intracellulaire de ces signaux est commune aux deux cytokines et comprend l'activation des membres de la famille JAK conduisant à la phosphorylation, la dimérisation et à la translocation nucléaire de STAT6 où il régule la transcription de gènes cibles. Le récepteur de type I est exprimé principalement dans les cellules d'origine hématopoïétique telles que les lymphocytes et les granulocytes, résultant de l'expression restreinte de la chaîne IL-2R $\gamma$ . Le récepteur à l'IL-4 de type II est essentiellement exprimé par des cellules d'origine non hématopoïétique comme les cellules épithéliales et les fibroblastes. Les M $\phi$  quant à eux, expriment les deux types de récepteurs.

**Les M $\phi$  activés alternativement présentent un phénotype associé à des fonctions anti-inflammatoires et de réparation tissulaire. Les M $\phi$  traités *in vitro* avec de l'IL-4 et/ou de l'IL13 possèdent : (i) une capacité de présentation de l'antigène aux LT réduite, (ii) produisent des quantités importantes de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 et sécrètent de faibles quantités de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, TNF $\alpha$ , IL-6, IL-12 et MIP1 $\alpha$ ) et enfin, (iii) présente une activité microbicide peu efficace due aux faibles niveaux d'EAO et d'EAN qu'ils produisent (351).** Ces caractéristiques concourent à réduire l'inflammation et la réponse de type Th1. Les M $\phi$  humains activés alternativement expriment également un répertoire spécifique de chimiokines comme CCL17, CC18 et CCL22 favorisant le recrutement de sous-population de LT exprimant le récepteur CCR4 comme les LT Th2 et les Treg sur le site de l'inflammation (352–354,322). La régulation de l'inflammation dans ces M $\phi$  dépend aussi de l'induction par l'IL-4 du récepteur à l'IL-27, une cytokine immunorégulatrice (347).

Parallèlement à son rôle dans l'inhibition de la réponse Th1, l'activation alternative des M $\phi$  est fortement associée à la réparation tissulaire. Ces M $\phi$  sont caractérisés par une augmentation du remodelage de la matrice extracellulaire (MEC) résultant de l'expression de protéines de la MEC comme la fibronectine ou la tenascin-C et de facteur pro-fibrosant comme le TGF- $\beta$  (347). De plus, l'activité de l'arginase 1 (arg1) est caractéristique chez la souris de l'activation alternative des M $\phi$  (347). L'IL-4 stimule l'expression de l'arg1 qui hydrolyse l'arginine en urée et L-ornithine utilisée pour produire des polyamines, molécules induisant la prolifération cellulaire ainsi que de la proline, un élément de base de la synthèse du collagène favorisant la réparation tissulaire. Les polyamines produites peuvent aussi exercer des effets immunorégulateurs indirects en influençant la production de cytokines et en inhibant l'expansion clonale des LT avoisinants (355). La présence de M $\phi$  activés alternativement est associée avec une importante vascularisation et une augmentation de l'angiogenèse (347).

Récemment, une étude chez la souris a montré que la polarisation alternative des M $\phi$  était impliquée dans la régulation de la thermogénèse adaptative, une fonction physiologique importante

(262). Les auteurs ont montré que l'exposition au froid favorisait l'activation M2a des M $\phi$  du tissu adipeux. Ces M $\phi$  présentaient une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans l'adaptation au froid, la mobilisation des acides gras, et la consommation d'énergie *via* un mécanisme dépendant de l'IL-4.

L'activation alternative des M $\phi$  induit de profondes modifications dans leur profil d'expression de PRR pouvant en retour affecter leur capacité d'endocytose et de phagocytose. L'expression du récepteur au mannose (MRC1), dont les fonctions ont été détaillé précédemment, est augmentée par l'IL-4 dans les M $\phi$  activés alternativement favorisant ainsi l'endocytose (344). En plus de MRC1, les M $\phi$  M2a expriment spécifiquement d'autres PRR impliqués dans la reconnaissance d'antigènes étrangers, comme le récepteur aux  $\beta$ -glucan dectin-1 ou le Macrophage galactose-type C-type lectin (MGL), qui reconnaît les antigènes glycosylés et les cellules cancéreuses (356–358).

Cependant, différentes études sur l'absorption de particules ont présenté des résultats contradictoires. Gratchev *et al.* (2005) (359) ont démontré par exemple que le traitement de M $\phi$  par l'IL-4 stimulait la phagocytose d'E.coli (opsonisée ou non) par rapport à l'IFN $\gamma$ , mais ne présentait aucune différence comparé aux M $\phi$  non activés. Une autre étude montre que la stimulation de M $\phi$  murins par l'IL-4 favorise la phagocytose et la destruction d'un parasite, le *Trypanosoma cruzi* (360) tandis qu'une autre étude montre que la voie IL-4/STAT6 limite la phagocytose de petites particules par les M $\phi$  (361). Par conséquent, les différents effets de l'activation alternative des M $\phi$  sur la phagocytose restent encore à clarifier.

**En résumé, les M $\phi$  activés alternativement ont un rôle homéostatique important en régulant des fonctions biologiques comme la thermogénèse adaptative et en favorisant la réparation tissulaire. Ils sont également des acteurs important du système immunitaire en favorisant la clairance de parasites comme les helminthes et leurs propriétés anti-inflammatoires limitent l'inflammation excessive lors de réponse de type Th1.**

#### *1.3.4.3.2. Les M $\phi$ régulateurs M2b et M2c*

Les M $\phi$  M2b activés en présence d'une combinaison de complexes immuns et d'agonistes de TLR ou de l'IL-1R, et les M $\phi$  M2c activés par des glucocorticoïdes ou l'IL-10, sont regroupés par David M. Mosser sous le terme de M $\phi$  régulateurs (318, 334) (**Figure 23**). Ces M $\phi$  régulateurs interviennent généralement lors des étapes tardives de la réponse immunitaire adaptative pour limiter la réaction immunitaire et l'inflammation. Ces deux sous-types de M $\phi$  partagent des caractéristiques communes comme la nécessité d'avoir deux stimuli pour induire leur activité anti-inflammatoire et principalement la production d'IL-10 (351). Le premier signal (complexes immuns, prostaglandines, cellules apoptotiques) n'a pas d'activité stimulatrice sur leur fonction, mais combiné avec le second (ligand de TLR), ceux-ci induisent la production d'IL-10 par ces M $\phi$ . Ces M $\phi$  sécrètent également de faible quantité d'IL-12 ; ils peuvent donc être caractérisés par un ratio IL-10/IL-12 élevé. Ces 2 types de M $\phi$  sont donc globalement associés à l'immunorégulation mais présentent cependant quelques différences phénotypiques.

Les M $\phi$  M2b, tout en conservant leur forte production d'IL-10, sont capables de produire des cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6 et TNF $\alpha$ ) après une exposition aux complexes immuns et au LPS (**Figure 23**). Malgré ce phénotype, ces M $\phi$  protègent les souris contre la toxicité du LPS. Ils expriment spécifiquement la chimiokine CCL1 qui favorise le recrutement d'éosinophiles, de LT Th2 et Treg *via* leur expression du récepteur CCR8, amplifiant ainsi une réponse de type Th2 et une immunorégulation. A l'inverse des autres types de M $\phi$  M2, les M $\phi$  M2b ne possèdent pas d'activité arg1 et ne sont pas impliqués dans le dépôt de matrice extracellulaire et le remodelage tissulaire (318, 334).

Les M $\phi$  M2c s'activent sous l'effet de glucocorticoïdes ou d'IL-10 et présentent plutôt un phénotype de M $\phi$  « désactivé » (**Figure 23**). Les glucocorticoïdes sont des hormones libérées par les cellules surrénales en réponse au stress et qui ont une activité anti-inflammatoire en bloquant l'expression de cytokines pro-inflammatoires dans les M $\phi$ . La production de TFG $\beta$ , une cytokine immunorégulatrice, par ces M $\phi$  peut également contribuer à leurs fonctions immunosuppressives. Le traitement des M $\phi$  avec des glucocorticoïdes limite aussi leur capacité à présenter l'antigène aux LT et favorise le développement de LT Th2 ou de Treg (334). Les M $\phi$  M2c possèdent des caractéristiques communes avec les M $\phi$  M2a comme une activité Arg1 chez la souris qui favorise le remodelage tissulaire et l'expression de chimiokines telles que CCL18 et CCL16 (318) (**Figure 23**). Ces chimiokines sécrétées par les M $\phi$  M2c induisent le recrutement de LT naïfs dans un environnement dominé par l'IL-10, conduisant au développement de LTreg et inhibant également la maturation des

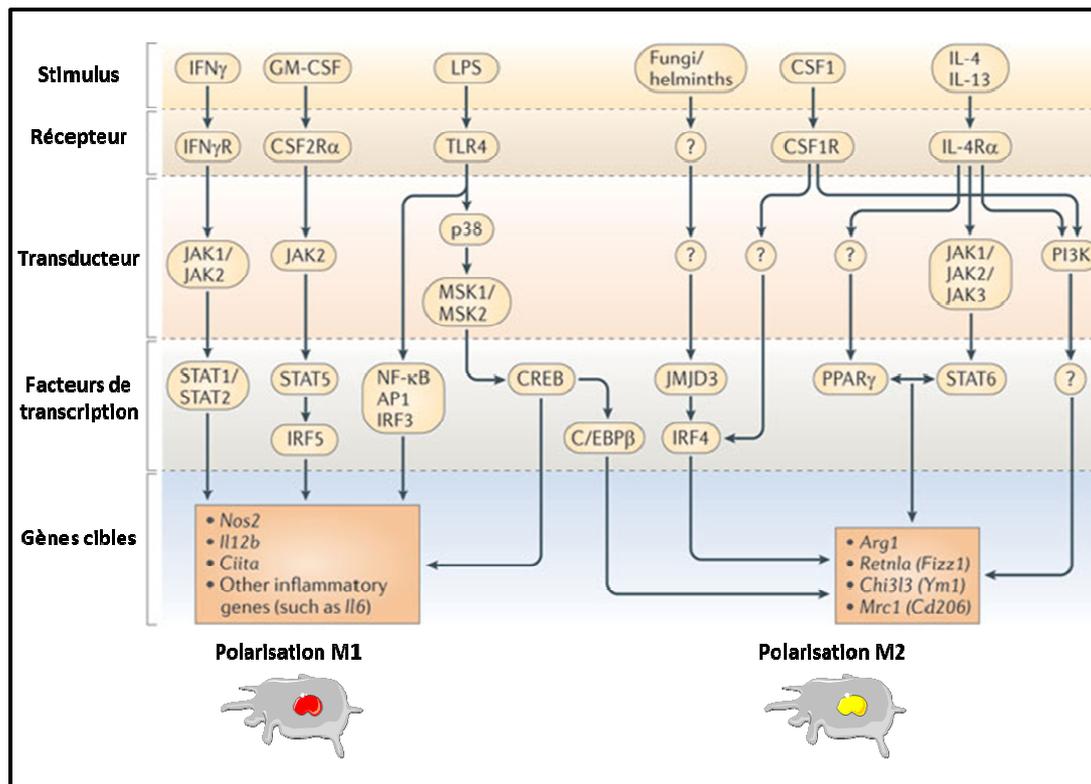
DC. Cet environnement favorise ainsi l'émergence d'un phénotype tolérogène et immunorépressur (318).

#### ***1.3.4.4. Régulation transcriptionnelle de la polarisation des M $\phi$***

Plusieurs facteurs de transcription tels que PU-1 contrôle la différenciation des monocytes en M $\phi$ . Dans ce cadre, d'autres facteurs de transcription sont induits en réponse aux signaux environnementaux contrôlant l'activation des M $\phi$ , dont les principaux sont résumés dans le schéma (Figure 24). Considérant l'ensemble des stimuli capables d'orienter la polarisation M1 des M $\phi$  (IFN $\gamma$ , GM-CSF, LPS), celle-ci est essentiellement contrôlée par les facteurs de transcription de la famille des STAT à savoir STAT1 et STAT2 lors d'une activation par l'IFN $\gamma$  et STAT5 dans le cas d'une stimulation par du GM-CSF. Certains acteurs de la famille des interferon regulatory factor (IRF) tels que IRF1, IRF5 et IRF8 régulent également l'activation M1 des M $\phi$  (362, 340, 363). Les facteurs NF- $\kappa$ B et les MAPK activées par une stimulation au LPS ont également un rôle important dans l'activation classique des M $\phi$ .

STAT6 apparaît comme le régulateur transcriptionnel majeur de l'activation alternative des M $\phi$  mais d'autres acteurs également activés en présence d'IL-4 et/ou d'IL-13, comme le peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) et IRF4 sont impliqués dans la polarisation des M $\phi$  vers un phénotype M2.

Généralement, l'engagement dans une voie de signalisation (M1 par exemple) a pour conséquence d'inhiber la voie opposée (M2) et réciproquement. Cette notion d'exclusion mutuelle des voies de signalisation supporte l'idée d'une « activation terminale » des M $\phi$ , notion qui est réévaluée et qui sera modulée dans le prochain paragraphe. Bien que la plupart de ces données soit extrapolable à l'Homme, il faut toutefois noter qu'une partie des résultats sur la régulation transcriptionnelle de l'activation des M $\phi$  ont été obtenues à partir de modèles murins. Une vigilance particulière doit donc être apportée considérant les différences qui existent entre les deux espèces.



**Figure 24: Les principales voies de signalisation contrôlant la polarisation M1/M2 des macrophages. D'après (363).** Un stimulus initial conduit à l'activation spécifique de facteurs de transcription contrôlant en aval les changements d'expression de gènes caractéristiques de l'état d'activation M1 ou M2 des macrophages. Arg1, arginase 1; C/EBP $\beta$ , CCAAT/enhancer-binding protein- $\beta$ ; Chi3l3, chitinase 3-like 3; Ciita, MHC class II transactivator; CREB, cAMP-responsive element-binding protein; CSF, colony-stimulating factor; IFN $\gamma$ , interféron- $\gamma$ ; IL, interleukin; IRF, interféron-régulateur; JAK, Janus kinase; LPS, lipopolysaccharide; Mrc1, macrophage mannose receptor 1; MSK, mitogen- and stress-activated kinase; NF- $\kappa$ B, nuclear factor- $\kappa$ B; Nos2, nitric oxide synthase 2; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; PPAR $\gamma$ , peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ ; Retnla, resistin-like- $\alpha$ ; STAT, signal transducer and activator of transcription; TLR4, Toll-like receptor 4.

#### 1.3.4.5. Limites du concept de polarisation M1/M2 des M $\phi$

À l'heure actuelle, la compréhension de la signalisation et du rôle des cytokines au niveau hématopoïétique à l'aide : de modèles expérimentaux génétiquement modifiés, d'analyses transcriptomiques et protéomiques, a considérablement fait évoluer la notion de polarisation M1/M2 vers un spectre beaucoup plus complexe, prenant en compte un plus large éventail d'agents immunomodulateurs et de fonctions trophiques. Ainsi, ce concept binaire M1/M2 commence à atteindre ses limites : *in vivo*, les M $\phi$  ne se regroupent pas dans des sous-populations clairement identifiées très distinctes en fonction d'un hypothétique état d'activation terminal déterminé *in vitro* mais forment plutôt un continuum composé de nombreux phénotypes où ces cellules exercent des fonctions aussi bien inflammatoire, réparatrice que régulatrice. Pour apporter un niveau supplémentaire de compréhension, Mosser a proposé une vision de la polarisation des M $\phi$  sous la forme d'une roue chromatique dont les frontières sont floues (Figure 25).

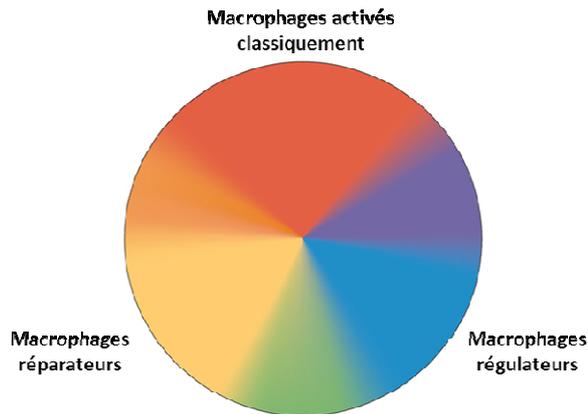


Figure 25: Le spectre chromatique de l'activation des macrophages. D'après (334).

Par ailleurs, à *contrario* des lymphocytes Th1 et Th2, les M $\phi$  ont la capacité remarquable de pouvoir évoluer entre plusieurs états d'activation. A titre d'exemple, les M $\phi$  M1 sont incapables d'induire l'expression de médiateurs pro-inflammatoires et sécrètent de l'IL-10 après une stimulation soutenue au LPS ou lors d'une stimulation ultérieure (de l'ordre de quelques heures) (364). Ce phénomène appelé « tolérance aux endotoxines » (365) implique une transition dynamique entre l'état d'activation M1 et celui de M2-like. Plusieurs études chez la souris montrent également que les M $\phi$  peuvent commuter d'un phénotype d'activation fonctionnel vers un autre en réponse à de nombreux signaux environnementaux : Hagemann et al. (2008) (366) montrent que l'inhibition de la voie NF- $\kappa$ B dans les M $\phi$  associés aux tumeurs (TAM, présentant un phénotype M2-like) leur confère une capacité tumoricide et les activent vers un phénotype M1; Kawanishi et al. (2010) (367) reportent dans un modèle de souris obèse que l'exercice physique atténue l'inflammation et favorise une transition des M $\phi$  d'un phénotype M1 vers un phénotype M2 (diminution de l'expression du TLR4 et augmentation de l'expression du CD163); Mylonas et al. (2009) (368) montrent que les M $\phi$  péritonéaux issus de souris infectés par des nématodes (dits activés alternativement) peuvent répondre classiquement au LPS et à l'IFN $\gamma$  en effectuant une ré-orientation des voies du métabolisme de l'arginine (diminution de l'activité arginase au profit de la iNOS et production de NO); selon Rutschman et al. (2001) (369), le traitement des M $\phi$  murins par de l'IL-4/IL-13 inhibe la production de NO induite par l'IFN $\gamma$ /LPS, suggérant que le métabolisme de l'arginine, marqueur de l'activation des M $\phi$  chez la souris peut être réorienté ; enfin, Stout et al. (2005) (370) montrent que le traitement séquentiel de M $\phi$  de souris avec différentes cytokines (IFN $\gamma$ , IL-12, IL-4, IL-10) et du LPS a pour conséquence une progression de ces cellules à travers différents états d'activation, démontrant ainsi que les M $\phi$  peuvent modifier de manière réversible les fonctions qu'elles expriment. Chez l'Homme,

Gratchev et al., (2006) (371) ont établi que les M $\phi$  M1 (activés par l'IFN $\gamma$ ) répondent à une activation alternative par l'IL-4 ou l'IL-10 en sécrétant des cytokines Th2 comme CCL18 et IL-1Ra et en augmentant leur capacité de phagocytose, tout en réduisant leur activité microbicide. Réciproquement, les auteurs montrent que les M $\phi$  M2 répondent à une activation classique en diminuant leur activité de phagocytose et en favorisant leur propriété bactéricide. Xu et al. (2013) (372) ont montré que l'exposition des M $\phi$  de type M1 (différenciés en présence de GM-CSF) au M-CSF aboutit à une re-différenciation de ces cellules en M $\phi$  de type M2-like et *vice-versa*. Ces données illustrent ainsi le concept d'adaptation fonctionnelle et de réversibilité du phénotype d'activation des M $\phi$  humains.

**L'ensemble de ces données, qui démontrent la modulation temporelle de l'état d'activation des M $\phi$ , ajoute un degré de complexité supplémentaire dans la caractérisation phénotypique des M $\phi$ . Comprendre comment les M $\phi$  adaptent en permanence leur phénotype en réponse aux changements environnementaux constitue une perspective attractive en termes de compréhension de leur rôle dans la pathogénèse de maladies et de ciblage thérapeutique.**

#### ***1.3.4.6. Rôles physiopathologiques des M $\phi$***

En résumé, les signaux innés et adaptatifs influencent la physiologie des M $\phi$ . Ces différents états d'activation participent aux processus homéostatiques, comme la réparation et le remodelage tissulaire, aussi bien qu'à la défense contre les pathogènes. Cependant, ces signaux de l'environnement peuvent déréguler l'activité de ces cellules hautement plastiques et contribuer au développement de nombreuses pathologies. Par exemple, les M $\phi$  M1 sont essentiels à la défense de l'hôte, mais leur activation doit être étroitement contrôlée car les cytokines et les médiateurs qu'ils produisent engendrent des dommages tissulaires importants. Ils peuvent notamment participer au développement de maladies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde ou encore les maladies inflammatoires de l'intestin (334). Leur activation inflammatoire soutenue prédispose également à la transformation néoplasique des tissus adjacents et influence le métabolisme du glucose en favorisant la résistance à l'insuline.

Les M $\phi$  M2a normalement impliqués dans la réparation tissulaire peuvent induire des processus de fibrose (373), exacerber des réponses allergiques et augmenter la susceptibilité de l'hôte à l'infection en limitant leur protection contre les pathogènes. De nombreuses études ont montré que les M $\phi$  associés aux tumeurs (TAM), qui supportent la croissance tumorale, ont un phénotype M2-like que l'on peut apparenter à celui des M $\phi$  régulateurs (remodelage de la MEC, stimulation de l'invasion

tumorale, des métastases, de l'angiogenèse, de la lymphangiogenèse et immunosuppression) (374). Les niveaux élevés d'IL-10 produits par ces M $\phi$  augmentent la susceptibilité de l'hôte à l'infection.

Par ailleurs, un nouveau phénotype de M $\phi$  « Mox » activés en réponse à des dommages tissulaires oxydatifs a été récemment identifié au niveau des plaques d'athérome (375). Ces M $\phi$  Mox possèdent un profil d'expression de gènes unique contrôlé par le facteur de transcription Nrf2 distinct de celui des M $\phi$  M1 et M2 ainsi qu'une plus faible activité phagocytaire et chimiotactique. Le phénotype de ces M $\phi$  Mox semble jouer un rôle important dans le développement de l'athérosclérose et d'autres maladies inflammatoires chroniques.

### *Conclusion*

**La caractérisation des M $\phi$  constitue un champ disciplinaire complexe qui tient à la grande diversité recouvrant le concept d'activation des macrophages. Les différentes approches de caractérisation disponibles (*in vitro* ; *ex et in vivo*) apportent chacune des informations importantes pour appréhender la réalité de la dynamique d'activation des macrophages.**

### *1.3.5. Immunotoxicité des DEP*

**Différentes études épidémiologiques ou expérimentales *in vivo* et *in vitro* montrent que l'exposition à la pollution particulaire atmosphérique augmente la susceptibilité aux infections bactériennes, mycobactériennes et virales.** L'exposition à la matière particulaire et notamment aux DEP favorise le développement de pneumonies, de tuberculose et de grippe (*Inflenza*) (174–178). L'exposition aux DEP augmente également l'incidence des rhumes chez l'enfant (179, 180). D'une manière générale, la diminution de la résistance des individus aux infections bactériennes et virales résulte principalement d'un développement accru des infections de la sphère respiratoire. L'augmentation de la prévalence des infections microbiennes, virales et parasitaires ainsi que des pathologies allergiques dans la population exposée résulte en grande partie des effets délétères des particules diesel sur le système immunitaire.

L'exposition aux DEP et plus généralement aux particules diminue la clairance microbienne au niveau pulmonaire. Une partie de cet effet est attribuable à l'altération de la fonction mucociliaire et à la diminution de la phagocytose par les M $\phi$ . Plus largement, de nombreuses études expérimentales *in vivo* et *in vitro* établissent un effet immunotoxique des particules diesel. Ce mélange possède des effets doubles aussi bien pro-inflammatoires que immunosuppresseurs vis-à-vis de nombreuses cellules de l'immunité comme les M $\phi$  principalement mais aussi au niveau des cellules dendritiques et des lymphocytes. Cette exposition altère ainsi la capacité de ces cellules à promouvoir une réponse immunitaire adaptée de type Th1 ou Th2, ce qui favorise au final, à la fois la prolifération de pathogènes en diminuant la résistance aux infections et augmente simultanément la sensibilisation aux pathologies allergiques.

#### ***1.2.4.2. DEP et lymphocytes T (LT)***

L'effet des DEP sur les lymphocytes et plus particulièrement sur les LT est surtout étudié dans le contexte de pathologies allergiques telles que l'asthme. Comme précédemment évoqué, l'exposition aux DEP augmente l'incidence de l'asthme en favorisant notamment des exacerbations chez les sujets atteints. L'asthme se caractérise par une inflammation chronique réversible des voies aériennes ainsi que par la production de mucus induite par un allergène, entraînant une obstruction et une hyper-réactivité de ces voies respiratoires. L'asthme allergique peut être assimilé à une maladie de type Th2 car on observe généralement dans cette pathologie des niveaux accrus d'éosinophiles et de cytokines induisant une réponse immunitaire de type Th2 (IL-4, IL-5 et IL-13). Une série d'études expérimentales sur modèles animaux et modèles cellulaires humains montre un effet adjuvant des DEP sur la réponse allergique conduisant à une orientation de la réponse immunitaire vers un profil de type

Th2 (181–184). Ainsi, la coexposition DEP et allergène augmente la production locale et systémique d'IgE spécifiques de l'allergène et de cytokines Th2 comme l'IL-4 comparé à l'exposition à l'allergène seul chez des patients atteints d'asthme ou dans des modèles de souris sensibilisées (184–187). La stimulation *ex vivo* de LT par des DEP induit leur activation chez les patients asthmatiques et non chez les sujets sains. Dans ces conditions expérimentales, les DEP induisent l'expression de marqueurs d'activation lymphocytaire comme le CD25 et le CD69, diminuent le ratio IFN $\gamma$ /IL-4 en augmentant plus largement la synthèse d'IL-4 par les LT et favorisent leur prolifération (183). Les effets immunotoxiques des DEP vis-à-vis des LT ont également été démontrés avec des cellules humaines de sujets sains exposées et stimulées *in vitro* à l'aide de billes anti-CD3/anti-CD28 mimant l'engagement du TCR (184, 188). La production de cytokines produites par ces cellules telles que l'Interféron gamma (IFN $\gamma$ ) et IL-10 est diminuée tandis que celle de l'IL-4 et l'IL-5 n'est pas affectée. Les DEP diminueraient donc la réponse immunitaire de type Th1 *in vitro* (diminution de l'expression d'IFN $\gamma$ ) et favoriseraient un profil de type Th2. L'utilisation de la NAC un thiol précurseur du glutathion ayant des propriétés antioxydantes, reverse cette diminution d'expression d'IFN $\gamma$  par les LT activés exposés aux DEP, suggérant un rôle du stress oxydant dans ces effets (184, 188).

Les DEP pourraient également induire des modifications épigénétiques influençant l'orientation de la réponse immunitaire vers un profil Th2 et plus particulièrement la production d'IgE. En effet, une étude montre que l'exposition chronique aux DEP induit une hyperméthylation de plusieurs sites CpG du promoteur de l'IFN $\gamma$  ainsi qu'une hypométhylation du promoteur de l'IL-4 dans les LT CD4<sup>+</sup> de souris sensibilisées avec un allergène (*Aspergillus fumigatus*). De plus, ces changements sont en corrélation avec l'augmentation du taux sérique d'IgE (182).

De nouvelles données suggèrent un rôle de la réponse immunitaire de type Th17 dans l'exacerbation de l'asthme (189, 190). Des études récentes ont montré que les PM induisaient l'augmentation de l'expression d'IL-17A (191, 192). Brandt *et al.*, (2013) (181) démontrent dans ce contexte que les DEP favorisent l'accumulation de LT régulateurs (LTreg) et de LT de type Th17 dans les poumons de souris simultanément exposées à un allergène (acariens) et augmentent l'hyperréactivité des voies respiratoires par rapport à l'exposition à l'allergène seul. Cette coexposition génère une réponse mixte de type Th2/Th17 avec des cellules produisant de l'IL-17 et de l'IL-13, une cytokine de type Th2. La neutralisation de l'IL-17A par un anticorps diminue l'hyperréactivité bronchique induite par les DEP suggérant un rôle des lymphocytes de type Th17 dans l'exacerbation de l'asthme dans le cadre de cette exposition. Des taux sériques plus élevés d'IL-17A ont également été mesurés chez des enfants asthmatiques exposés aux DEP (181). Une récente étude chez des souris montre que ces effets des DEP sur la polarisation Th17 des lymphocytes dépendraient de l'activation d'Ahr (193).

**Au final, les DEP semblent altérer plus particulièrement la physiologie des LT CD4<sup>+</sup> car des expériences de déplétion des LT CD4<sup>+</sup> à l'aide d'anticorps anti-CD4 chez la souris abroge l'effet adjuvant des DEP notamment au niveau de la production d'IgE et d'IgG1 (194).** Néanmoins, l'exposition aux DEP de souris déplétées des LT CD8<sup>+</sup> module la synthèse de cytokines impliquées dans la réponse immunitaire Th1 telles que L'INF $\gamma$ , IL-12 le GM-CSF et atténue l'effet adjuvant des DEP au niveau de la production IgG3.

### ***1.2.4.3. DEP et cellules dendritiques (DC)***

Les cellules dendritiques (DC) jouent un rôle clef dans l'élaboration et l'orientation de la réponse immunitaire adaptative. Ces cellules sont des CPA professionnelles et sont présentes abondamment dans les voies aériennes à proximité des cellules épithéliales pulmonaires (195). Les DC présentes ou recrutées rapidement au niveau pulmonaire agissent comme des sentinelles du système immunitaire en déterminant la réponse aux agents inhalés tels que les allergènes, les polluants ou les bactéries. L'orientation de la réponse immunitaire adaptative des LT à un antigène spécifique dépend de l'état de maturation des DC et des signaux de polarisation (cytokines notamment) exprimés par celles-ci (196). Les DC favorisent la sensibilisation aux néoallergènes et sont impliquées dans l'induction et la persistance d'une réponse immune de type Th2 induite par des allergènes dans les poumons de souris (197, 198). Les DC pourraient alors être le lien entre rôle adjuvant des DEP face aux allergènes et élaboration d'une réponse immunitaire de type Th2 conduisant à l'exacerbation de pathologies allergiques. Des études montrent une accumulation et une maturation des DC dans les poumons de souris exposées aux DEP. Cette exposition augmente aussi la migration des DC dans ganglions lymphatiques médiastinaux et favorise ainsi la réponse des LT (199). Des expériences élaborées avec des modèles de souris déficientes en récepteurs aux chimiokines CCR2, CCR5 et CCR6 démontrent que ce recrutement de DC au niveau pulmonaire dans les souris exposées aux DEP est complètement aboli en absence de CCR2. Ce déficit de recrutement conduit à une diminution de l'expression de cytokine de type Th2 (IL-4, IL-13) et d'IL-10 induites par les DEP dans les ganglions médiastinaux de souris déficientes en CCR2 comparées aux souris sauvages (200). Ainsi ces données suggèrent que le recrutement des DC dépendant de CCR2 lors d'une exposition aux DEP est crucial dans l'induction d'une réponse de type Th2.

Le rôle adjuvant des DEP pourrait donc résulter d'une action directe de ce mélange sur la physiologie des DC. Bien que les DEP seules ne semblent pas impacter la maturation phénotypique et fonctionnelle des DC (201, 202), elles sont en revanche capables de moduler la réponse des DC à des signaux de maturation tels que le lipopolysaccharide (LPS), l'IFN $\gamma$ , le CD40 Ligand. En effet, une série d'étude tend à prouver que l'exposition des DC aux DEP stimule leur maturation phénotypique et fonctionnelle induite par divers agents. Porter *et al.*,(2007) (203) et Williams *et al.*,(2006) (204) reportent notamment une augmentation de l'expression de molécules de costimulation comme le CMH de classe II, le CD40, le CD80, le CD86 et du marqueur phénotypique de maturation le CD83 par les DC exposées aux DEP au cours de leur maturation. Des études *in vitro* sur cellules humaines ou murines montrent que l'exposition des DC aux DEP favorise également leur maturation fonctionnelle: dans des expériences de réactions allogéniques, les DC exposées induisent un profil cytokinique de type Th2 en stimulant la sécrétion d'IL-13, une cytokine de type Th2 et/ou en inhibant la sécrétion d'IFN $\gamma$ , une cytokine de type Th1 par des LT (184, 203–205). Les DEP peuvent également réprimer la

sécrétion d'IL-12p70 par les DC elles-mêmes, une cytokine impliquée dans l'orientation Th1 de la réponse immunitaire (184, 205).

**Ainsi, la répression de la sécrétion de cytokines de type Th1 combinée à la préservation et/ou la stimulation de la sécrétion de cytokines de type Th2 dans l'axe DC/LT, déséquilibre la réponse immunitaire en faveur d'un profil allergique de type Th2.**

Les mécanismes moléculaires expliquant ces effets directs sur la physiologie des DC impliquent la génération d'un stress oxydant par les DEP qui perturbe l'activation de voies de signalisation. En effet, Chan *et al.*, (2006) (205) montrent que les DEP ainsi que ses constituants organiques inhibent l'activation de la voie NF- $\kappa$ B dépendante des TLR conduisant à la diminution de la production d'IL-12 par les DC exposées. Cette perturbation de la fonction des DC est due à l'activation par les DEP du facteur de transcription Nrf2 contrôlant l'homéostasie redox intracellulaire.

Une étude montre que les DEP modulent sensiblement l'action des ligands de TLR2 et TLR4 sur l'expression des récepteurs scavengers LoX-1 et SR-B1 (206), suggérant que ces derniers peuvent participer à la modulation de la fonction des DC par les DEP.

En plus de leurs effets immunotoxiques directs sur les DC, les DEP peuvent exercer un rôle adjuvant indirect sur la maturation des DC et moduler ainsi leur microenvironnement cellulaire en ciblant notamment les cellules épithéliales pulmonaires. L'exposition de ces cellules pulmonaires aux DEP induit la sécrétion d'un facteur de croissance, le granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) et d'une cytokine la thymic stromal lymphopoietin (TSLP). L'expression du marqueur de maturation CD83 à la surface des DC et la prolifération des LT sont stimulés par ces facteurs solubles résultant en la maturation phénotypique et fonctionnelle des DC vers un profil Th2. Ces effets sur les cellules pulmonaires sont dépendants d'un stress oxydant puisqu'ils sont reversés par l'utilisation de la NAC (201, 207).

D'autres cellules de l'immunité qui concourent à l'exacerbation d'une réponse allergique de type asthmatique semblent également impactées par une exposition aux DEP. Différentes études montrent ainsi que les DEP combinés à un allergène sont capables de potentialiser la libération d'histamine et la dégranulation des mastocytes murins et humains de sujets allergiques (208). Ces extraits organiques en absence d'allergène activent également les basophiles aussi bien de sujets sains qu'allergiques en stimulant leur sécrétion d'IL-4 et d'histamine. L'utilisation d'un antioxydant précurseur du glutathion abolit cette sécrétion impliquant le stress oxydant dans ces effets (209).

#### ***1.2.4.4. DEP et monocytes/macrophages (M $\phi$ )***

Comme les DC, le M $\phi$  a la capacité de présenter l'antigène aux LT. Bien qu'il joue avant tout un rôle primordial dans les défenses immunitaires innées, le M $\phi$  est également un acteur cellulaire important dans la coordination des deux types de réponse immunitaire (innée et adaptative) qui sont des événements interdépendants au niveau immunologique. Le M $\phi$  alvéolaire, présent au niveau du poumon constitue la première ligne de défense contre les infections pulmonaires. Il participe en effet à l'élimination d'agents pathogènes tels que les bactéries et les particules inhalées par sa capacité de phagocytose. Au moins trois propriétés des M $\phi$  participent à la destruction des pathogènes, à savoir la production de cytokines inflammatoires, d'espèces activées de l'oxygène (EAO) et de l'azote (EAN) et d'agents antiviraux tels que l'interféron (210–212). Les DEP et plus spécifiquement les composés organiques adsorbés sur les particules altèrent toutes ces fonctions du M $\phi$  et concourent à la plus grande susceptibilité aux infections pulmonaires des populations exposées (213). Des études *ex-vivo* réalisées chez l'Homme, le rat et la souris montrent ainsi une diminution des capacités de phagocytoses de bactéries, de champignons ou de particules inertes par les M $\phi$  alvéolaires exposés aux DEP (214–216). Cette diminution de capacité de phagocytose par les DEP est accompagnée dans le cas d'études avec des bactéries d'une baisse de l'activité microbicide des M $\phi$ . Ces effets peuvent en partie résulter de modifications du cytosquelette, l'exposition de M $\phi$  de chien aux DEP entraîne notamment une augmentation de la rigidité du cytosquelette engendrant une perte de mobilité du phagosome intracellulaire (217). Il n'existe pas à l'heure actuelle d'étude concernant l'effet des DEP sur les petites GTPases qui contrôlent le mouvement du cytosquelette d'actine.

L'expression des récepteurs impliqués dans la phagocytose à la surface des M $\phi$  et des monocytes circulants humains tels que les CD11b, le CD11c, le CD86 et le CD14 est diminuée lors d'une exposition aux DEP (218, 219). Cette diminution pourrait altérer la capacité des phagocytes à lier des pathogènes opsonisés. Le CD14, un corécepteur du LPS interagit avec la signalisation dépendante du TLR4. La perte du CD14 par les M $\phi$  et les monocytes exposés aux DEP peut altérer cette signalisation importante lors des phénomènes de phagocytose. La baisse de l'activité de phagocytose par les M $\phi$  exposés aux DEP peut également résulter de phénomènes indirects. Une étude montre que l'IFN $\gamma$ , une cytokine qui stimule la phagocytose est produite en plus faible quantité par les LT de rat infectés par *Listeria monocytogenes* et exposés aux DEP (215).

Par ailleurs, les DEP et plus généralement les PM stimulent directement la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, le TNF $\alpha$ , le GM-CSF et de chimiokines comme l'IL-8, MIP1 $\alpha$  (Macrophage inflammatory protein 1 alpha ou CCL3) et RANTES (ou CCL5) par les M $\phi$  alvéolaires de sujets sains et de souris stimulés *ex vivo* (220–222). Cependant, les PM<sub>2,5</sub> largement représentées par les DEP induisent la sécrétion *in vitro* d'IL-6, de MIP1 $\alpha$ , de TNF $\alpha$  □par

les M $\phi$  de façon moins importante comparées aux PM<sub>10</sub> (220, 223). Cette différence tient au fait que les PM<sub>10</sub> contiennent plus de composants microbiens comme des endotoxines qui s'y adsorbent préférentiellement comparées aux PM<sub>2,5</sub> (224). En effet, l'inhibition directe ou indirecte des endotoxines (*via* la voie des TLR4 et de ces co-récepteurs) réduit la production de cytokines pro-inflammatoires par les M $\phi$  exposés aux particules (222). Il faut noter que les DEP contiennent de très faibles doses d'endotoxines, insuffisantes pour stimuler directement la production de cytokines pro-inflammatoires. Une étude sur des souris déficientes en NADPH oxydase ou en iNOS montre des niveaux plus faibles d'IL-6 et de MIP2 en réponse aux particules urbaines comparés aux souris sauvages (225). Le potentiel redox des DEP pourrait alors expliquer cette production accrue de cytokines pro-inflammatoires.

En plus de leur effet inflammatoire propre, les DEP et principalement les composés organiques qu'elles contiennent ont également des propriétés immunosuppressives sur les M $\phi$ . L'exposition *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo* de M $\phi$  humains, de rat, ou de souris aux DEP diminue leur capacité de réponse à différents stimulus (LPS, IFN $\gamma$ , bactéries) en inhibant leur sécrétion de cytokines inflammatoires telles que l'IL-1 $\beta$ , le TNF $\alpha$ , l'IL-12 ou encore l'IL-8 (179,215,219,226–228). L'exposition de rats aux DEP inhibe aussi la production *ex vivo* d'EAO par les M $\phi$  alvéolaires stimulés par un composé fongique, le zymosan (179). **Ces effets suppresseurs, majoritairement médiés par la fraction organique des DEP, peuvent ainsi être associés à une diminution du potentiel antimicrobien des M $\phi$  exposés aux particules conduisant à une moins grande résistance à l'infection pulmonaire.**

L'exposition chronique aux DEP a également de nombreux effets délétères sur l'infiltration de monocytes au niveau pulmonaire. Les monocytes circulants dans le sang peuvent être recrutés sur les sites inflammatoires comme les parois alvéolaires et se différencier en M $\phi$  résidents. Dans un modèle d'exposition chronique de souris aux DEP, le nombre de M $\phi$  alvéolaires recrutés à partir de monocytes circulants augmentent (167). Des études montrent en effet, que l'exposition aux particules (PM<sub>10</sub>) stimule le renouvellement des monocytes dans la moelle osseuse et accélère leur libération dans la circulation sanguine *via* la production accrue de facteurs comme le GM-CSF et l'IL-6 (220, 227, 229–232). Une étude reporte que ces monocytes nouvellement libérés et recrutés sont préférentiellement séquestrés au niveau des capillaires pulmonaires et migrent moins efficacement au niveau des sites inflammatoires. Cette accumulation favorise les dommages tissulaires au sein de l'espace vasculaire (231). En parallèle, Chaudhuri *et al.*, (2012) (219) ont récemment montré que l'exposition chronique à de faibles concentrations de DEP (3  $\mu$ g/ml) altère la différenciation des monocytes humains en M $\phi$ . Les DEP induisent notamment (i) une diminution du nombre de M $\phi$  après 14 jours de différenciation, (ii) une diminution de l'expression de marqueurs phénotypiques des M $\phi$  (CD14, CD86, CD11b) (iii)

ainsi qu'une diminution de la sécrétion d'IL-8 après stimulation des M $\phi$  dérivés des monocytes par des agonistes de TLR.

Notre équipe a également montré que le B(a)P un HAP fortement représenté dans la fraction organique des DEP altère le phénotype et la fonctionnalité des M $\phi$  primaires humains. Le B(a)P inhibe la différenciation des monocytes en M $\phi$  en diminuant l'expression de marqueurs macrophagiques comme le CD71 et le CD64, mais aussi la capacité d'endocytose et de phagocytose ainsi que la production de TNF $\alpha$  des M $\phi$  exposés (233). Le B(a)P induit également l'expression et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 $\beta$ , le TNF $\alpha$  et l'IL-8 par les M $\phi$  humains exposés dans un modèle *in vitro* en culture primaire (89, 234). Par ailleurs, dans ce même modèle, le B(a)P diminue l'expression d'une protéine Niemann Pick type C1 (NPC1) responsable du trafic endo-lysosomal des lipides. Cette diminution favorise l'acquisition d'un phénotype spumeux des M $\phi$  avec l'accumulation de lipides intracellulaires (235). Ce phénomène peut contribuer au développement et à l'aggravation de l'athérosclérose par l'exposition aux DEP. Les mécanismes moléculaires impliqués dans ces effets semblent dépendre de plusieurs éléments comme le stress oxydant, l'altération de voies de signalisation cellulaire ou l'activation d'AhR par les HAP. Dans le même ordre d'idée, une étude a montré récemment dans un modèle de souris ApoE<sup>-/-</sup> exposées à des PM<sub>2.5</sub> une accumulation d'une forme oxydée du cholestérol, le 7-kétocholestérol dans les M $\phi$  par un mécanisme dépendant de l'expression de CD36. Cette accumulation favorise l'apparition d'un phénotype spumeux dans ces cellules et la progression de l'athérosclérose (236).

### *Conclusion*

**Les DEP ont un impact toxique sur la physiologie de l'ensemble des cellules du système immunitaire ce qui favorise le développement et l'aggravation de nombreuses pathologies associées à leur exposition. Leur pouvoir adjuvant stimule de façon inappropriée les cellules de l'immunité adaptative provoquant alors une mauvaise orientation de la réponse immunitaire vers un profil allergique de type Th2. Elles exercent également des effets pro-inflammatoires sur les cellules pulmonaires et les M $\phi$  notamment en favorisant la sécrétion de médiateurs et de cytokines pro-inflammatoires. En parallèle, l'exposition aux DEP et notamment à sa composante organique a un effet immunosuppresseur principalement sur les M $\phi$ . En effet, leurs fonctions biologiques comme la phagocytose, la sécrétion de cytokines en réponse à un stimulus microbien et la production d'EAO sont diminuées augmentant ainsi la susceptibilité aux infections inhérentes à une telle exposition.**



## I. OBJECTIFS DES TRAVAUX DE RECHERCHE

---

Les particules de type diesel sont des contaminants majeurs de l'environnement, classées en 2012 comme substance cancérigène avérée pour l'Homme par le centre internationale de recherches sur le cancer. En plus de leur effet sur l'augmentation de l'incidence des cancers, ces particules ont un potentiel immunotoxique double à la fois pro-inflammatoire et/ou immunosuppresseur en fonction du contexte qui peut contribuer au développement de nombreuses pathologies de type respiratoire et cardiovasculaire comme l'asthme ou l'athérosclérose.

Les M $\phi$  sont des cellules immunitaires plastiques qui peuvent s'activer en fonction de leur microenvironnement. Ces cellules sont des cibles privilégiées pour l'étude des effets toxiques des polluants de type diesel en considérant :

- (1) Leur répartition dans l'organisme au sein de tous les tissus cibles des particules.
- (2) Leur fonctions clefs dans la défense contre les pathogènes et le contrôle de l'homéostasie.
- (3) Leur sensibilité aux HAP et aux agents oxydants par le biais de l'expression d'AhR et de Nrf2.
- (4) Leur contribution à l'exacerbation des pathologies associées à l'exposition aux particules.

Bien que de nombreuses études aient exploré l'effet des particules diesel sur les M $\phi$ , les questions suivantes n'ont jamais été abordées :

- Les particules diesel perturbent-elles l'acquisition des phénotypes d'activation M1 ou M2 des M $\phi$  humains ? L'exposition aux particules diesel favorise-t-elle une commutation d'un phénotype d'activation vers un autre ? Si oui, dans quelle mesure ?
- Les propriétés fonctionnelles spécifiques des M $\phi$  activés M1 et M2 sont-elles altérées par une exposition à ces polluants ? Si oui, quelles en sont les conséquences ?

Dans un premier temps, nous avons travaillé à développer et caractériser au sein de notre laboratoire des modèles pertinents de M $\phi$  humains polarisés pour les utiliser comme modèles d'études toxicologiques *in vitro*. Les différents modèles établis ont fait l'objet d'une publication (376) et ont permis de caractériser plus précisément le phénotype de polarisation des M $\phi$  humains et de pointer notamment des différences avec les études portant sur les modèles murins.

La seconde partie du travail a consisté à étudier l'impact des DEPe sur le profil de polarisation génique et phénotypique des M $\phi$  et sur leurs fonctions associées (sécrétion de médiateurs inflammatoires, orientation de la réponse immunitaire, chimiotactisme, endocytose). Nous avons également étudié plus en détail les mécanismes moléculaires contrôlant les effets géniques des DEPe mis en évidence et en particulier l'implication de 2 facteurs de transcription AhR et Nrf2. Ce travail est sur le point d'être publié (Jaguin et al., 2015).

La troisième partie avait pour objectif d'identifier de nouvelles cibles géniques des particules diesel au cours de la polarisation des M $\phi$ . A l'aide d'une RT-PCR array, nous avons ainsi pu mettre en évidence plusieurs cibles impactées par les DEPe, dont une qui a particulièrement retenu notre attention, PDGF-B. Notre troisième étude s'est donc attachée à démontrer que le PDGF-B est une cible génique induite par les DEPe dans les M $\phi$  humains activés aussi bien M1 que M2 *via* un mécanisme transcriptionnel dépendant d'AhR, et que cette surexpression favorise la prolifération de cellules fibroblastiques pulmonaires humaines (Jaguin et al., soumis).

## II. TRAVAUX DE RECHERCHE PERSONNELS

---

### III.1. Article 1:

#### **Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin.**

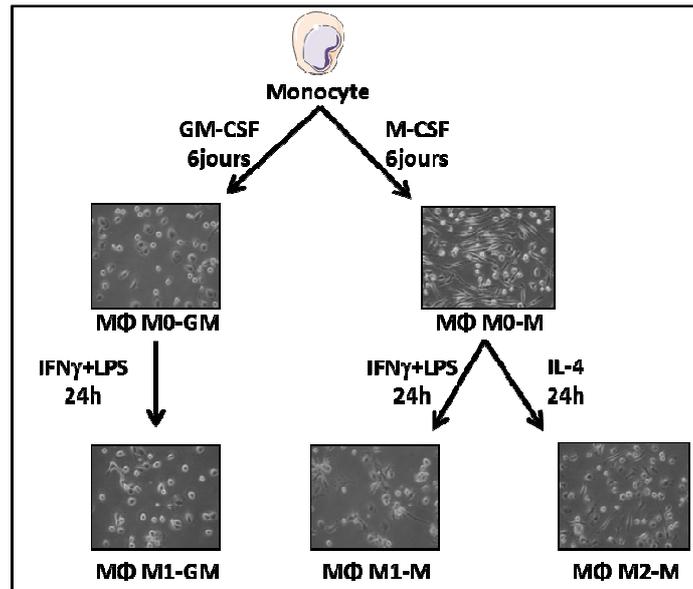
Marie Jaguin, Noémie Houlbert, Olivier Fardel and Valérie Lecureur

*Cellular Immunology* (2013) 281 : 51–61

##### *III.1.1. Contexte de l'étude*

Nous avons vu la place prépondérante qu'occupent les M $\phi$  dans l'établissement de réponses inflammatoires et immunitaires (aussi bien innées qu'adaptatives) lors d'agression par des microorganismes pathogènes ou encore des agents exogènes. Nous avons également détaillé la grande hétérogénéité phénotypique et l'extrême plasticité de ces cellules du système phagocyte mononuclé. Cette diversité de phénotypes d'activation des M $\phi$  conduisant aux profils de polarisation M1 (classiquement activés) et M2 (alternativement activés) a essentiellement été décrite dans des modèles murins. Cette caractérisation bien établie au niveau de marqueurs phénotypiques de polarisation doit cependant être modulée en tenant compte des différences qui existent entre les modèles cellulaires murins et humains : ainsi de nombreux marqueurs communément admis pour spécifier les différentes sous-populations de M $\phi$  chez la souris ne sont pas extrapolables à l'Homme et réciproquement. **Dans ce contexte, les M $\phi$  humains requièrent une caractérisation plus approfondie de leurs marqueurs géniques et phénotypiques de polarisation.**

Nous avons donc choisi d'établir des modèles cellulaires de M $\phi$  humains polarisés en culture primaire à partir de monocytes du sang de donneurs sains (**Figure 26**). Ces monocytes sont différenciés en M $\phi$  au moyen de M-CSF ou de GM-CSF pendant 6 jours puis activés pendant 24 heures : soit en M $\phi$  de type M1 par une combinaison d'IFN $\gamma$  et de LPS, soit en M $\phi$  de type M2 sous l'action de l'IL-4 pour les M $\phi$  différenciés au M-CSF. À l'issue de ces traitements, nous obtenons 5 populations de M $\phi$  : les M $\phi$  non polarisés M0-M et M0-GM, les M $\phi$  activés classiquement M1-M ou M1-GM et les M $\phi$  activés alternativement M2-M.



**Figure 26: Schéma du protocole de polarisation des macrophages (Mφ).** Les monocytes sont obtenus après isolation des leucocytes à partir de concentrés leuco-plaquettaires de donneurs sains. Les monocytes sont mis en présence de GM-CSF ou de M-CSF pendant 6 jours pour obtenir des macrophages primaires différenciés M0-GM et M0-M respectivement. Pour la polarisation M1, les macrophages M0-GM et M0-M sont exposés à de l'IFN $\gamma$  et du LPS pendant 24 h supplémentaires pour obtenir des macrophages M1-GM et M1-M respectivement. Les macrophages M2-M sont obtenus après exposition des macrophages M0-M à de l'IL-4 pendant 24 h supplémentaires.

**L'établissement de ces différents modèles cellulaires nous a permis de comparer :**

- (i) L'expression des marqueurs phénotypiques membranaires
- (ii) L'expression de marqueurs géniques incluant les cytokines, les chimiokines, les récepteurs scavengers et les facteurs de transcription
- (iii) La sécrétion de cytokines et chimiokines caractéristiques de l'activation M1 ou M2 des Mφ
- (iv) Les différences phénotypiques et géniques qui existent entre les Mφ M1-M et M1-GM

**En conclusion, nous avons montré dans cette étude comparative que les Mφ différenciés au M-CSF sont capables de s'activer classiquement en Mφ M1 après stimulation à l'IFN $\gamma$  et au LPS. De plus, les marqueurs M1 et M2 que nous avons identifiés dans nos modèles cellulaires humains au cours de cette étude constituent des outils importants pour identifier plus précisément les populations de Mφ humains, en particulier au niveau tissulaire afin de mieux appréhender leurs rôles physiopathologiques.**



## Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin

Marie Jaguin<sup>a</sup>, Noémie Houlbert<sup>a</sup>, Olivier Fardel<sup>a,b</sup>, Valérie Lecureur<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> UMR INSERM U1085, Institut de Recherche sur la Santé, l'Environnement et le Travail (IRSET), Université de Rennes 1, 2 avenue du Pr Léon Bernard, 35043 Rennes cedex, France

<sup>b</sup> Pôle Biologie, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Rennes, 2 rue Henri Le Guilloux, 35033 Rennes cedex, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 24 October 2012

Accepted 24 January 2013

Available online 4 February 2013

#### Keywords:

Macrophage

Polarization

Markers

Cytokine/chemokine

Transcription factors

M-CSF

### ABSTRACT

Monocytes/macrophages (MΦ), considered as plastic cells, can differentiate into either a pro-inflammatory (M1) subtype, also known as a classically activated subtype, or an anti-inflammatory alternatively activated subtype (M2) according to their microenvironment. Phenotypic markers of mouse polarized MΦ have been extensively studied, whereas their human counterparts remain less characterized. The main goal of this study was therefore to carefully characterize phenotypic and genomic markers of primary human MΦ generated from M-CSF-treated blood monocytes and polarized towards M1 or M2 subtype upon the action of lipopolysaccharide and interferon- $\gamma$  (for M1) or interleukin (IL)-4 (for M2). Membrane expression of the markers CD80 and CD200R was found to be specific of human M1 and M2 polarized MΦ, respectively, whereas, by contrast, mannose receptor (CD206) expression did not discriminate between M1 and M2. mRNA expression analysis further identified six markers of M1 polarization (IL-12p35, CXCL10, CXCL11, CCL5, CCR7 and IDO1), five markers of M2 polarization (TGF- $\beta$ , CCL14, CCL22, SR-B1 and PPAR $\gamma$ ) and transcription factors involved in MΦ polarization. Ability of human M-CSF-generated MΦ to polarize toward M1 or M2 subtype was also associated with enhanced secretion of TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12p40, CXCL10 and IL-10 (for M1) or CCL22 (for M2). Moreover, the comparison of the expression of M1 markers in M-CSF- and GM-CSF-MΦ polarized towards M1 subtype has revealed similarities. In conclusion, we demonstrated that human M-CSF MΦ can polarize toward a M1 type after IFN $\gamma$ /LPS stimulation. Moreover, the M1 and M2 markers of human polarized MΦ identified in the present study may be useful to better identify human MΦ subtypes, particularly at the tissue level, in order to better understand their respective roles in the development of pathologies.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Macrophages (MΦ) play a crucial role in innate and adaptive immunity in response to microorganisms and are major mediators of the inflammatory response. Their phenotypic heterogeneity is now well-recognized and has been demonstrated to depend on micro-environment, especially in relation to growth factors and cytokines. Among these factors, granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) and macrophage colony stimulating factor (M-CSF) are major ones, notably implicated in the differentiation of MΦ from monocytes. GM-CSF- and M-CSF-generated MΦ share some common recognition patterns, but also differently express some gene markers [1,2]. Another level of heterogeneity between MΦ is related to their activation/polarization status. MΦ can be activated by the classical way, initiated by the toll-like receptor (TLR) activation in the presence or not of interferon (IFN) $\gamma$ , and leading to the M1 subtype, or by the alternative way,

usually triggered by the presence of T-helper (Th)2 cytokines such as IL-4 or IL-13, resulting in M2a subtype. In addition, immune complexes, IL-10 or glucocorticoids are also known to generate M2 (b or c) MΦ [3]. M1-MΦ produce high levels of pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor (TNF $\alpha$ ) or interleukin (IL)-12/23 and are associated to T-helper (Th)1-type immune response. In contrast, M2-MΦ are more efficient producers of anti-inflammatory cytokines such as transforming growth factor (TGF- $\beta$ ) and chemokines (CCL17 and CCL22) and have been associated with Th2-type immune response [4].

Knowing that the polarization profiles of macrophages have essentially been characterized in cultured mouse cells and that they can differ between mouse and human [5,6], an extensive M1/M2 characterization of human MΦ is still required. Moreover, the nature of the growth factor used for getting MΦ from monocytes, i.e. GM-CSF or M-CSF, may influence their ability to polarize into a specific subtype; mouse GM-CSF- and M-CSF-derived MΦ have been thus hypothesized to be pre-orientated to M1 and M2 subtypes, respectively [7,8], suggesting therefore that MΦ from M-CSF origin, for example, cannot really polarized toward M1. In

\* Corresponding author. Fax: +33 2 23 23 47 94.

E-mail address: [valerie.lecureur@univ-rennes1.fr](mailto:valerie.lecureur@univ-rennes1.fr) (V. Lecureur).

humans, this observation was essentially based on the incapacity of M-CSF M $\Phi$  to secrete the cytokines IL-12 and IL-23p19 in response to LPS stimulation [9]. To gain insights about these points, i.e., the precise characterization of M1/M2 markers in human M $\Phi$  and the ability or not of human M-CSF-M $\Phi$  to polarize towards a M1 subtype, we have carefully analyzed expression of various established markers of macrophagic polarization in human M-CSF-generated M $\Phi$  cultured in M1 (treatment by IFN $\gamma$ /LPS) or M2 (treatment by IL-4) conditions in the present study.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals and reagents

Human recombinant IL-4 and IFN $\gamma$  were purchased from Peprotech (Neuilly sur Seine, France), GM-CSF were provided by Berlex laboratories Inc. (Bayer, France), whereas human M-CSF was obtained from Miltenyi Biotec SAS (Paris, France). Lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia Coli* (serotype: 055: B5) was obtained from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO).

### 2.2. Monocyte isolation, differentiation and polarization of human macrophages

Monocytes were purified from peripheral blood mononuclear cells obtained from blood buffy coats (provided by Etablissement Français du Sang, Rennes, France), as previously described [10]. Monocytes were then differentiated in M $\Phi$  by GM-CSF (400 IU/ml) (named unpolarized M0-GM M $\Phi$ ) or by M-CSF (50 ng/ml) (named unpolarized M0-M M $\Phi$ ) for 6 days in RPMI 1640 medium (Gibco) supplemented with 2 mM glutamine, 10% de complemented fetal calf serum (FCS), 100 IU/ml penicillin and 100  $\mu$ g/ml streptomycin. For M1 polarization experiments, M0-GM and M0-M M $\Phi$  were next exposed to a fresh medium supplemented with 5% FCS and containing LPS (100 ng/ml) + IFN $\gamma$  (20 ng/ml) for additional 24 h. For M2 polarization experiments, M0-M M $\Phi$  were exposed to a fresh medium supplemented with 5% FCS and containing M-CSF (10 ng/ml) + IL-4 (20 ng/ml) for additional 24 h [11]. The experiments were done in accordance with the World Medical Association declaration of Helsinki [12].

### 2.3. Flow cytometry

Phenotypic analysis of M $\Phi$  was performed using flow cytometric direct immunofluorescence. Cells rinsed in phosphate-buffered saline (PBS) were recovered from culture plates by scrapping. They were first incubated for 1 h in PBS with 5% human AB serum at 4 °C to avoid nonspecific mAb binding. Several mouse mAbs (provided by Becton Dickinson Biosciences, Le Pont de Claix, France) were then used for immunolabelling: APC-conjugated mAbs against CD71, FITC-conjugated mAbs against CD80, PE-Cy5-conjugated mAbs against CD206 and a mouse PE-conjugated mAbs against CD200R from eBiosciences SAS (Paris, France). Isotypic control labeling was performed in parallel. Thereafter, cells were analysed with a FC500 flow cytometer (Beckman Coulter, Villepinte, France) using CXP Analysis software (Beckman Coulter). Values were expressed as the ratio of the mean fluorescence intensity (MFI) of the marker of interest over the MFI of the isotype control.

### 2.4. RNA isolation and reverse transcription-real time quantitative PCR analysis

Total RNA were isolated from primary M $\Phi$  using the TRIzol method (In vitrogen) and were then subjected to reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) analysis as

previously described [13]. Gene-specific primers, presented in the Table 1, are intron-spanning and purchased from Sigma or as Quantitect<sup>®</sup> (QT) primer assay from Qiagen. Amplification curves of the PCR products were analyzed with the ABI Prism SDS software using the comparative cycle threshold method. Relative quantification of the steady-state target mRNA levels was calculated after normalization of the total amount of cDNA tested to an 18S RNA endogenous reference.

### 2.5. Quantification of cytokines levels

Levels of TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12p40, IL-10, CCL2, CCL22, CCL17 and CXCL10 secreted in culture medium were quantified by ELISA using specific Duoset ELISA development system kits (R&D Systems).

### 2.6. Statistical analysis

All independent experiments were repeated at least four times. Data are expressed as means  $\pm$  SEM. Significant differences were evaluated using a Student's *t*-test or ANOVA followed by the Neuman–Keuls post hoc test when multiple comparisons were studied. The criterion of significance was \**p* < 0.05 and \*\**p* < 0.01.

## 3. Results

### 3.1. Membrane marker expression in human unpolarized and polarized M-CSF-derived M $\Phi$

Human monocytes cultured for 6 days in the presence of M-CSF give unpolarized M0-M M $\Phi$ , that are adherent and have a fusiform/fibroblastic appearance (Supplementary Data 1), as previously described [14]. After 24 h of polarization in M1 type conditions (Addition of IFN $\gamma$ /LPS) or in M2 type conditions (Addition of IL-4), we observed by microscopy that resulting M1-M and M2-M M $\Phi$  kept their appearance of spindle but M1-M M $\Phi$ , in contrast to M2-M M $\Phi$ , seem to cluster (Supplementary Data 1).

Expression of phenotypic surface markers was next analyzed by flow cytometry. M1-M M $\Phi$  displayed a significant up-regulation of the co-stimulatory molecule CD80 as compared to their unpolarized counterparts M0-M M $\Phi$  (Fig. 1A); this CD80 expression seems specific of M1-M $\Phi$  because it was significantly different from that of M2 M $\Phi$  (Fig. 1A). In contrast to mouse M $\Phi$  [15], we did not observe any difference for mannose receptor CD206 expression between human M-CSF polarized M $\Phi$  subtypes (Fig. 1B). By contrast, the expression of CD200R, which has inhibitory effects on M $\Phi$  function after binding to its CD200 ligand, was significantly up-regulated by IL-4 in M2-M M $\Phi$  when compared to unpolarized M0-M or polarized M1-M M $\Phi$  (Fig. 1C) [16].

### 3.2. mRNA expression of markers in human unpolarized and polarized M-CSF-derived M $\Phi$

Analysis of mRNA expression of some genes described as subtype M1 and M2 markers in mouse and/or human M $\Phi$  [15] was performed by quantitative PCR after 24 h of polarization in order to analyze the levels of mRNA and protein of a larger number of markers for the same time-course instead of adding a second time of mRNA analysis.

First, we analyzed the mRNA expression of 12 genes rather described as M1 markers, including some cytokines and chemokines like IL-12p70 and IL-23, which are composed of two subunits, a common p40 subunit and either a p35 or a p19 subunit, respectively. Our results showed a significant induction of IL-12p35, CXCL10, CXCL11, CCL5, CCR7, indoleamine 2,3-dioxygenase 1

**Table 1**  
Primers used for real-time PCR.

Gene	Name	Forward primer	Reverse primer
18S	ARN 18S	5'-CGCCGCTAGAGGTGAAATTC	5'-TTGGCAAATGCTTTCGCTC
CCL2	CC chemokine type 2	5'-AGTCTCTGCCCCCTTCT	5'-GTGACTGGGGCATTGATTG
CCL5	CC chemokine type 5	5'-AGCCATTCGCCCTTAGAAAGC	5'-CTGCCCTGCACAGTTACAAA
CCL14	CC chemokine type 14	5'-CCATTCCCTTCTTCTCTC	5'-GACGCGGGATCTGTAGGTA
CCL17	CC chemokine type 17	5'-AGCCATTCGCCCTTAGAAAGC	5'-CTGCCCTGCACAGTTACAAA
CCL22	CC chemokine type 22	5'-ATTACGTCGGTACCGTCTG	5'-TAGGCTCTCATTGGCTCAG
CCR7	C–C chemokine receptor type 7	5'-GTGGTGGCTCTCTTGTGTCAT	5'-TGTGGTGTGTCTCCGATGT
CD36	Cluster of differentiation 36	5'-AGATGCAGCCTCATTCCAC	5'-GCCTTGGATGGAAAGAACAAA
CHIT-1	Chitinase-1	QT00035399	
CHI3L-1	Chitinase-3-like protein 1	5'-GATAGCCTCCAACACCCAGA	5'-AATTCCGGCTTCATTTCCTT
CXCL10	CXC chemokine type 10	5'-CCACGTGTGAGATCATTGGC	5'-TTCTTGATGGCTTCGATTTC
CXCL11	CXC chemokine type 11	5'-CCTGGGGTAAAGCAGTGAA	5'-TGGGATTTAGGCATCGTTGT
Egr1	Early growth response protein 1	QT00999964	
Egr2	Early growth response protein 2	QT00000924	
HO-1	Heme Oxygenase 1	5'-ACTTTCAGAAAGGGCCAGGT	5'-TTGTTGCGCTCAATCTCCT
IDO1	Indoleamine 2,3-dioxygenase 1	5'-GCGCTGTGGAAATAGCTTC	5'-CAGGACGTCAAAGCACTGAA
IL-10	Interleukin-10	5'-CCTGGAGGAGGTGATGCCCA	5'-CCTGCTCCACGGCCTTGCTC
IL-12p35	Interleukin-12 p35	5'-GATGGCCCTGTCCTTAGTA	5'-TCAAGGGAGGATTTTGTGG
IL-12p40	Interleukin-12 p40	5'-CTCGGCAGGTGGAGGTGAGC	5'-TTGCGGCAGATGACCGTGGC
IL1-RA	interleukin-1 receptor antagonist	5'-GGAATCCATGGAGGGAAGAT	5'-TCTCGCTCAGTCACTGATG
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 beta	5'-GGGCTCAAGGAAAAGAATC	5'-TTCTGCTTGAGAGGTGCTGA
IL-23p19	Interleukin-23 p19	5'-ATTTTCACAGGGGAGCCTTC	5'-GACTGAGGCTTGAATCTGC
IRF1	Interferon regulatory factor 1	5'-ACCCTGGCTAGAGATGCAGA	5'-CTTCCATGGGATCTGGAAGA
IRF3	Interferon regulatory factor 3	5'-AAGAAGGTTGCGTTTAGCA	5'-TCCCAACTCTGAGTTCAC
IRF4	Interferon regulatory factor 4	QT00065716	
IRF5	Interferon regulatory factor 5	5'-CTTTTGGTGCAGGAGAGGAG	5'-GGCCACTTGACATCTCTGT
IRF7	Interferon regulatory factor 7	5'-CCCCATCTTCGACTTCAGAG	5'-CGAAGCCCAGGTAGATGGTA
IRF8	Interferon regulatory factor 8	5'-CCAGGACTGATTTGGGAGAA	5'-ACTGCCAGGCCTTAAAAAT
klf4	Kruppel-like factor 4	5'-CCACACAGGTTGAGAAACCT	5'-ATGTGTAAGCCGAGGTGGTC
MRC1	Mannose receptor C type 1	5'-GGCGGTGACCTCACAAGTAT	5'-ACGAAGCCATTGGTAAACG
NFkB p65 (RelA)	Nuclear factor kappa B p65 (RelA)	5'-TCTGCTTCCAGGTGACAGTG	5'-ATCTTGAGCTCGGCAGTGT
NFkB-p50	Nuclear factor kappa B p50	5'-TGGAGCTCTGGGAAGGATTTG	5'-CGAAGCTGACAAACACAGA
PPAR $\gamma$	Peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$	5'-TTCAGAAATGCCTTGCACTG	5'-CCAACAGCTTCTCTCTCG
RelB	Nuclear factor kappa B (RelB)	QT00038640	
SR-B1	Scavenger receptor B1	5'-GTGTGGGTGAGATCATGTGG	5'-GTTCCACTTGTCCACGAGGT
TGF $\beta$	Transforming growth factor beta	5'-TGGCTGTGAGATCTTCAAA	5'-GGGCTAGTCGCACAGAACT
TNF $\alpha$	Tumor necrosis factor alpha	5'-AACCTCTCTCTGCCATC	5'-ATGTTCTGCTCTCTCACA

(IDO1) mRNA expression in M1-M M $\Phi$  comparatively to M0-M and M2-M M $\Phi$  (Fig. 2). In addition, the mRNA expression of IL-12p40 and IL-23p19 tended to be higher in M1-M M $\Phi$  than in M0-M M $\Phi$  (Fig. 2) whereas the mRNA expression of chitinase-1 (CHIT-1) was significantly decreased in M2-M M $\Phi$  (Fig. 2). By contrast, the mRNA expression of TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and CCL2 was not altered during M1 polarization when compared to unpolarized or polarized M2-M M $\Phi$  (Fig. 2).

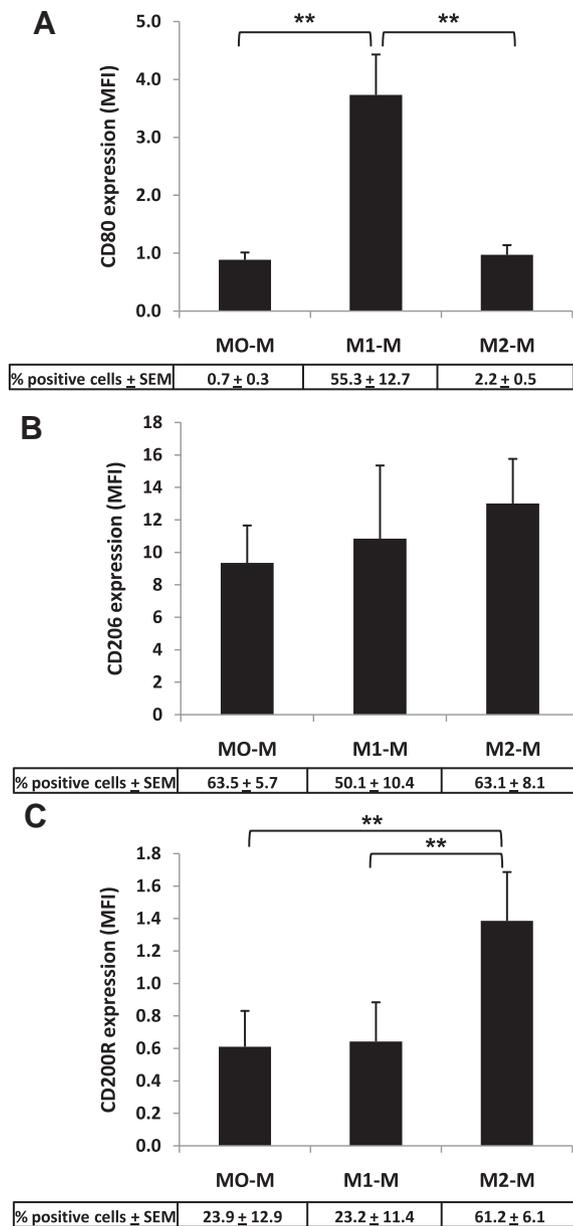
Secondly, we analyzed the mRNA expression of 12 markers previously described as M2 markers, including some cytokines, chemokines and scavengers receptors. We observed that the mRNA expression of TGF- $\beta$ , SRB-1, peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ), CCL22 and CCL14 was significantly higher in M2-M M $\Phi$  than in M0-M (Fig. 3); however, as CCL14 mRNA level was also significantly induced in M1-M M $\Phi$ , we cannot consider it as a convenient M2 marker (Fig. 3). Some genes such as IL-10, CCL17, MRC1, heme-oxygenase-1 (HO-1) and IL-1 receptor antagonist (IL-1RA) were not significantly up-regulated by M2 polarization when compared to parental M0-M M $\Phi$  (Fig. 3). By contrast, a significant increase of IL-1RA mRNA level in M1-M was observed whereas it is usually considered as a M2 marker [15,17]. And a significant decrease of Chitinase-1 (CHIT-1) (Fig. 2) and chitinase-3-like-1 (CHI3L-1) (Fig. 3) mRNA levels in M2-M was in accordance with Di Rosa et al. [18].

Overall, we identified 6 M1 (IL-12p35, CXCL10, CXCL11, CCL5, CCR7 and IDO1) and 5 M2 (TGF- $\beta$ , CCL14, CCL22, SRB-1 and PPAR $\gamma$ ) polarization markers which were significantly up-regulated, respectively in M1 and M2 polarized M $\Phi$  when compared to unpolarized M $\Phi$  from M-CSF origin. Moreover, as some M2 markers, like

TGF- $\beta$ , SRB-1, MRC1, HO-1 and CD36 genes, exhibit decreased expressions in the presence of IFN $\gamma$ /LPS, we finally identified 14 genes which are significantly and differently expressed between M1-M and M2-M M $\Phi$ . Thus, the mRNA expression of IL-12p35, CXCL10, CXCL11, CCL5, CCR7, IDO1 and CHIT3L1 is significantly higher in M1 M $\Phi$  when compared to M2 M $\Phi$ , whereas that of TGF- $\beta$ , MRC1, SRB-1, PPAR $\gamma$ , HO-1, CCL22 and CD36 is significantly higher in M2 M $\Phi$  when compared to M1 M $\Phi$ .

### 3.3. mRNA expression of transcription factors in human unpolarized and polarized M-CSF-derived M $\Phi$

In order to better characterize the polarization of human M-CSF-generated M $\Phi$ , we next analyzed the mRNA expression levels of some transcription factors known to be involved in M $\Phi$  polarization such as Interferon Regulatory Factor (IRF) [19] and NF- $\kappa$ B members [20,21]. We observed a significant mRNA induction of IRF1, IRF3, IRF4, IRF7, RelA, RelB, NF- $\kappa$ B p50 and kruppel-like factor 4 (klf4), known as a regulator of M2 M $\Phi$  polarization [22], in M1-M M $\Phi$  when compared to their respective M0-M M $\Phi$  (Fig. 4). By contrast, none of the 12 transcription factors studied was induced in M2-M M $\Phi$  when compared to M0-M M $\Phi$  (Fig. 4). IRF5, IRF8 and Egr1 mRNA expression levels were also not modified by M1 activation (Fig. 4). Finally, because a down-expression of early growth response protein 2 (Egr2) occurred in M1-M M $\Phi$ , we identified 8 transcription factors which were differentially expressed between M1 and M2 M $\Phi$ ; we can thus consider IRF1, IRF3, IRF7, RelA, RelB, NF- $\kappa$ B p50 and klf4 as M1 markers, whereas Egr2 could be a M2 marker.



**Fig. 1.** Expression of cell surface antigens before and after polarization of human MΦ. Six-day cultured M-CSF MΦ were activated or not (M0-M) with IFN $\gamma$ /LPS or with IL-4 for additional 24 h to obtain M1-M and M2-M MΦ, respectively. Cells were then stained with conjugated mAbs directed against the surface markers CD80 (A), CD206 (B) and CD200R (C) and then analyzed by flow cytometry. Histograms represent the means of MFI ratio  $\pm$  SEM of at least six independent experiments. \*\* $p < 0.01$ .

#### 3.4. Cytokine/chemokine secretion in human unpolarized and polarized M-CSF-derived MΦ

The lack of significant mRNA induction of some M1 markers in M1-M MΦ could depend on the time of the analysis of mRNA. Therefore, we analyzed the secretion of some cytokines/chemokines which can accumulate in the supernatant of culture medium, after 24 h of polarization of M-CSF-MΦ. First, we observed a significant increase of secretion levels for TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12p40 and CXCL10 in M1-M MΦ when compared to M0-M MΦ or M2-M MΦ (Fig. 5), showing that, in contrast to previous report [9], human MΦ from M-CSF origin can respond properly to IFN $\gamma$ /LPS by secreting pro-inflammatory cytokines and chemokines. A significant induction of the anti-inflammatory cytokine IL-10 was also found

in M1-M MΦ (Fig. 5). A significant increase of CCL22 secretion and a tendency to increase for CCL17 secretion were observed in M2-M MΦ when compared to unpolarized MΦ (Fig. 5). By contrast, the secretion level of CCL2 was not modified during the polarization of MΦ (Fig. 5). Overall, the levels of cytokine/chemokine secretion which are significantly different in M1 and M2 polarized M-CSF MΦ concern those of TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12p40, IL-10, CXCL10 and CCL22 whereas that of CCL17 tends to differ (Fig. 5).

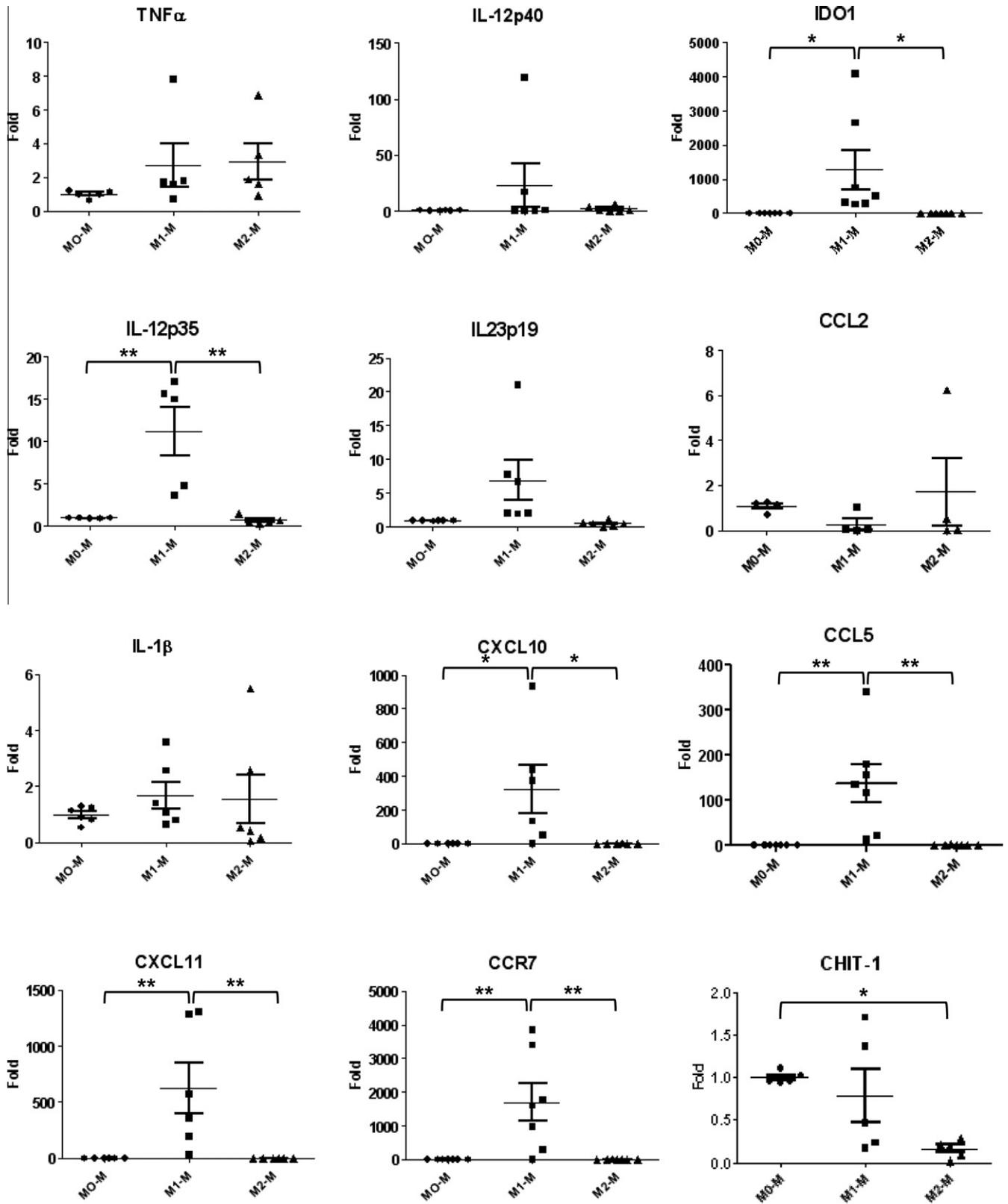
#### 3.5. Comparison of M1 expression marker in M1 polarized M-CSF- and GM-CSF-MΦ

Based mainly on expression on certain cytokines, MΦ from GM-CSF origins have been considered as pro-M1/M1 cells [9]. As we demonstrated above that MΦ from M-CSF origin can also polarize towards a M1 subtype, i.e., they acquire expression of M1 markers, we were next interested by comparing M1 markers in M-CSF- and GM-CSF-MΦ polarized towards M1 subtype in response to IFN $\gamma$ /LPS. First, the expression level of the co-stimulatory molecule CD80 and the percentage of CD80-positive cells were quite similar in M1-GM and M1-M MΦ (Fig. 6A). Second, mRNA expressions of the M1-M markers IL-12p35, CXCL10, CXCL11, CCL5, CCR7 and IDO1 were also found similar in both M1-M and M1-GM MΦ (Supplementary data 2). In the same way, mRNA levels of various transcription factors, previously shown to be increased during M1 polarization (Fig. 4), did not statistically differ between M1-M and M1-GM MΦ (Supplementary data 3). By contrast, mRNA levels of the M1 markers TNF $\alpha$  and IL-23p19 were significantly lower in M1-M MΦ than in GM-CSF-generated counterparts (Fig. 6B); TNF $\alpha$  secretion was also reduced in supernatant from M1-M MΦ when compared to M1-GM MΦ, even if the difference did not reach a statistical significance (Fig. 6C). M1-GM MΦ also exhibited enhanced secretion of IL-1 $\beta$  and IL-12p40 when compared to M1-M MΦ (Fig. 6C). By contrast, IL-10 secretion was found higher in M1-M than in M1-GM MΦ, whereas no difference was observed for the secretion of CXCL10 (Fig. 6C).

## 4. Discussion

Macrophages (MΦ) are plastic cells whose physiological functions are at least in part dependent of their origin and their micro-environment. The classically activated MΦ (M1 subtype) are considered as pro-inflammatory, whereas the alternatively activated MΦ (M2 subtype) are considered as anti-inflammatory and involved in tissue repair. In this study, we have determined the level of mRNA and protein expression of some polarization markers and, by this way, we better characterized the primary culture model of human M-CSF polarized MΦ. Moreover, we reinforced the notion that mouse and human MΦ are distinct with respect to expression levels of some markers of polarization.

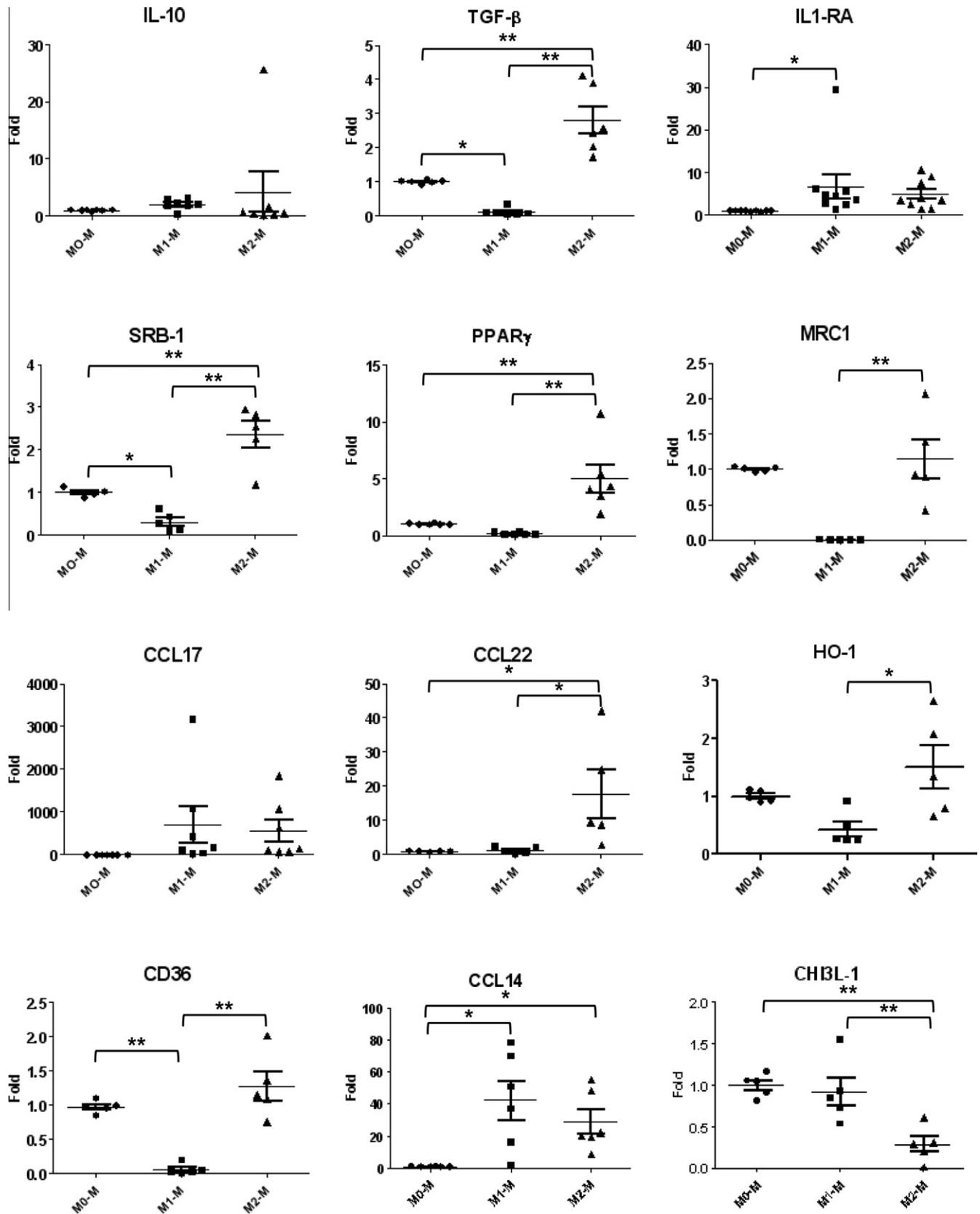
Beside the characterization of phenotypic markers, identification of specific gene markers of type M1 or M2 polarization in human MΦ is necessary but was still insufficient. It is extremely important to well characterize MΦ from M-CSF origin because of the ubiquitously expression of this growth factor but also in order to better understand their role in tumor growth as they are recognized as close to tumor associated macrophages [23]. Some of genes that we found differentially expressed between M1 and M2 M-CSF MΦ, in particular those well-induced in M1 MΦ (CXCL10, CXCL11, CCL5, CCR7 and IDO1), were previously identified as M1 markers [11]; in contrast to previous study [9], we observed a higher secretion of the cytokines TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-12p40 and of the chemokine CXCL10 in M1-M MΦ than in unpolarized M0-M MΦ and in M2-M MΦ. As expected, a significant induction of mRNA expression of TGF- $\beta$ , CCL22 and of the scavenger receptors CD36 and SRB-1 [15] was observed in M2



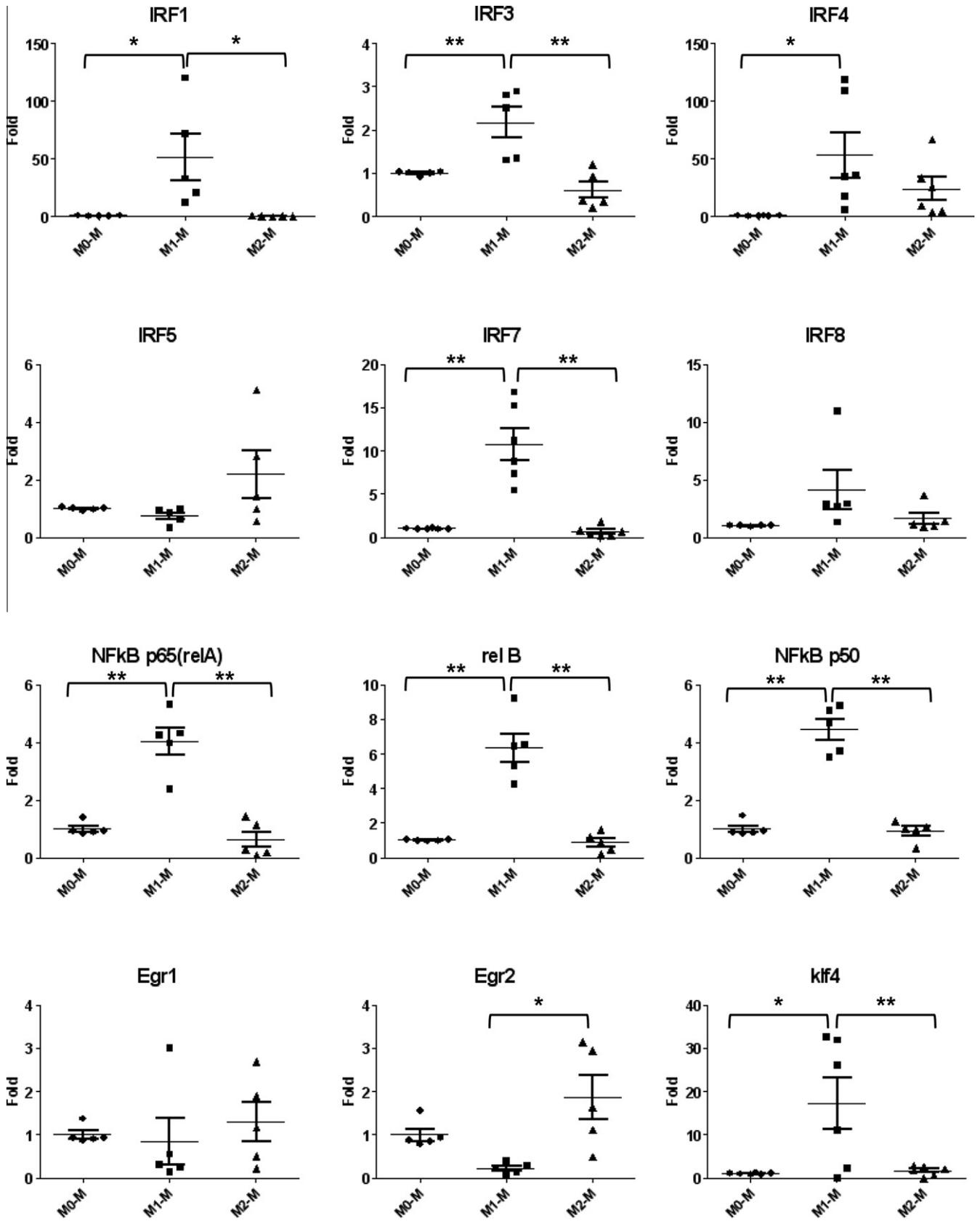
**Fig. 2.** mRNA expression of putative M1 polarization markers in M-CSF MΦ before and after polarization. Six-day cultured M-CSF (M0-M) MΦ were activated or not with IFN $\gamma$ /LPS or with IL-4 for additional 24 h to obtain M1-M and M2-M MΦ, respectively. Cells were harvested and after total RNA isolation, mRNA levels were determined by RT-qPCR assays. Data are expressed relatively to mRNA levels found in M0-M, arbitrarily set at the value of 1, and are the means  $\pm$  SEM of at least five independent experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

when compared to M1 polarized MΦ; by contrast the absence of M2 specificity for IL-1RA expression can be explained by the fact that

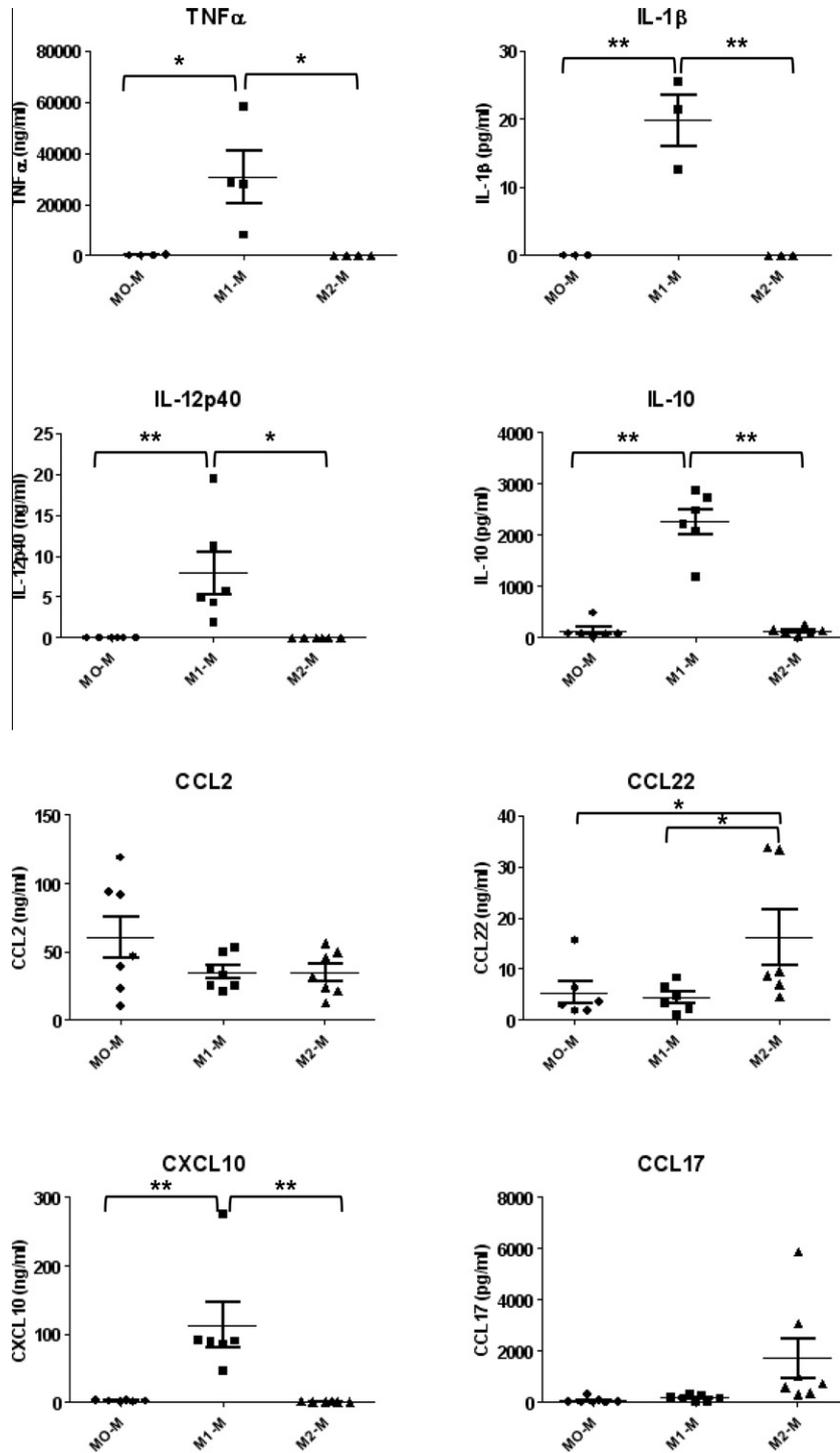
both IL-4 and LPS are able to increase its mRNA transcription in human cells [17]. Although the CCL17 expression was found higher



**Fig. 3.** mRNA expression of putative M2 polarization markers in M-CSF MΦ before and after polarization. Six-day cultured M-CSF (M0-M) MΦ were activated or not with IFN $\gamma$ /LPS or with IL-4 for additional 24 h to obtain M1-M and M2-M MΦ, respectively. Cells were harvested and after total RNA isolation, mRNA levels were determined by RT-qPCR assays. Data are expressed relatively to mRNA levels found in M0-M, arbitrarily set at the value of 1, and are the means  $\pm$  SEM of at least five independent experiments. \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01.



**Fig. 4.** mRNA expression of transcription factors before and after polarization of human M $\Phi$ . Six-day cultured M-CSF (M0-M) M $\Phi$  were activated or not with IFN $\gamma$ /LPS or with IL-4 for additional 24 h to obtain M1-M and M2-M M $\Phi$ , respectively. Cells were harvested and after total RNA isolation, mRNA levels were determined by RT-qPCR assays. Data are expressed relatively to mRNA levels found in M0-M, arbitrarily set at the value of 1, and are the means  $\pm$  SEM of at least five independent experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

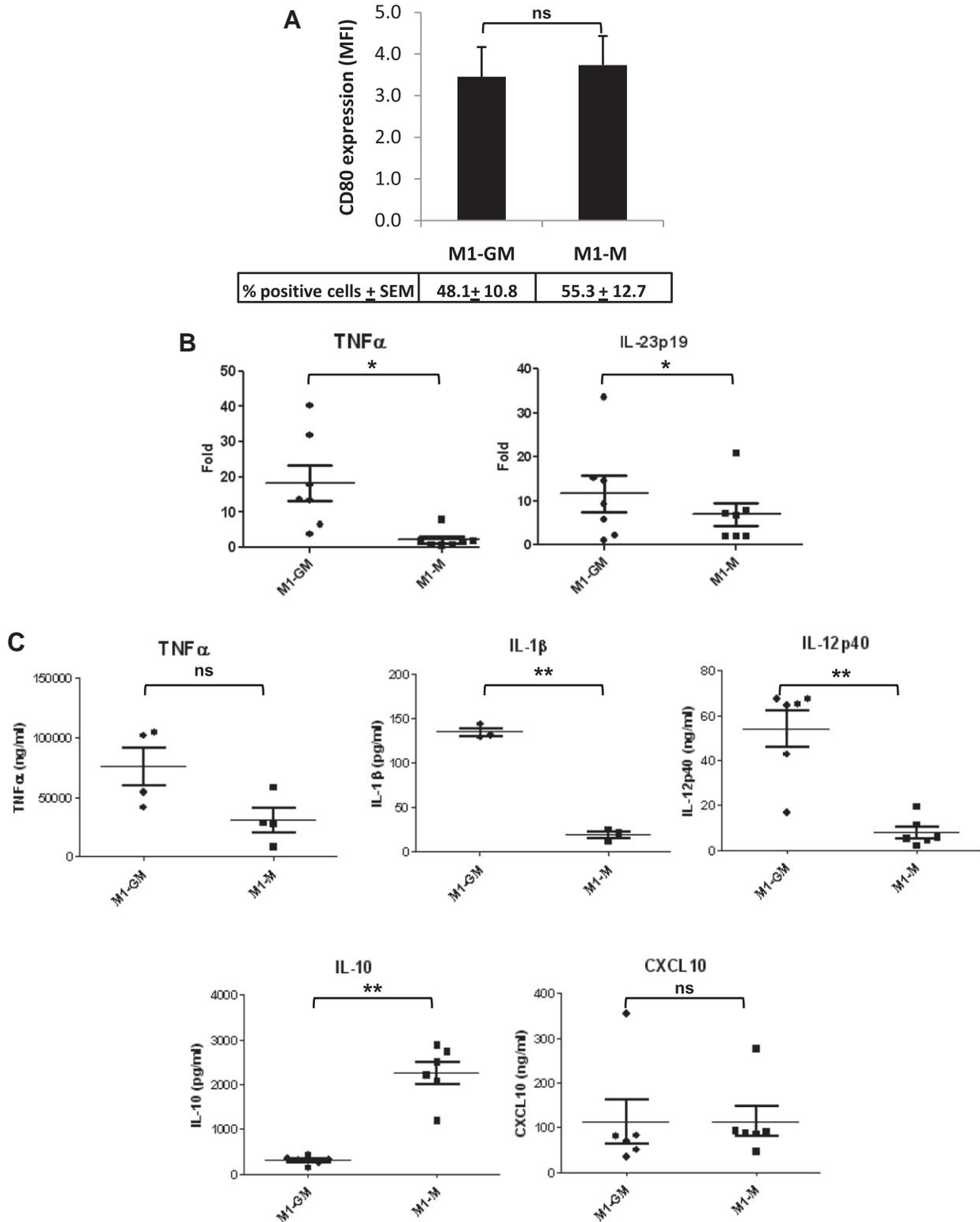


**Fig. 5.** Cytokine and chemokine secretion before and after polarization of human M $\Phi$ . Six-day cultured M-CSF (M0-M) M $\Phi$  were activated or not with IFN $\gamma$ /LPS or with IL-4 for additional 24 h to obtain M1-M and M2-M M $\Phi$ , respectively. Cytokine and chemokine levels in culture medium were determined by ELISA. Data expressed in pg/ml (IL-1 $\beta$ , IL-10 and CCL17) or ng/ml (TNF $\alpha$ , IL-12p40, CCL2, CCL22 and CXCL10) are the means  $\pm$  SEM of at least five independent experiments. \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01.

in M2 M $\Phi$  than M0 M $\Phi$ , this difference, in contrast to Martinez et al. [11], is neither significant at the mRNA level nor at the secretion level, probably because of the response variability of the primary human culture model of M $\Phi$ . Moreover, while the secretion of CCL17 was higher in M2 than M1 M $\Phi$ , this difference was not observed at the mRNA level, suggesting that the analysis of CCL17 expression, after a time of 24 h of polarization, may be more relevant at the protein level than at the mRNA level. In contrast to previous studies [11,24], CCL22 expression and secretion were found increased in

M2 M $\Phi$  when compared to unpolarized or M1 M $\Phi$ . Thus, the increased secretion of the CCL17 chemokine, associated to that of CCL22, in human M2 M $\Phi$  shows that these cells are fully able to chemoattract CCR4-positive Th2 type lymphocytes [14].

Such difference in the expression of M1 and M2 polarization markers can be explained by the high expression of some transcription factors [25] such as the members of NF- $\kappa$ B, IRF [11] or I $\kappa$ B [26] induced by the addition of IFN $\gamma$ /LPS to polarize M $\Phi$  towards M1 or the difference in Egr2 and PPAR $\gamma$  expression



**Fig. 6.** Comparison of M1 polarization marker expression between M1-GM and M1-M MΦ. Six-day cultured GM-CSF and M-CSF MΦ were activated or not with IFN $\gamma$ /LPS for additional 24 h to obtain M1-GM and M1-M MΦ, respectively. (A) CD80 expression in M1-GM and M1-M MΦ. Cells were then stained with conjugated mAbs directed against the surface markers CD80 and then analyzed by flow cytometry. Histograms represent the means of MFI ratio  $\pm$  SEM of six independent experiments. (B) mRNA expression of M1 polarization markers in M1-GM and M1-M MΦ. Cells were harvested and after total RNA isolation, the mRNA levels were determined by RT-qPCR assays. Data are expressed relatively to mRNA levels found in their respective unpolarized counterparts, arbitrarily set at the value of 1, and are the means  $\pm$  SEM of at least five independent experiments. (C) Cytokine and chemokine secretion in M1-GM and M1-M MΦ. Data expressed in pg/ml (IL-1 $\beta$  and IL-10) or ng/ml (TNF $\alpha$ , IL-12p40 and CXCL10) are the means  $\pm$  SEM of at least five independent experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , ns: not significant.

preferentially found increased in M2-MΦ [27,28]. The transcription factor IRFs play critical roles in a variety of immune processes

and IRF5 and IRF4 have been thus proposed to be critical for M1 and M2 phenotype, respectively [29,30]. The absence of IRF5

mRNA up-regulation in M1 M $\Phi$  can be explained by the fact that IRF5 was described to have a critical role in M1 polarization from GM-CSF-derived M $\Phi$  in comparison to M $\Phi$  from M-CSF origin [29]. Also, in contrast to previous observation done in mouse M $\Phi$  [30,31] or in human monocytes [32], we did not identify IRF4 as a specific IL-4 target gene. Moreover, the higher up-regulation of IRF4 observed in M1-M M $\Phi$  than in M2-M M $\Phi$  could be linked to the presence of TNF $\alpha$  in the M1 M $\Phi$  supernatant, known to activate the IRF4 promoter via NF- $\kappa$ B [32]. Similarly, the weak expression of IRF8, known to be up-regulated by IFN $\gamma$  at the transcriptional level, could be a consequence of the secretion of the cytokine IL-10, able to deregulate the activation of IRF-8 expression by IFN $\gamma$ /LPS [33], and could explain the weak induction of the mRNA level IL-12p40, a well known IRF8 target gene, in M1 M $\Phi$  [34]. At a glance, the discrepancies of the IRF expression levels could also be due to the time-course of mRNA analysis, probably too late to observe the maximal mRNA induction; a characterization of protein expression of these IRF transcription factors could be in fact required to clarify these differences of expression. So, the cooperative induction of transcription factors (NF- $\kappa$ B members and some IRF family) by the activation of the toll-like receptor up-regulates the expression of multiple genes such as pro-inflammatory cytokines, like TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  leading to M1 polarization in human M-CSF M $\Phi$  [35].

In this study, we reinforce the notion developed by Martinez et al. [11] that human M-CSF M $\Phi$  can fully polarize toward M1 after a LPS/IFN $\gamma$  stimulation; in addition, our results reveal that the mRNA gene expression profile of M1 polarized M $\Phi$ , at a 24 h time of analysis, is found not so different between the M1 M $\Phi$  derived from GM-CSF or M-CSF-differentiated monocytes. Firstly, we demonstrated that the expression of the co-stimulatory molecule CD80 which is a strong membrane marker of M1 polarization is expressed at the same level in both M-CSF and GM-CSF M $\Phi$ . Secondly, the identification of 6 induced mRNA markers such as IL-12p35, CCL5, CXCL10, CXCL11, CCR7 and IDO1, known as classic M1 markers, demonstrates that M-CSF M $\Phi$  can respond properly to INF $\gamma$ /LPS stimulation [11]. In addition, only two markers (TNF $\alpha$  and IL-23p19), among the 12 M1 markers tested in this study, showed a difference in their mRNA expression level between M1 macrophages from M-CSF and GM-CSF origin, suggesting that the acquisition of these gene markers of M1 polarization by M-CSF and GM-CSF M $\Phi$  is quite similar. Thirdly, LPS known to induce CXCL10 through the activation of the transcription factor IRF3 [36] has the same ability to increase the expression of IRF3 and CXCL10 in M1 M $\Phi$  from M-CSF and GM-CSF origin. Similarly, the good capacity of M-CSF M $\Phi$  to respond to IFN $\gamma$ /LPS was also confirmed by mRNA inductions of some NF- $\kappa$ B members and of IRF factors comparable to those obtained in M1-GM M $\Phi$ . Fourthly, we found that both M1 polarized M $\Phi$  populations secrete a similar amount of the chemokine CXCL10 suggesting that they can chemo-attract CXCR3-positive Th1 type lymphocytes in the same way. Finally, M-CSF M $\Phi$  polarized towards M1 secrete IL-10 but also IL-12p40, TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , in contrast to data reported by Verreck et al. [9,24]. However, the secretion of some of these cytokines is higher in M1-GM M $\Phi$  than in M1-M M $\Phi$  and these differences in the secretion levels, which are less pronounced than those previously described for IL-12p40 secretion [9], IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  secretion [24], could be related to procedure of monocyte isolation and purification and/or the M $\Phi$  polarization conditions. In accordance with a previous study [24], the secretion of IL-10 which was found higher in M1-M than in M1-GM M $\Phi$ , could explain the lower expression of IL-12p40 in our M1-M M $\Phi$  [6] demonstrating a highest anti-inflammatory phenotype of M1 polarized M $\Phi$  from M-CSF origin.

In agreement with the literature, our data reinforce the notion that differences exist between mouse and human in the expression of macrophagic markers of polarization. The major difference in macrophagic marker expressions between both species concerns

the L-arginine metabolism, characterized by the absence of the inducible NO synthase and arginase-1 gene expression in human M1-M and M2-M M $\Phi$ , respectively by comparison to mouse cells [37]. However, the expression level of chemokines (CCL2 and CCL7 in mouse against CCL17 and CCL22 in human) or membrane CD markers can also differ between species. Thereby, in contrast to mouse M $\Phi$  [15], the expression of the mannose receptor CD206 which is involved in innate immune response to parasitic infection was found similar in human unpolarized and M2-M M $\Phi$  both at the mRNA (MRC1) and protein levels demonstrating an inefficacy of IL-4 to up-regulate this surface marker during M2 polarization, this suggests that CD206 is not a specific marker of IL-4 polarization in human M $\Phi$  [38]. Therefore, human M2 polarized M $\Phi$  do not express CD206 but rather CD200R; so, in accordance with Ambarus et al. [16], CD80 and CD200R seem to be some robust M1 and M2 polarization phenotypic markers, respectively, in human M $\Phi$ . The absence of IRF4, klf4 or CHI3L-1 expression after 24 h of polarization could probably be linked to the time of analysis because their mRNA induction can be transient; they could also be related, at least for CHI3L-1, to the high level of IL-10 secretion found in M2-M M $\Phi$  after 24 h [39] since this cytokine is known to down-regulate chitinase expression [16]. The confirmation of these data probably requires additional experiments at a earlier time of analysis and/or at the protein level. Moreover, the absence of CCL2 regulation during human macrophage polarization, whereas CCL2 is induced during mouse macrophage polarization [7], can be explained by the fact that the murine CCL2 homologue is the human CCL13 chemokine [40]; our data consequently support the idea that the chemokine CCL2 cannot be considered as a marker of polarization in human M $\Phi$ .

Taken together, our data on the characterization of the macrophage polarization profiles of primary human M $\Phi$  from M-CSF origin have improved our knowledge on M $\Phi$  plasticity. Moreover, our results fully support the notion that human M-CSF M $\Phi$  stimulated by IFN $\gamma$ /LPS can polarize toward M1 type, suggesting that the assimilation of M-CSF M $\Phi$  to M2 M $\Phi$  needs to be reconsidered and that the pro-M2 word seems more appropriate for unstimulated M-CSF M $\Phi$ . Moreover, our data demonstrate that one must be careful in the choice of some markers of M $\Phi$  polarization and that the combined study of the expression of several of them seems necessary for fully characterizing M $\Phi$  subtypes.

## Acknowledgments

This work was supported by the “Fondation Coeur et Artères” (FCA 09T3). M. Jaguin is a recipient of a fellowship from the French Ministry of Research. We would like to thank L. Vernhet for helpful comments and the cytometry platform of Biosit, University of Rennes 1, France.

## Appendix A. Supplementary data

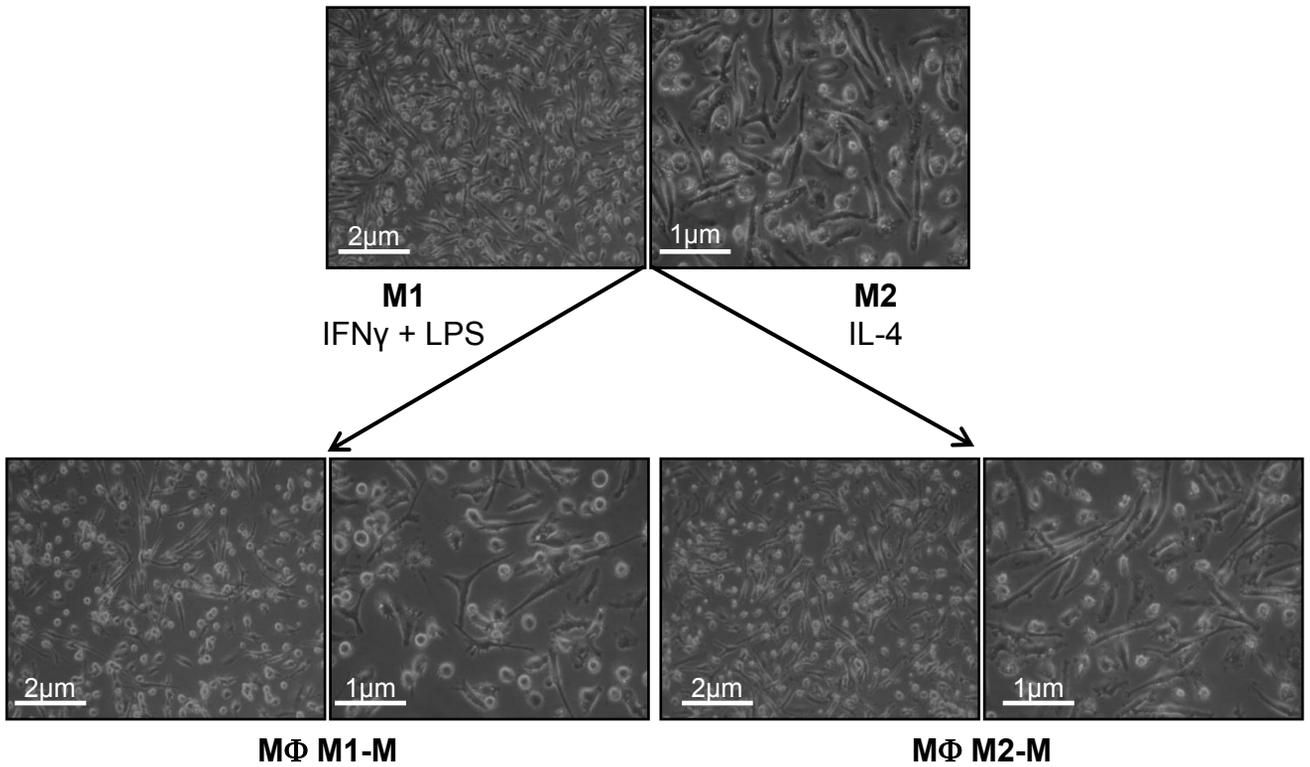
Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2013.01.010>.

## References

- [1] K.S. Akagawa, Functional heterogeneity of colony-stimulating factor-induced human monocyte-derived macrophages, *Int. J. Hematol.* 76 (2002) 27–34.
- [2] K.S. Akagawa, I. Komuro, H. Kanazawa, T. Yamazaki, K. Mochida, F. Kishi, Functional heterogeneity of colony-stimulating factor-induced human monocyte-derived macrophages, *Respirology (Suppl. 11)* (2006) 6–32.
- [3] S.K. Biswas, A. Mantovani, Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm, *Nat. Immunol.* 11 (2010) 889–896.
- [4] S. Gordon, Alternative activation of macrophages, *Nat. Rev. Immunol.* 3 (2003) 23–35.

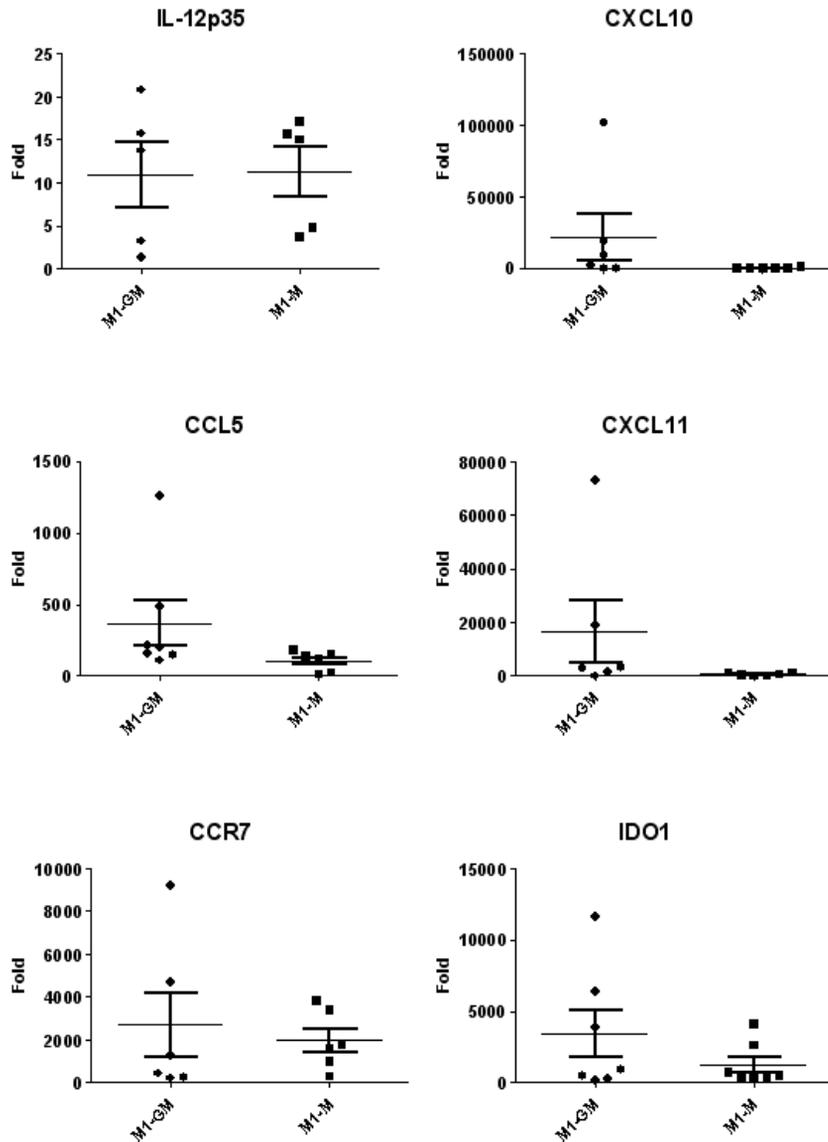
- [5] G. Raes, R. Van den Bergh, P. De Baetselier, G.H. Ghassabeh, C. Scotton, M. Locati, A. Mantovani, S. Sozzani, Arginase-1 and Ym1 are markers for murine, but not human, alternatively activated myeloid cells, *J. Immunol.* 174 (2005) 6561–6562.
- [6] D.C. Lacey, A. Achuthan, A.J. Fleetwood, H. Dinh, J. Roiniotis, G.M. Scholz, M.W. Chang, S.K. Beckman, A.D. Cook, J.A. Hamilton, Defining GM-CSF- and macrophage-CSF-dependent macrophage responses by in vitro models, *J. Immunol.* 188 (2012) 5752–5765.
- [7] A.J. Fleetwood, T. Lawrence, J.A. Hamilton, A.D. Cook, Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation, *J. Immunol.* 178 (2007) 5245–5252.
- [8] A.J. Fleetwood, H. Dinh, A.D. Cook, P.J. Hertzog, J.A. Hamilton, GM-CSF- and M-CSF-dependent macrophage phenotypes display differential dependence on type I interferon signaling, *J. Leukocyte Biol.* 86 (2009) 411–421.
- [9] F.A. Verreck, T. de Boer, D.M. Langenberg, M.A. Hoeve, M. Kramer, E. Vaisberg, R. Kastelein, A. Kolk, R. de Waal-Malefyt, T.H. Ottenhoff, Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco) bacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 4560–4565.
- [10] J. Van Grevenynghe, S. Rion, E. Le Ferrec, M. Le Vee, L. Amiot, R. Fauchet, O. Fardel, Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit differentiation of human monocytes into macrophages, *J. Immunol.* 170 (2003) 2374–2381.
- [11] F.O. Martinez, S. Gordon, M. Locati, A. Mantovani, Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression, *J. Immunol.* 177 (2006) 7303–7311.
- [12] World Medical Association Declaration of Helsinki, Recommendations guiding physicians in biomedical research involving human subjects, *Cardiovasc. Res.* 35 (1997) 2–3.
- [13] N. Podechard, V. Lecureur, E. Le Ferrec, I. Guenon, L. Sparfel, D. Gilot, J.R. Gordon, V. Lagente, O. Fardel, Interleukin-8 induction by the environmental contaminant benzo(a)pyrene is aryl hydrocarbon receptor-dependent and leads to lung inflammation, *Toxicol. Lett.* 177 (2008) 130–137.
- [14] S. Hashimoto, T. Suzuki, H.Y. Dong, N. Yamazaki, K. Matsushima, Serial analysis of gene expression in human monocytes and macrophages, *Blood* 94 (1999) 837–844.
- [15] A. Mantovani, A. Sica, S. Sozzani, P. Allavena, A. Vecchi, M. Locati, The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization, *Trends Immunol.* 25 (2004) 677–686.
- [16] C.A. Ambarus, S. Krausz, M. Van Eijk, J. Hamann, T.R. Radstake, K.A. Reedquist, P.P. Tak, D.L. Baeten, Systematic validation of specific phenotypic markers for in vitro polarized human macrophages, *J. Immunol. Methods* 375 (2012) 196–206.
- [17] E. Vannier, L.C. Miller, C.A. Dinarello, Coordinated antiinflammatory effects of interleukin 4: interleukin 4 suppresses interleukin 1 production but up-regulates gene expression and synthesis of interleukin 1 receptor antagonist, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 4076–4080.
- [18] M. Di Rosa, G. Malaguarnera, C. De Gregorio, F. Drago, L. Malaguarnera, Evaluation of CHI3L-1 and CHIT-1 Expression in Differentiated and Polarized Macrophages, *Inflammation* (2012).
- [19] N. Dror, M. Alter-Koltunoff, A. Azriel, N. Amariglio, J. Jacob-Hirsch, S. Zeligson, A. Morgenstern, T. Tamura, H. Hauser, G. Rechavi, K. Ozato, B.Z. Levi, Identification of IRF-8 and IRF-1 target genes in activated macrophages, *Mol. Immunol.* 44 (2007) 338–346.
- [20] T. Nagamura-Inoue, T. Tamura, K. Ozato, Transcription factors that regulate growth and differentiation of myeloid cells, *Int. Rev. Immunol.* 20 (2001) 83–105.
- [21] A.D. Friedman, Transcriptional regulation of granulocyte and monocyte development, *Oncogene* 21 (2002) 3377–3390.
- [22] X. Liao, N. Sharma, F. Kapadia, G. Zhou, Y. Lu, H. Hong, K. Paruchuri, G.H. Mahabeshwar, E. Dalmas, N. Venticlef, C.A. Flask, J. Kim, B.W. Doreian, K.Q. Lu, K.H. Kaestner, A. Hamik, K. Clement, M.K. Jain, Kruppel-like factor 4 regulates macrophage polarization, *J. Clin. Invest.* 121 (2011) 2736–2749.
- [23] G. Solinas, S. Schiarea, M. Liguori, M. Fabbri, S. Pesce, L. Zammataro, F. Pasqualini, M. Nebuloni, C. Chiabrando, A. Mantovani, P. Allavena, Tumor-conditioned macrophages secrete migration-stimulating factor: a new marker for M2-polarization, influencing tumor cell motility, *J. Immunol.* 185 (2010) 642–652.
- [24] F.A. Verreck, T. de Boer, D.M. Langenberg, L. Van der Zanden, T.H. Ottenhoff, Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN-gamma- and CD40L-mediated costimulation, *J. Leukocyte Biol.* 79 (2006) 285–293.
- [25] A. Sica, A. Mantovani, Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas, *J. Clin. Invest.* 122 (2012) 787–795.
- [26] M.W. Feinberg, Z. Cao, A.K. Wara, M.A. Lebedeva, S. Senbanerjee, M.K. Jain, Kruppel-like factor 4 is a mediator of proinflammatory signaling in macrophages, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 38247–38258.
- [27] M. Rehli, S. Sulzbacher, S. Pape, T. Ravasi, C.A. Wells, S. Heinz, L. Sollner, C. El Chartouni, S.W. Krause, E. Steingrimsson, D.A. Hume, R. Andreesen, Transcription factor Tfcf contributes to the IL-4-inducible expression of a small group of genes in mouse macrophages including the granulocyte colony-stimulating factor receptor, *J. Immunol.* 174 (2005) 7111–7122.
- [28] M.A. Bouhlel, B. Derudas, E. Rigamonti, R. Dievart, J. Brozek, S. Haulon, C. Zawadzki, B. Jude, G. Torpier, N. Marx, B. Staels, G. Chinetti-Gbaguidi, PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties, *Cell Metab.* 6 (2007) 137–143.
- [29] T. Krausgruber, K. Blazek, T. Smallie, S. Alzabin, H. Lockstone, N. Sahgal, T. Hussell, M. Feldmann, I.A. Udalova, IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses, *Nat. Immunol.* 12 (2011) 231–238.
- [30] T. Satoh, O. Takeuchi, A. Vandenbon, K. Yasuda, Y. Tanaka, Y. Kumagai, T. Miyake, K. Matsushita, T. Okazaki, T. Saitoh, K. Honma, T. Matsuyama, K. Yui, T. Tsujimura, D.M. Standley, K. Nakanishi, K. Nakai, S. Akira, The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection, *Nat. Immunol.* 11 (2010) 936–944.
- [31] C. El Chartouni, L. Schwarzfischer, M. Rehli, Interleukin-4 induced interferon regulatory factor (Irf) four participates in the regulation of alternative macrophage priming, *Immunobiology* 215 (2010) 821–825.
- [32] A. Lehtonen, V. Veckman, T. Nikula, R. Lahesmaa, L. Kinnunen, S. Matikainen, I. Julkunen, Differential expression of IFN regulatory factor four gene in human monocyte-derived dendritic cells and macrophages, *J. Immunol.* 175 (2005) 6570–6579.
- [33] D.W. Mullins, R.S. Martins, K.D. Elgert, Tumor-derived cytokines dysregulate macrophage interferon-gamma responsiveness and interferon regulatory factor-8 expression, *Exp. Biol. Med.* (Maywood) 228 (2003) 270–277.
- [34] I.M. Wang, C. Contursi, A. Masumi, X. Ma, G. Trinchieri, K. Ozato, An IFN-gamma-inducible transcription factor, IFN consensus sequence binding protein (ICSBP), stimulates IL-12 p40 expression in macrophages, *J. Immunol.* 165 (2000) 271–279.
- [35] T. Lawrence, G. Natoli, Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity, *Nat. Rev. Immunol.* 11 (2011) 750–761.
- [36] T. Kawai, O. Takeuchi, T. Fujita, J. Inoue, P.F. Muhlratt, S. Sato, K. Hoshino, S. Akira, Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes, *J. Immunol.* 167 (2001) 5887–5894.
- [37] P.J. Murray, T.A. Wynn, Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization, *J. Leukocyte Biol.* 89 (2011) 557–563.
- [38] Z. Chronos, V.L. Shepherd, Differential regulation of the mannose and SP-A receptors on macrophages, *Am. J. Physiol.* 269 (1995) 6–721.
- [39] M. Di Rosa, M. Musumeci, A. Scuto, S. Musumeci, L. Malaguarnera, Effect of interferon-gamma, interleukin-10, lipopolysaccharide and tumor necrosis factor-alpha on chitinase synthesis in human macrophages, *Clin. Chem. Lab. Med.* 43 (2005) 499–502.
- [40] F.O. Martinez, L. Helming, S. Gordon, Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective, *Annu. Rev. Immunol.* 27 (2009) 451–483.

## Supplementary data 1



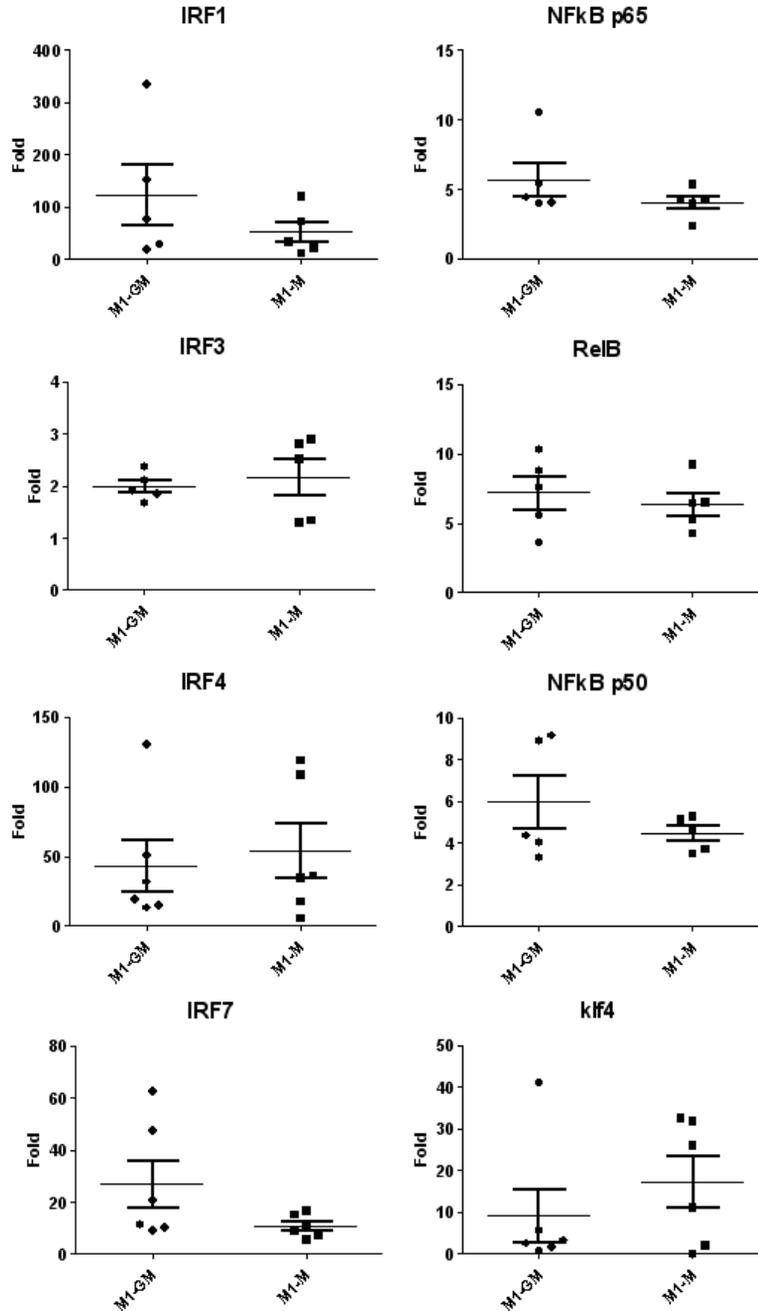
**Supplementary data 1:** Morphological feature of primary human M $\Phi$  (Phase-contrast microscopy, magnification, x600 or x1200). Six-day cultured M-CSF (M0-M) M $\Phi$  were elongated. Most of the M0-M M $\Phi$  polarized in the presence of IL-4 (M2-M) are elongated by comparison to the M0-M M $\Phi$  polarized in the presence of IFN $\gamma$ /LPS (M1-M).

## Supplementary data 2



**Supplementary data 2:** Comparison of mRNA expression of M1 polarization markers in M $\Phi$  polarized towards M1 from GM-CSF (M1-GM) and M-CSF (M1-M) origin. Six-day cultured GM-CSF and M-CSF M $\Phi$  were activated or not with IFN $\gamma$ /LPS for additional 24 h to obtain M1-GM and M1-M M $\Phi$ , respectively. Cells were harvested and after total RNA isolation, the mRNA levels were determined by RT-qPCR assays. Data are expressed relatively to mRNA levels found in their respective unpolared counterparts, arbitrarily set at the value of 1, and are the means  $\pm$  SEM of at least 5 independent experiments.

### Supplementary data 3



**Supplementary data 3:** Comparison of mRNA expression of transcription factors found increased during M1 polarization in MΦ polarized towards M1 from GM-CSF (M1-GM) and M-CSF (M1-M) origin. Six-day cultured GM-CSF and M-CSF MΦ were activated or not with IFN $\gamma$ /LPS for additional 24 h to obtain M1-GM and M1-M MΦ, respectively. Cells were harvested and after total RNA isolation, the mRNA levels were determined by RT-qPCR assays. Data are expressed relatively to mRNA levels found in their respective unpolarized counterparts, arbitrarily set at the value of 1, and are the means  $\pm$  SEM of at least 5 independent experiments.

### III.1.3. Discussion et perspectives

#### III.1.3.1. Apport du travail

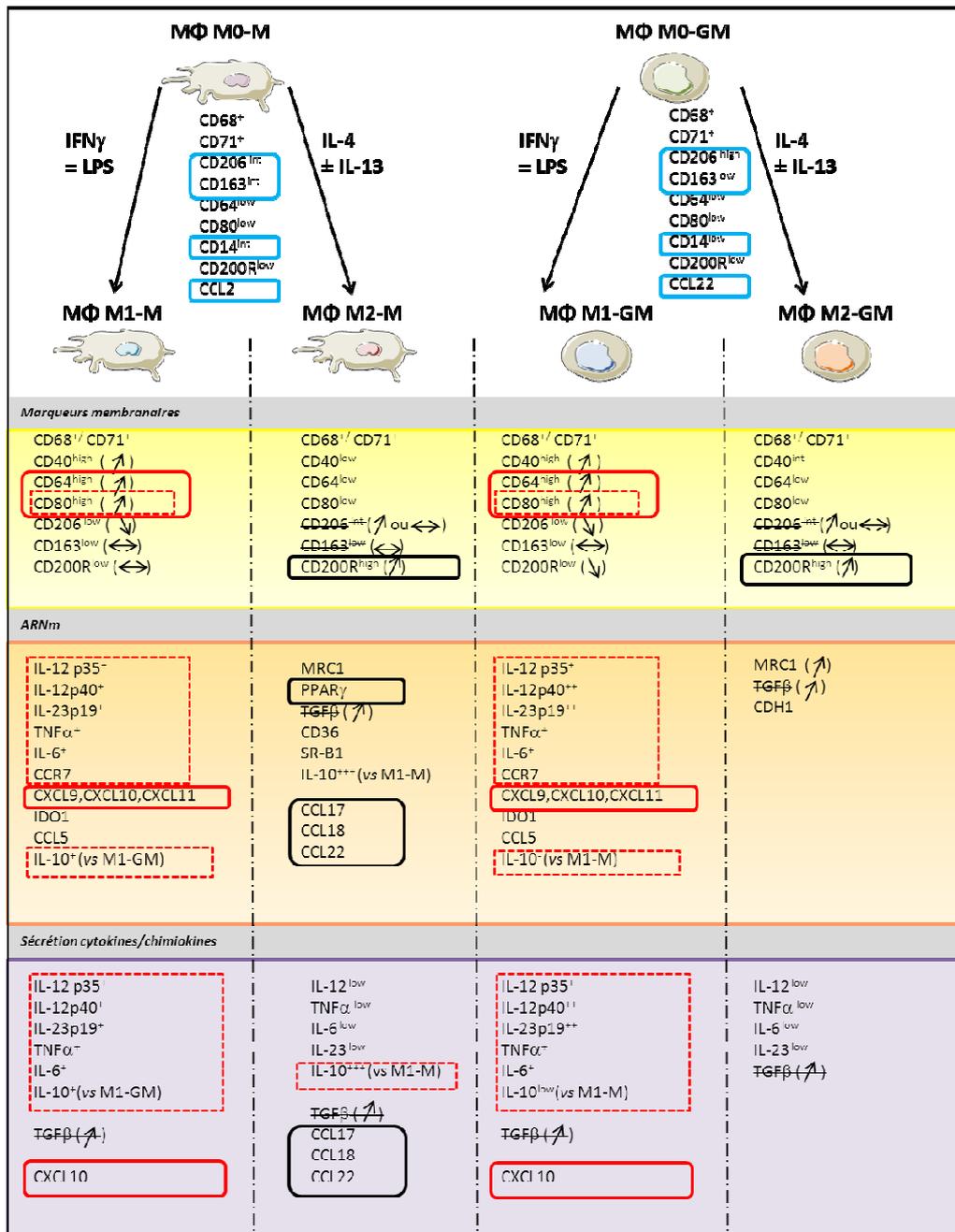
Dans l'étude comparative réalisée ici, nous avons caractérisé les différents sous-types de M $\phi$  humains différenciés *in vitro* au GM-CSF (M0-GM) ou au M-CSF (M0-M) et activés en M $\phi$  M1-GM, M1-M et M2-M au niveau : (i) de la morphologie, (ii) de l'expression génique, (iii) phénotypique et (iv) de la sécrétion de cytokines et de chimiokines spécifiques de nombreux marqueurs de la polarisation des M $\phi$ .

Les résultats principaux de ce travail sont :

- (i) La capacité des M $\phi$  différenciés au M-CSF à s'activer fonctionnellement aussi bien en M $\phi$  M1 sous l'effet du LPS et de l'IFN $\gamma$  qu'en M $\phi$  M2 en présence d'IL-4.
- (ii) La remise en cause du CD206 comme marqueur caractéristique de la polarisation M2 chez l'Homme.
- (iii) La validation du CD80 et du CD200R comme marqueurs phénotypiques plus discriminant de la polarisation respectivement M1 et M2 des M $\phi$  humains.

Nos données montrent la grande complexité phénotypique qui intervient au cours de l'activation des M $\phi$  humains. Par ailleurs, cette étude renforce la nécessité de combiner l'analyse de différents marqueurs pour caractériser le plus précisément possible les sous-types de M $\phi$  M1 et M2, en particulier dans une perspective de profilage des populations de M $\phi$  *in* et *ex vivo* chez l'Homme. Dans cette optique, nous proposons à l'issue de ce travail un tableau récapitulatif (**Tableau 4**) des marqueurs les plus pertinents à utiliser pour caractériser des populations de M $\phi$  humains que ce soit *in vitro*, *in* ou *ex-vivo*.

Nous allons par la suite discuter des questionnements restants pour compléter et approfondir ce travail.



- Marqueurs phénotypiques les plus discriminants du type de maturation M-CSF vs GM-CSF
- Marqueurs phénotypiques ou géniques les plus discriminants du type d'activation M1 commun à IFN $\gamma$  et IFN $\gamma$ +LPS
- Marqueurs phénotypiques ou géniques exprimés ou potentialisés en présence de LPS
- Marqueurs phénotypiques ou géniques les plus discriminants du type d'activation M2

marqueurs usuellement admis pour caractériser le sous-type de macrophage à ré-évaluer ou à combiner

$\uparrow$   $\downarrow$   $\leftrightarrow$  Expression du marqueur augmente, diminue ou reste stable en comparaison des macrophages M0 respectifs

**Tableau 4: Panel de marqueurs pour la caractérisation phénotypique des macrophages humains activés et non activés. D'après (376–380, 280, 381, 382).** Les macrophages (M $\phi$ ) sont différenciés à partir de monocytes humains en présence de GM-CSF (M0-GM) ou de M-CSF (M0-M-CSF) et sont ensuite activés à l'aide d'IFN $\gamma$  seul ou combiné au LPS pour les M1-M et M1-GM et d'IL-4 seule ou combinée à l'IL-13 pour les macrophages M2-M et M2-GM.

### III.1.3.2. Questionnements à approfondir...

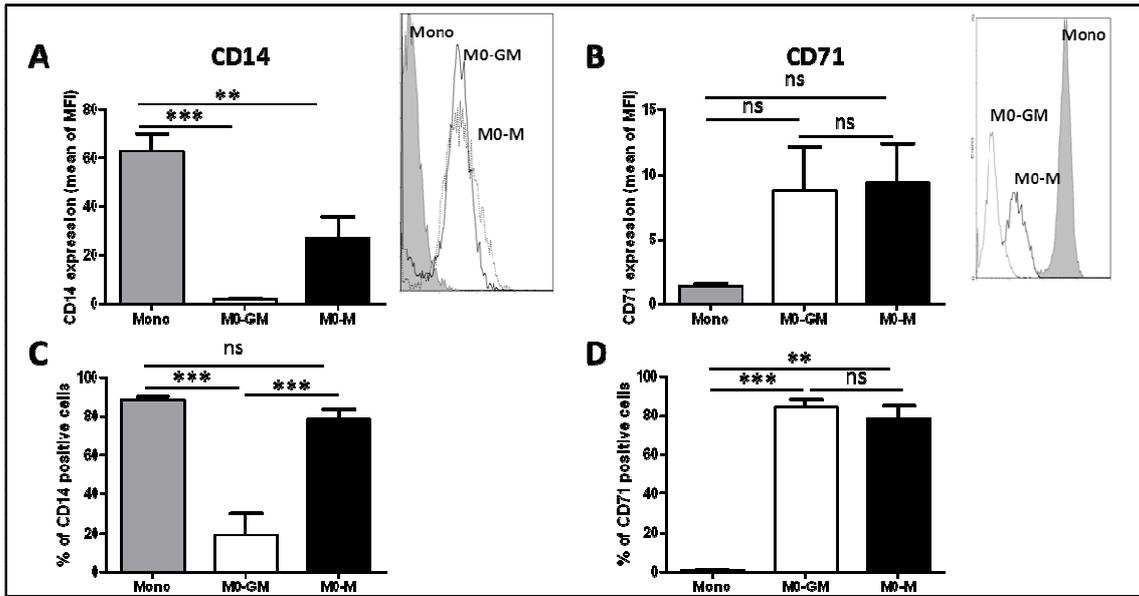
#### III.1.3.2.1. Pourquoi faire le choix d'un modèle de M $\phi$ différencié au M-CSF ?

L'activation des M $\phi$  est induite en réponse à des signaux inducteurs tels que l'IFN $\gamma$  et le LPS pour l'activation classique et l'IL-4 ou l'IL-13 pour l'activation M2a. Cependant, ces dernières années, une autre définition de l'activation des M $\phi$  a largement été utilisée dans la communauté scientifique. Celle-ci se réfère aux M $\phi$  cultivés en présence de GM-CSF comme des M $\phi$  M1 (caractérisés par une forte expression d'IL-12 et une faible expression d'IL-10), tandis que la différenciation au M-CSF favorisait un phénotype IL-12<sup>low</sup> et IL-10<sup>high</sup> correspondant à un phénotype M2-like (272, 271, 280, 381). Ainsi, ces études décryptent le rôle fonctionnel des M $\phi$  M1 ou M2 en se basant exclusivement sur l'étude de M $\phi$  différenciés *in vitro* au M-CSF (M2-like) et au GM-CSF (M1-like). Dans ce contexte un peu confus en terme de nomenclature, pourquoi avoir fait le choix de développer des modèles de M $\phi$  humains polarisés M1 et M2 à partir de M $\phi$  différenciés au M-CSF ?

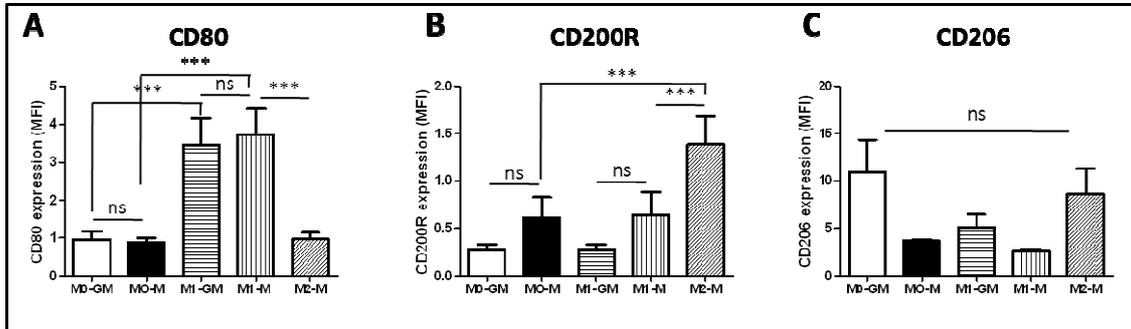
Pour déterminer le choix de notre modèle d'étude, nous avons comparé phénotypiquement les M $\phi$  issus d'une différenciation au M-CSF (M0-M) et au GM-CSF (M0-GM). A l'inverse de Kazawa et al. (2009), (383) nous n'avons pas trouvé de différence entre les 2 types de M $\phi$  au niveau de l'expression du CD71, du CD80, et du CD200R (**Figure 27**). En accord avec des résultats de Kazawa et al., (2009) (383) et ceux récemment publiés par Kittan et al. (2013) (377), les M $\phi$  différenciés au M-CSF expriment plus fortement le CD14 (**Figure 27**) tandis que ceux différenciés en présence de GM-CSF expriment, de manière intéressante, plus fortement le CD206, un marqueur communément utilisé pour caractériser l'activation alternative des M $\phi$  (**Figure 28**). Même s'ils ne sont pas significatifs, ces résultats viennent conforter les données publiées par d'autres équipes (377, 379).

Au niveau des cytokines et de chimiokines, seules 2 (CCL2 et CCL22) parmi les 8 testées (**article 1, Fig 5**) présentent une sécrétion différentielle entre les deux types de M $\phi$  non polarisés (**Figure 29**).

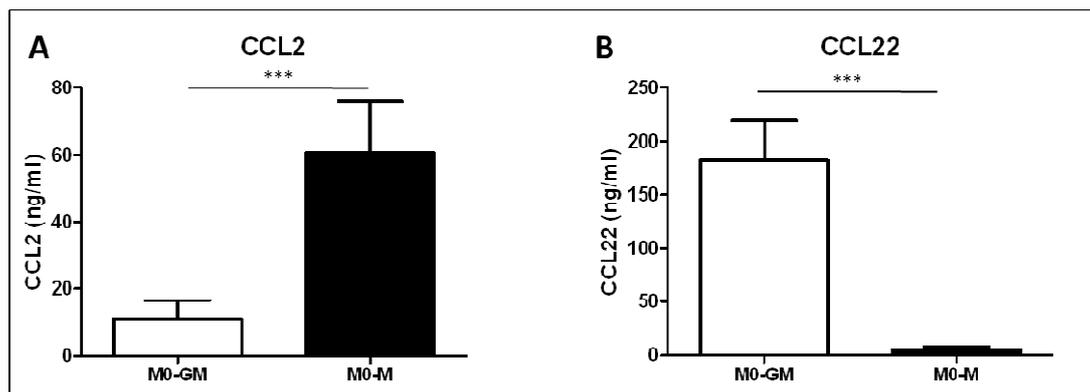
Nous montrons ainsi que la sécrétion de CCL2 est une caractéristique des M $\phi$  différenciés par M-CSF alors que la sécrétion de CCL22 est plutôt caractéristique des M $\phi$  issus de la différenciation au GM-CSF (**Figure 29**). Ces données suggèrent que les M $\phi$  non polarisés différenciés au M-CSF pourraient, au moins théoriquement, chemo-attracter des cellules CCR2 positives, alors que les M $\phi$  différenciés au GM-CSF pourraient attirer les lymphocytes de type Th2 positifs pour le récepteur CCR4 (384).



**Figure 27: Expression du CD14 et du CD71 dans les monocytes et les macrophages différenciés au GM-CSF (M0-GM) et au M-CSF (M0-M).** Les monocytes issus du sang périphérique ont été récoltés 1 h après leur adhérence sur plastique; les macrophages M0-GM et M0-M sont récupérés après 6 jours de différenciation en présence de GM-CSF et de M-CSF respectivement. Les cellules sont marquées avec un anticorps conjugué à l'APC ou au PE directement dirigé contre le marqueur de surface CD14 (A et C) ou CD71 (B et D) et ensuite les cellules sont analysées par cytométrie de flux. Les histogrammes représentent la moyenne des ratios de MFI + SEM (A et B) ou le pourcentage de cellules positives + SEM (C et D) d'au moins 5 expériences indépendantes. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , ns: non significatif.



**Figure 28: Expression des antigènes de surface avant et après la polarisation des macrophages humains.** Après 6 jours de différenciation en présence de GM-CSF (M0-GM) ou de M-CSF (M0-M), les macrophages sont activés ou non en présence d'IFN $\gamma$ /LPS pendant 24 h additionnelles pour obtenir respectivement des macrophages M1-GM et M1-M. Les macrophages M0-M sont activés ou non en présence d'IL-4 pendant 24 h additionnelles pour obtenir des macrophages M2-M. Les cellules sont alors marquées avec un anticorps conjugué au FITC ou au PE directement dirigé contre le marqueur de surface CD80 (A), CD200R (B) et CD206 (C) et ensuite analysées par cytométrie de flux. Les histogrammes représentent la moyenne des ratios de MFI  $\pm$  SEM d'au moins 6 expériences indépendantes. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , ns: non significatif.



**Figure 29: Sécrétion des chimiokines CCL2 et CCL22 par les macrophages non polarisés différenciés au GM-CSF (M0-GM) et au M-CSF (M0-M).** Les macrophages M0-GM et M0-M sont différenciés pendant 6 jours en présence de GM-CSF ou de M-CSF respectivement. Le milieu de culture est changé 24 h avant de déterminer les niveaux de CCL2 (A) et CCL22 (B) par technique ELISA. Les données sont exprimées en ng/ml et représentent la moyenne  $\pm$  SEM d'au moins 5 expériences indépendantes. \*\*\* $p < 0.001$ .

Ainsi, bien que Fleetwood et al. (2009) (382) rapportent des différences significatives dans le transcriptome des populations de M $\phi$  générées *in vitro* par l'utilisation de M-CSF ou de GM-CSF, il n'y a que peu de preuves convaincantes pour attribuer le terme de M $\phi$  M1 aux M $\phi$  différenciés au GM-CSF et le terme M2 à ceux différenciés au M-CSF. C'est pourquoi, d'après nos données et comme d'autres équipes, nous pensons que cette terminologie est à revoir.

Il est possible par ailleurs de concevoir que les monocytes circulants et les M $\phi$  évoluant *in vivo* au sein des tissus soient exposés simultanément ou séquentiellement à des facteurs de croissance comme le M-CSF ou le GM-CSF et à des cytokines activatrices telles que l'IFN $\gamma$ , le TNF $\alpha$  ou encore l'IL-4. Ainsi, lors d'un congrès international en immunologie qui s'est déroulé à Milan en août 2013, un consortium de spécialistes de la biologie du M $\phi$  s'est réuni pour tenter de proposer une nomenclature et les lignes directrices expérimentales visant à clarifier ce champ de recherche. Ils ont conclu que **les M $\phi$  différenciés en présence de M-CSF à partir de monocytes humains de sang périphérique ou de moelle osseuse de souris constituent le système prédominant pour générer des M $\phi$  et peuvent donc être utilisés comme référence dans le cadre d'un système expérimental *in vitro* reproductible et normé.**

Il nous a également paru important de bien caractériser les M $\phi$  différenciés au M-CSF en raison de l'expression ubiquitaire de ce facteur de croissance dans l'organisme en condition normale tandis que l'expression de GM-CSF n'est pas détectée, exceptée en période inflammatoire (272). Il est important de souligner également que les cultures de monocytes différenciés au GM-CSF contiennent un nombre important de cellules CD11c<sup>+</sup> avec des activités de présentation antigénique accrues, une forte expression du CD206, une perte de l'expression du CD14 ainsi qu'une production plus importante d'IL-12, caractéristiques d'un phénotype DC-like qu'il faut prendre en compte dans le profilage des

gènes ou dans les analyses fonctionnelles (377). D'autre part, il peut être intéressant d'utiliser des M $\phi$  différenciés au M-CSF afin de mieux comprendre leur rôle au niveau tumoral où le M-CSF est reconnu comme directement impliqué dans la progression tumorale (385, 386).

**En conclusion, d'après nos résultats et ceux d'autres équipes (377–379), il existe des différences morphologiques et phénotypiques au niveau de l'expression de certains marqueurs (CD14, CD206, CCL2, CCL22) lorsque l'on compare les M $\phi$  issus de la différenciation au M-CSF ou GM-CSF. Cependant ces différences se répercutent peu sur la fonction des M $\phi$  et la maturation en présence de M-CSF ou de GM-CSF induit seulement un état anti-inflammatoire ou pro-inflammatoire modéré. On ne peut donc pas qualifier la différenciation au GM-CSF ou M-CSF de réelle activation M1 ou M2 respectivement. C'est pourquoi, d'après tous les arguments exposés, nous avons fait le choix des conditions de culture pour générer les deux populations *in vitro* M1 et M2, à savoir, la stimulation par l'IFN $\gamma$  (en présence ou non de LPS) ou par l'IL-4 après différenciation au M-CSF afin de s'approcher au mieux des conditions physiologiques. En effet, IFN $\gamma$  et l'IL-4 exercent des effets antagonistes clairs sur la polarisation des M $\phi$  *via* STAT1 et STAT6, respectivement. De plus, l'IFN $\gamma$  et l'IL-4 induisent des sous-populations de M $\phi$  définies et largement étudiées (363, 369, 387, 388).**

#### *III.1.3.2.2. Le M $\phi$ M1-M constitue-t-il un modèle pertinent et fonctionnel de M $\phi$ activé classiquement ?*

Notre étude soutient ainsi la notion apportée par Martinez et al. (2006) (343) que les M $\phi$  différenciés au M-CSF peuvent s'activer complètement et fonctionnellement en M $\phi$  M1 contrairement à d'autres études qui soutiennent que ce facteur de croissance induit un phénotype M2-like (271, 272, 280, 381). Pour appuyer cette conclusion, nous avons comparé les capacités d'activation des M $\phi$  M1 différenciés au préalable à partir des deux facteurs de croissance (GM-CSF ou M-CSF). L'étude de ces deux types de M $\phi$  M1 montre un profil d'expression des marqueurs similaire comme le résume précédemment le tableau comparatif (**Tableau 4**).

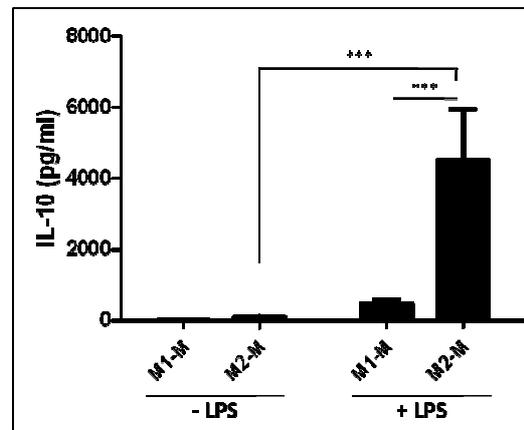
Tout d'abord, nous montrons une expression membranaire équivalente du marqueur de co-stimulation CD80 typique de l'activation M1 (**Figure 28**). Ces résultats divergent quelque peu des données publiées par Ambarus et al. (2012) (379) au niveau du CD80. De telles différences semblent être dues aux conditions d'activation M1 et notamment l'absence de stimulation par le LPS des M $\phi$  dans l'étude menée par Ambarus et al. (379).

Deuxièmement, les transcrits de 6 marqueurs géniques caractéristiques de l'activation classique des M $\phi$  (IL-12p35, CCL5, CXCL10, CXCL11, CCR7 et IDO1) sont induits à la fois dans les

M $\phi$  M1-M et M1-GM sans différence significative entre les deux types de M $\phi$  ([article 1, supp data 2](#)). Troisièmement, sur les 12 marqueurs testés ([article 1, Fig 6B et 6C et supp data 2](#)), seuls 2 marqueurs M1 (TNF $\alpha$  et IL-13p19) présentent une différence dans l'expression de leur transcrite entre les deux types de M $\phi$  M1. Ces données suggèrent que l'acquisition des marqueurs géniques M1 est quasiment assimilable entre les M $\phi$  M1-M et les M1-GM. D'autre part, l'induction équivalente de l'expression des transcrits de IRF3 et de CXCL10 ([article 1, supp data 3 et Fig 6](#)) ainsi que les quantités similaires de CXCL10 sécrétées par les M $\phi$  M1-M et M1-GM montrent que le LPS et l'IFN $\gamma$  ont la même capacité d'activation de l'axe IRF3/CXCL10 dans les M $\phi$  d'origine M-CSF et GM-CSF. Ces données suggèrent que les M $\phi$  M1-M et M1-GM peuvent induire théoriquement de façon équivalente le recrutement, *via* CXCL10, de lymphocytes Th1 exprimant le récepteur CCR3. Dans le même ordre d'idée, nous confirmons la capacité des M $\phi$  différenciés au M-CSF à répondre efficacement au LPS et à l'IFN $\gamma$  par l'induction des ARNm des facteurs de transcription de la famille NF- $\kappa$ B et IRF, de manière comparable à celle retrouvée dans les M $\phi$  M1 issus d'une différenciation au GM-CSF. Pour confirmer ces résultats et aller plus loin dans l'étude de la régulation de l'activation classique des M $\phi$ , il serait intéressant d'étudier l'expression protéique de ces différents facteurs de transcription à des temps plus précoces.

Finalement, les M $\phi$  différenciés au M-CSF et activés classiquement sécrètent (en plus de CXCL10), de l'IL-12p40, du TNF $\alpha$  et de l'IL-1 $\beta$  mais aussi de l'IL-10 contrairement aux données publiées par Verreck et al. (280, 381). Les résultats de notre étude sont appuyés par ceux de Vogel et al. (2014) (378) qui montrent également que les M $\phi$  M1 issus d'une différenciation au M-CSF sécrètent de l'IL-12p40, du TNF $\alpha$  et aussi de l'IL-6. En revanche, contrairement à nos données, ils ne retrouvent pas de différence au niveau des quantités d'IL-12p40 sécrétées entre les M $\phi$  M1 issus du M-CSF et du GM-CSF. Toutefois, la sécrétion plus importante de ces cytokines par les M $\phi$  M1-GM comparée aux M1-M que nous retrouvons est moins prononcée que celle retrouvée dans d'autres études pour l'IL-12p40 (280), l'IL-1 $\beta$  et le TNF $\alpha$  (381). Ces discordances peuvent en partie être dues aux procédures d'isolation et de purification des monocytes humains ainsi qu'aux conditions de différenciation et d'activation des M $\phi$ . De plus, la sécrétion plus importante d'IL-10 dans les M $\phi$  M1-M comparés aux M1-GM ([article 1, Fig 6](#)) dans nos modèles pourrait aussi expliquer de telles différences par inhibition de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-12p40. Basé sur cette plus forte sécrétion d'IL-10, il est possible de considérer que les M $\phi$  différenciés au M-CSF et activés par l'IFN $\gamma$  et le LPS ont un phénotype plus anti-inflammatoire que ceux issus d'une différenciation au GM-CSF. Toutefois si on se base sur la capacité des M $\phi$  à sécréter de l'IL-10 après une stimulation au LPS pour déterminer leur potentiel anti-inflammatoire, il faut garder à l'esprit que les M $\phi$  activés alternativement en présence d'IL-4 sécrètent des quantités beaucoup plus importantes d'IL-10 que les M $\phi$  M1-M ([Figure 30](#)). Il serait également intéressant de comparer cette sécrétion

d'IL-10 en réponse au LPS avec des M $\phi$  différencié au GM-CSF puis activés alternativement afin de préciser les capacités anti-inflammatoires relatives des différents sous-types de M $\phi$ .



**Figure 30: Effet du LPS sur la sécrétion d'IL-10 par les macrophages humains M1-M et M2-M.** Après 6 jours de différenciation en présence de M-CSF, les macrophages sont activés en présence d'IFN $\gamma$  ou d'IL-4 pendant 24 h additionnelles pour obtenir respectivement des macrophages M1-M et M2-M. Les macrophages sont ensuite stimulés ou non par 10 ng/ml de LPS pour 24 h additionnelles. Les niveaux d'IL-10 dans les milieux de culture sont déterminés par technique ELISA. Les données sont exprimées en pg/ml et représentent la moyenne  $\pm$  SEM d'au moins 6 expériences indépendantes. \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

Au total, ces résultats montrent, en accord avec les travaux d'autres équipes résumés dans le **Tableau 4**, que les M $\phi$  issus d'une différenciation au M-CSF peuvent répondre complètement à une stimulation par l'IFN $\gamma$  et le LPS et acquérir un phénotype M1 comparable à celui obtenu avec les M $\phi$  différenciés au GM-CSF. Sur le plan fonctionnel, il pourrait être intéressant d'évaluer les capacités de ces deux types de M $\phi$  à activer des lymphocytes T par des techniques de co-culture ou encore de déterminer leur pouvoir d'attraction de lymphocytes activés de type Th1 à l'aide d'expériences de migration cellulaire.

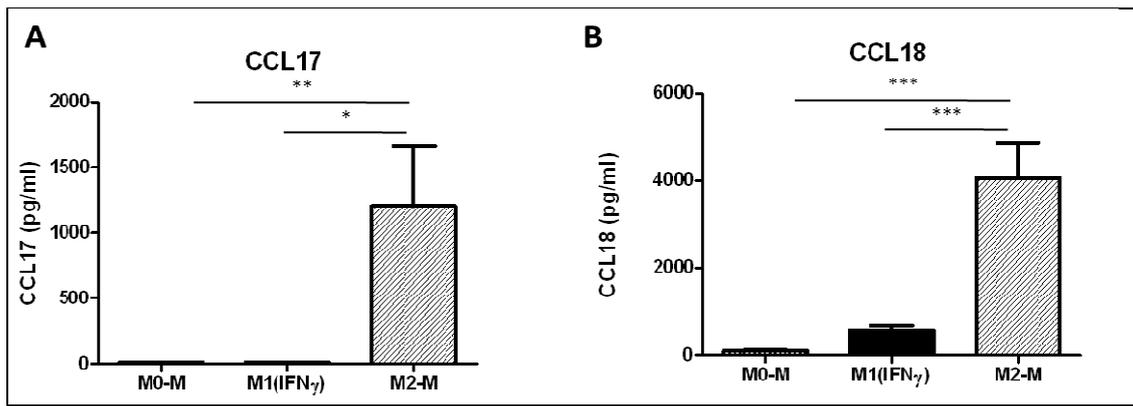
### *III.1.3.2.3. Comment compléter et caractériser le répertoire d'expression des M $\phi$ humains polarisés M1 et M2 ?*

L'activation des M $\phi$  est associée avec le changement d'expression de centaines de gènes en fonction de stimuli spécifiques. Ainsi, la caractérisation de cet état d'activation par l'expression de marqueur de surface est nécessaire mais, seule, elle reste insuffisante. Il est donc important de combiner cette approche de phénotypage à l'analyse de l'expression génique de marqueurs discriminants. En accord avec les données antérieures de Martinez et al. (2006) (343), nous avons retrouvés au cours de ce travail, certains gènes surexprimés dans les M $\phi$  M1-M comparés aux M $\phi$  M2 tels que CXCL10, CXCL11, CCL5, CCR7, et IDO1. Nous montrons également *a contrario* des données publiées par Verreck et al. (280, 381) que ces M $\phi$  activés classiquement sécrètent des

quantités plus importantes de cytokines comme le TNF $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et l'IL-12p40, et la chimiokine CXCL10 comparés aux M $\phi$  non polarisés et aux M $\phi$  M2. Ces résultats ont récemment été appuyés par Edin et al. (2013) (380) et Vogel et al. (2014) (378).

Les M $\phi$  M2 présentent quant à eux une expression plus forte des transcrits de TGF $\beta$ , PPAR $\gamma$ , CCL22 et des récepteurs scavengers CD36 et SR-B1 comparée aux M $\phi$  M1-M. L'expression des transcrits de CCL17 est supérieure dans les M $\phi$  M2 comparés aux M $\phi$  M0, cependant dans notre modèle, cette différence n'est pas significative, contrairement à Martinez et al. (2006) (343). Toutefois, Edin et al. (2013) (380) observent également une expression génique de CCL17 quasi identique entre les M $\phi$  M1 et les M2. De telles différences peuvent s'expliquer d'une part par la grande variabilité de réponse au niveau de l'expression de CCL17 dans nos cultures primaires humaines. D'autre part, si l'on compare les M $\phi$  activés classiquement en présence d'IFN $\gamma$  seul aux M $\phi$  M2 ou M0, des données complémentaires montrent une expression de CCL17 significativement plus importante dans les M $\phi$  M2 (**Figure 31**) suggérant une influence du LPS sur l'expression génique de CCL17. De plus, bien que non significatifs, nos résultats montrent une sécrétion supérieure de CCL17 dans les M $\phi$  M2 comparés aux M $\phi$  M1-M qui n'apparaît pas à l'échelle de l'ARNm. Ces données impliquent que l'expression de CCL17 comme marqueur M2 est peut-être plus pertinente à observer au niveau protéique qu'au niveau transcriptionnel après 24 heures de polarisation. Finalement, en augmentant le nombre de réplicats biologiques, nous avons établi de façon significative le fait que CCL17 est bien un marqueur M2 au niveau protéique (**Figure 31**). Depuis cette étude, nous avons également validé la plus forte expression de la chimiokine CCL18 dans les M $\phi$  M2 comparés aux M $\phi$  M1-M activés en présence d'IFN $\gamma$  (**Figure 31**). Nous retrouvons également une expression et une sécrétion accrue de la chimiokine CCL22 dans nos M $\phi$  M2 comparés aux deux autres types M0-M et M1-M (**article 1, Fig 5**). Ainsi, la sécrétion de la chimiokine CCL17 associée à celle de CCL22 et de CCL18 par les M $\phi$  M2 humains suggère fortement que ces cellules sont capables d'attirer des lymphocytes de type Th2 ou régulateurs qui expriment CCR4 (384, 389, 390).

De telles différences dans l'expression des marqueurs M1 et M2 peuvent s'expliquer par l'expression préférentielle de certains facteurs de transcription dans les 2 sous types de M $\phi$  activés M1 et M2. Les membres de la famille NF- $\kappa$ B par exemple, en coopération avec ceux des IRF peuvent être activés par la stimulation des TLR (363). Pour appuyer ces données, notre étude montre que l'expression de tous les membres de la famille NF- $\kappa$ B ainsi que IRF1, IRF3 et IRF4 sont induit après 24 h de stimulation par IFN $\gamma$ /LPS dans les M $\phi$  M1.



**Figure 31: Sécrétion des chimiokines CCL17 et CCL18 par les macrophages humains polarisés différenciés au M-CSF.** Après 6 jours de différenciation en présence de M-CSF, les macrophages sont activés ou non en présence d'IFN $\gamma$  ou d'IL-4 pendant 24 h additionnelles pour obtenir respectivement des macrophages M0-M, M1 (IFN $\gamma$ ) et M2-M. Les niveaux de CCL17(A) et de CCL18 (B) dans les milieux de culture sont déterminés par technique ELISA. Les données sont exprimées en pg/ml et représentent la moyenne  $\pm$  SEM d'au moins 8 expériences indépendantes.\* $p$ <0.05 \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001.

Cependant, une étude menée par Satoh et al. (2010) (391) montre que la polarisation M2 des M $\phi$  est contrôlée par un axe de signalisation impliquant une histone déméthylase (Jumonji domain containing 3, Jmjd3) et sa cible IRF4. Ces résultats, en contradiction avec ceux que nous présentons pour IRF4, sont obtenus dans des modèles murins et restent par conséquent à vérifier chez l'Homme. De plus, une autre étude, toujours dans les M $\phi$  de souris, montre que l'expression de Jmjd3 peut être induite par une stimulation des TLR de façon NF- $\kappa$ B dépendante (392). La plus forte expression d'IRF4 que nous observons dans les M $\phi$  M1 comparés aux M $\phi$  M2 pourrait également être liée à l'activation du promoteur de IRF4 par le TNF $\alpha$ , présent dans les milieux de culture des M $\phi$  M1, *via* la voie NF- $\kappa$ B (393). Dans le même ordre d'idée, nous observons une augmentation faible et non significative de l'expression d'IRF8 dans les M $\phi$  M1 alors que l'expression transcriptionnelle de ce dernier est reconnue comme induite par l'IFN $\gamma$  (394). Ce résultat peut être une conséquence de la sécrétion d'IL-10 que nous observons dans les M $\phi$  M1-M. Cette possible inhibition de l'activation d'IRF8 par l'IL-10 sous l'effet de l'IFN $\gamma$  et du LPS pourrait également expliquer la plus faible expression des transcrits d'IL-12p40, un gène cible d'IRF8, dans les M $\phi$  M1-M (395). Krausburger et al. (2011) (362) montrent que IRF5 joue un rôle important dans le contrôle de la polarisation M1. Nous ne retrouvons pas cette augmentation de l'expression d'IRF5 au niveau des ARNm dans les M $\phi$  M1-M. Cette différence tient probablement au fait que IRF5 est induit dans les M $\phi$  différenciés au GM-CSF et non au M-CSF (362). Récemment, une étude a identifié Klf6 comme un régulateur transcriptionnel de la polarisation M1 des M $\phi$  chez l'Homme et chez la souris (396). Klf6 en coopération avec NF- $\kappa$ B semble nécessaire pour l'induction optimale de l'expression de gènes pro-

inflammatoires par le LPS et l'IFN $\gamma$ . Par ailleurs, les auteurs montrent que *klf6* inhibe l'expression des gènes anti-inflammatoires en régulant négativement l'expression de PPAR $\gamma$  dans les M $\phi$  murins. Ces nouvelles données concordent avec ce que nous obtenons pour l'expression de PPAR $\gamma$ , diminuée dans les M $\phi$  M1-M et induite dans les M $\phi$  M2 ([article 1, Fig 3](#)). Il serait alors intéressant d'analyser l'expression de *klf6* dans nos modèles de M $\phi$  humains afin de mettre à jour d'éventuelles variations d'expression pouvant affecter les différences d'amplitude du phénotype M1 observées dans les M $\phi$  différenciés au GM-CSF et au M-CSF.

Concernant les facteurs de transcription contrôlant la polarisation M2, nous observons une augmentation de l'expression de PPAR $\gamma$  et *Egr2* sous l'effet de l'IL-4 dans nos M $\phi$  M2 ([article 1, Fig 3](#)). Ces données sont confortées par des travaux récents qui montrent que PPAR $\delta$  ainsi que PPAR $\gamma$  sont requis dans l'amplitude de l'état d'activation M2 (397, 398). Il est important de tenir compte du temps de stimulation auquel l'expression de ces facteurs de transcription est analysée. Les différences observées peuvent en partie être dues à des cinétiques d'induction des ARNm plus précoces. Une stimulation de 24h peut ainsi être un peu tardive pour obtenir une induction maximale de l'ARNm. Cet argument peut justifier que nous ne retrouvons pas d'induction de *klf4* dans les M $\phi$  M2 contrairement aux données de Liao et al., (2011) (399).

C'est pourquoi, afin d'étudier l'implication de facteurs de transcription ou d'autres protéines dans le contrôle de la polarisation des M $\phi$ , nous préconisons une caractérisation protéique de l'expression de ces facteurs à des temps plus précoces. Il serait également utile de combiner cette caractérisation à des approches génétiques à l'aide de mutants invalidés.

**En conclusion, nous avons caractérisé l'expression génique de cytokines, de chimiokines, de récepteurs scavengers et de facteurs de transcription exprimés différemment entre les M $\phi$  humains M1 et M2 issus d'une différenciation *in vitro* au M-CSF. Utilisés en combinaison des marqueurs phénotypiques membranaires ou sécrétés, ces marqueurs géniques peuvent être des outils complémentaires pour la caractérisation de l'état d'activation des M $\phi$  *in vivo*.**

#### *III.1.3.2.4. Comment appréhender et transposer les différences Homme vs souris ?*

Cette question continue de confondre les chercheurs en partie parce que les M $\phi$  humains sont issus des monocytes du sang au contraire des M $\phi$  murins qui proviennent de la moelle osseuse ou des tissus. Cette distinction est particulièrement importante considérant les nouvelles connaissances qui montrent que de nombreuses populations de M $\phi$  résidents au sein des tissus n'ont pas comme origine la moelle osseuse (400, 401). Nombre de marqueurs utilisés pour qualifier les M $\phi$  murins ne sont donc pas transposables à l'Homme. Plusieurs raisons peuvent expliquer cette variabilité inter-espèce comme

des pressions évolutives différentes qui ont conduit à l'apparition ou à la disparition de gènes homologues, des restrictions pour le trophisme de certains pathogènes ou encore des régimes alimentaires ou une longévité différentes. La différence majeure qu'il existe entre les deux espèces en termes d'expression de marqueurs concerne le métabolisme de l'arginine pour la production de NO. L'expression de la iNOS et de l'arginase-1 caractéristiques respectivement de la polarisation M1 et M2 chez la souris est absente dans les M $\phi$  M1 et M2 humains (402). **Nos données renforcent également cette notion qu'il existe des différences fondamentales entre la souris et l'Homme.** Ainsi, le récepteur au mannose CD206 est un marqueur typique de l'activation M2 dans les M $\phi$  de souris (344, 403). Cependant dans nos M $\phi$ , bien que son expression tende à augmenter sous l'effet de l'IL-4 dans les M $\phi$  M2-M, elle atteint des niveaux équivalents à ceux des M $\phi$  différenciés au GM-CSF (**Figure 28C**). Ces données, appuyées par d'autres études *in vitro* (377, 379), suggèrent que l'utilisation du CD206 chez l'Homme comme seul marqueur de l'activation alternative des M $\phi$  n'est pas spécifique et doit être réévaluée. Nous montrons donc, conformément aux données publiées par Ambarus et al. (2012) (379), que chez l'Homme, l'expression du CD200R est plus spécifique de l'activation M2 que celle du CD206. De plus, dans notre modèle l'expression du CD80 constitue un bon marqueur de l'activation M1 des M $\phi$ . L'existence d'homologues entre les deux espèces complexifie encore la transposition des phénotypes de M $\phi$  activés murins à l'Homme. Ainsi, nous ne retrouvons pas d'augmentation de l'expression de la chimiokine CCL2 au cours de la polarisation M1 ou M2 des M $\phi$  humains différenciés au M-CSF (**Article, Fig 5**) alors qu'elle est induite au cours de la polarisation M1 chez la souris (271). Cette discordance peut s'expliquer par le fait que l'homologue humain du CCL2 murin n'est pas CCL2 mais la chimiokine CCL13 (352). Par conséquent, nos données impliquent que la chimiokine CCL2 ne doit pas être considérée comme un marqueur de polarisation humain mais discrimine plutôt le type de différenciation des M $\phi$  au M-CSF comparés au GM-CSF (**Figure 29**). De même, l'expression de la chimiokine CCL18 que nous montrons comme caractéristique de l'activation M2 des M $\phi$  humains semble seulement présente chez les primates (329).

**Au final, afin de clarifier les marqueurs pertinents pour caractériser l'état d'activation des M $\phi$ , il est intéressant d'envisager des études comparant systématiquement les réponses des M $\phi$  dérivés des monocytes sanguins de souris et d'Homme. Récemment, des études ont exploré la conservation phylogénétique entre les M $\phi$  provenant de différentes espèces, y compris les porcs, où un grand nombre de M $\phi$  tissulaires peuvent être isolés (404–407).**

### ***III.1.3.3. Limite de l'étude***

Les changements géniques et phénotypiques décrits dans cette étude sont issus de modèles humains *in vitro* dans lesquels les M $\phi$  ont été différenciés puis activés dans des conditions contrôlées. Ils constituent un outil important pour l'étude approfondie du statut d'activation des M $\phi$ . Toutefois, transposer les résultats obtenus *in vivo* nécessite des études complémentaires. La caractérisation *ex vivo* de M $\phi$  humains notamment, reste encore à mener afin de prouver la pertinence de ces marqueurs *in vivo* en conditions physiologiques et dans différentes pathologies. Il faut également moduler ces résultats en tenant compte du temps de stimulation auquel l'expression des marqueurs est analysée. En effet, un temps de stimulation de 24h est probablement un peu tardif, en particulier lorsque l'on étudie l'expression transcriptionnelle de certains gènes qui peuvent être régulés précocement et/ou de façon transitoire. Ce biais est cependant atténué lorsque l'on se place à l'échelle de la protéine.

Il faut garder à l'esprit que plusieurs paramètres peuvent affecter l'état d'activation des M $\phi$  dans le temps incluant (i) le retrait du stimulus, (ii) l'établissement de boucle d'amplification ou de rétroaction, y compris la production autocrine de cytokines, et (iii) l'épigénétique (363, 377, 408, 409).

### ***III.1.3.4. Conclusion et perspectives***

Notre étude sur la caractérisation *in vitro* des M $\phi$  humains en culture primaire a permis d'améliorer les connaissances sur leur plasticité. De plus, nos résultats soutiennent la notion que les M $\phi$  M-CSF peuvent s'activer complètement aussi bien en M $\phi$  M1 après stimulation à l'IFN $\gamma$ /LPS qu'en M $\phi$  M2 en présence d'IL-4. Ces données confirment ainsi que le modèle de M $\phi$  différencié au M-CSF peut, à l'avenir, servir de référence pour l'étude de l'activation *in vitro* des M $\phi$ . Par ailleurs, nos résultats nous poussent à reconsidérer la terminologie M1/M2 s'agissant des M $\phi$  différenciés au GM-CSF et au M-CSF respectivement. Finalement, ces données montrent qu'il faut être prudent dans le choix des marqueurs d'activation des M $\phi$  et que certains marqueurs communément admis chez la souris sont à reconsidérer chez l'Homme au vue des variations inter-espèces. En conséquence, nous privilégions une approche utilisant des combinaisons de marqueurs (ou une absence d'expression du marqueur) afin d'attribuer un phénotype d'activation précis aux M $\phi$  comme récapitulé dans le **Tableau 4**. Il nous semble à ce jour évident d'élargir le simple phénotypage des M $\phi$  à des marqueurs membranaires en prenant en compte également l'expression génique de facteurs de transcription et aussi la sécrétion de cytokines et de chimiokines.

Comprendre le comportement des M $\phi$  est fondamental pour décrypter la pathogénèse de nombreuses maladies qu'elles soient métaboliques, allergiques, infectieuses, autoimmunes ou encore tumorales. Le travail réalisé ici constitue un outil utile pour caractériser le statut d'activation des M $\phi$

humains et peut avoir différentes applications. **Tout d'abord il permet l'étude *in vitro* de la régulation des M $\phi$  humains. La caractérisation *in vivo* ou *ex-vivo* des différents sous-types de M $\phi$  présents au niveau tissulaire ou à l'échelle de l'organe dans des contextes pathologiques constitue une deuxième application potentielle qui peut être envisagée grâce aux connaissances acquises sur ces modèles *in vitro*. Finalement, les marqueurs mis en évidence ici peuvent permettre d'associer un phénotype particulier de M $\phi$  à la fonction qu'il soutient *in vivo*. En effet, lorsque les M $\phi$  sont isolés à partir de tissus afin d'analyser leur état d'activation, il apparaît peu probable que ceux-ci se situent exactement dans les groupes définis *in vitro*. Cependant, grâce aux nombreux marqueurs mis en évidence par les données accumulées *in vitro*, il sera maintenant possible de les replacer au plus près d'un des sous-groupes établis. La caractérisation *ex-vivo* des M $\phi$  fournira également davantage d'informations qui viendront s'ajouter à celles déjà connues pour mieux appréhender l'activation des M $\phi$  *in vivo*.**

### III.2. Article 2:

## **Exposure to diesel exhaust particle extracts (DEPe) impairs some polarization markers and functions of human macrophages through activation of AhR and Nrf2.**

Marie JAGUIN, Olivier FARDEL, and Valérie LECUREUR

*PLOS ONE* (2015) doi:10.1371/journal.pone.0116560

#### *III.2.1. Contexte de l'étude*

Les particules de type diesel (DEP) constituent une part importante de la pollution atmosphérique mondiale. Elles sont formées d'un noyau carboné sur lequel peuvent s'adsorber, de nombreux composés chimiques comme les HAP ou les quinones. Ces composés peuvent être désorbés et dissous après le dépôt des DEP au niveau pulmonaire et ainsi agir localement ou de façon systémique. Différentes études épidémiologiques associent l'exposition aux DEP et plus généralement à la pollution atmosphérique urbaine à des effets néfastes sur la santé humaine. Les DEP favorisent et/ou aggravent les maladies cardiovasculaires, les maladies allergiques respiratoires telles que l'asthme ou encore le cancer du poumon principalement (410, 411).

Comme nous l'avons détaillé dans les chapitres précédents, l'hétérogénéité des M $\phi$  et leurs rôles dans la genèse et le développement de nombreuses pathologies dépendent de leur état d'activation schématiquement divisés en deux sous-types M1 et M2. Notre précédente étude a permis d'établir et de bien caractériser des modèles de M $\phi$  humains polarisés *in vitro* dans un cadre toxicologique afin d'étudier l'impact des particules diesel sur l'activation de ces cellules. Dans ce contexte, les M $\phi$  différenciés au GM-CSF auraient, à première vue, été des modèles plus pertinents car assimilés aux M $\phi$  alvéolaires. Cependant, comme nous l'avons détaillé précédemment, ils ne constituent pas le modèle de référence quand on s'intéresse à l'activation des M $\phi$ .

Les DEP peuvent réguler à la fois l'expression de médiateurs pro-inflammatoires et d'enzymes anti-oxydantes dans de nombreux types cellulaires incluant les cellules épithéliales, les cellules endothéliales et les cellules immunitaires comme les M $\phi$ . Les données publiées par notre laboratoire et d'autres équipes montrent ainsi que le M $\phi$  constitue un modèle de choix pour les études toxicologiques sur les effets des HAP (89, 235, 412, 413); et représente également une cible cellulaire clef des particules (414).

Selon le contexte, les DEP peuvent exercer, en particulier sur les M $\phi$  alvéolaires, des effets pro-inflammatoires et immunosuppresseurs en diminuant notamment la libération de cytokines (226, 228, 415, 416). Bien que les mécanismes moléculaires impliqués dans de tels effets restent encore mal connus, deux familles de composants présents sur les particules, les HAP et les quinones peuvent y participer. Les HAP contenus dans les DEP peuvent activer le récepteur Ah (AhR) et la détoxification des quinones présentes dans les DEP nécessitent l'enzyme de phase II NADPH-quinone oxidoreductase-1 (NQO1) induite par l'activation de Nrf2 (414, 416). Les modalités d'activation d'AhR et de Nrf2 ont été détaillées dans la revue bibliographique paragraphes I.1.3.3 et I.1.3.4. De manière intéressante, les deux facteurs AhR et Nrf2 ont également un rôle physiologique dans la régulation immunitaire. Ainsi, AhR est impliqué dans l'expression de cytokines (417) et la régulation immunitaire (418) tandis que les gènes régulés par Nrf2 contrôlent l'inflammation et la tolérance immunitaire (419).

Les DEP sont capables d'altérer la différenciation et la fonction des monocytes humains (219) ainsi que celle d'autres cellules du lignage myéloïde comme les cellules dendritiques (201, 205, 207, 420). De plus, des études ont montré que les M $\phi$  alvéolaires de patients atteints de BPCO tabagique et les M $\phi$  murins exposés à des extraits de fumée de cigarette pouvaient se reprogrammer vers un phénotype de type M2 (421, 422). Ces données suggèrent que les mélanges complexes contenant des HAP comme la fumée de cigarette ou les particules diesel peuvent perturber la polarisation des M $\phi$ .

**Dans ce contexte, notre étude évalue l'impact des extraits de particules diesel (DEPe) sur la mise en place des programmes de polarisation M1 et M2 dans les M $\phi$  humains et l'implication des facteurs AhR et Nrf2 dans ce processus.**

Les résultats principaux de cette étude montrent que :

- (1) Les deux types de M $\phi$  M1 et M2 sont sensibles aux DEPe. Cependant, l'effet des DEPe semble être gène-spécifique et ne dépend pas d'un type de polarisation.
- (2) L'exposition des M $\phi$  aux DEPe pendant l'activation M2 diminue l'expression d'un récepteur inhibiteur de l'inflammation le CD200R.
- (3) Les DEPe diminuent la capacité des M $\phi$  M1 à sécréter des médiateurs induisant une réponse immunitaire de type Th1 telle que la chimiokine CXCL10 et les cytokines IL-6 et IL-12p40 après stimulation au LPS.
- (4) La diminution de sécrétion des chimiokines CCL17, CCL18 et CCL22 par les M $\phi$  exposés aux DEPe au cours de leur activation M2 est associée à une capacité

chimiotactique réduite notamment sur l'attraction des cellules exprimant le récepteur cible CCR4.

- (5) Les voies AhR et Nrf2 sont activées dans les deux types de M $\phi$ .
- (6) La diminution d'IL-6 induite par le LPS dans les M $\phi$  M1 exposés au DEPe est dépendante d'Ahr et de Nrf2 tandis que celle de l'IL-12p40 et de CCL18 dans les M $\phi$  M2 dépend seulement de l'activation d'AhR.



RESEARCH ARTICLE

# Exposure to Diesel Exhaust Particle Extracts (DEPe) Impairs Some Polarization Markers and Functions of Human Macrophages through Activation of AhR and Nrf2

Marie Jaguin<sup>1</sup>, Olivier Fardel<sup>1,2</sup>, Valérie Lecqueur<sup>1\*</sup>

**1** UMR INSERM U1085, Institut de Recherche sur la Santé, l'Environnement et le Travail (IRSET), Université de Rennes 1, 2 avenue du Pr Léon Bernard, 35043, Rennes, France, **2** Pôle Biologie, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Rennes, 2 rue Henri Le Guilloux, 35033, Rennes, France

\* [valerie.lecqueur@univ-rennes1.fr](mailto:valerie.lecqueur@univ-rennes1.fr)



OPEN ACCESS

**Citation:** Jaguin M, Fardel O, Lecqueur V (2015) Exposure to Diesel Exhaust Particle Extracts (DEPe) Impairs Some Polarization Markers and Functions of Human Macrophages through Activation of AhR and Nrf2. PLoS ONE 10(2): e0116560. doi:10.1371/journal.pone.0116560

**Academic Editor:** Carolyn J. Baglole, McGill University, CANADA

**Received:** September 4, 2014

**Accepted:** December 9, 2014

**Published:** February 24, 2015

**Copyright:** © 2015 Jaguin et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This work was supported by "Fondation Coeur et Artères" (FCA 09T3), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and the University of Rennes 1. MJ is a recipient of a fellow from the French Ministry of Research. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## Abstract

Macrophages (MΦ), well-known to play an important role in immune response, also respond to environmental toxic chemicals such as diesel exhaust particles (DEP). Potential effects of DEPs towards MΦ polarization, a key hall-mark of MΦ physiology, remain however poorly documented. This study was therefore designed to evaluate the effects of a reference DEP extract (DEPe) on human MΦ polarization. Human blood monocytes-derived MΦ were incubated with IFN $\gamma$ +LPS or IL-4 to obtain M1 and M2 subtypes, respectively; a 24 h exposure of polarizing MΦ to 10  $\mu$ g/ml DEPe was found to impair expression of some macrophagic M1 and M2 markers, without however overall inhibition of M1 and M2 polarization processes. Notably, DEPe treatment increased the secretion of the M1 marker IL-8 and the M2 marker IL-10 in both MΦ subtypes, whereas it reduced lipopolysaccharide-induced IL-6 and IL-12p40 secretion in M1 MΦ. In M2 MΦ, DEPe exposure led to a reduction of CD200R expression and of CCL17, CCL18 and CCL22 secretion, associated with a lower chemotaxis of CCR4-positive cells. DEPe activated the Nrf2 and AhR pathways and induced expression of their reference target genes such as Hmox-1 and cytochrome P-4501B1 in M1 and M2 MΦ. Nrf2 or AhR silencing through RNA interference prevented DEPe-related down-regulation of IL-6. AhR silencing also inhibited the down-secretion of IL-12p40 and CCL18 in M1- and M2-DEPe-exposed MΦ, respectively. DEPs are therefore likely to alter expression of some M1 and M2 markers in an AhR- and Nrf2-dependent manner; such regulations may contribute to deleterious immune effects of atmospheric DEP.

## Introduction

Previous epidemiological studies have indicated that exposure to ambient particulate matter (PM) is linked to increase in mortality and morbidity related to cardio-pulmonary diseases [1]. Moreover, urban air pollution may contribute to exacerbations of asthma and to allergic airway

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

diseases [2], but also to progression of atherosclerosis in both animal experimental models and humans [3]. Such adverse effects are more closely associated to PM with a diameter less than 2.5  $\mu\text{m}$  (PM<sub>2.5</sub>) such as diesel exhaust particulates (DEP) containing adsorbed organic compounds, and to their ability to increase the release of pro-inflammatory mediators by epithelial, endothelial cells and immune cells, leading to inflammation.

Monocytes and macrophages (M $\Phi$ ) play a key role in innate and adaptive immunity and inflammation. After release from bone marrow to blood, monocytes are recruited to tissues where, according to the nature of environmental signals, they can develop into myeloid dendritic cells or various forms of M $\Phi$ . The “classically activated M $\Phi$ ” or M1 type generated by IFN $\gamma$  followed by LPS stimulation produce high pro-inflammatory cytokines such as TNF $\alpha$  and IL-12/IL-23 and play a role in tissue destruction [4]. In contrast, IL-4- or IL-13-stimulated M $\Phi$ 's, so-called M2 M $\Phi$  or “alternative activated M $\Phi$ ”, express membrane receptors such as scavenger receptors and mannose receptor CD206, fail to produce IL-12 cytokine but they release anti-inflammatory cytokines like IL-10 and IL-1RA and some Th2 chemokines such as CCL17 (TARC), CCL18 (PARC) and CCL22 (MDC); such M2 M $\Phi$  are involved in tissue remodelling and wound repair [4–5]. Overall, type M1 M $\Phi$  support the Th1 response whereas type M2 M $\Phi$ 's support of Th2 response.

Interestingly, DEP have been shown to up-regulate both pro-inflammatory mediators and antioxidant enzymes in various cells, including M $\Phi$ , which appear as a key cell type targeted by DEP [6–7]. DEP have also immunosuppressive effects through reducing cytokine release, notably by alveolar M $\Phi$  [8–10]. Mechanisms involved in DEP effects towards M $\Phi$  are however poorly understood. Two main families of compounds adsorbed on DEP, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and quinones, are likely to contribute to them, at least in part. Mechanistically, PAHs bind to the cytosolic aryl hydrocarbon receptor (AhR), which then migrates to the nucleus where the ligand/AhR complex heterodimerizes with the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) protein. This activated receptor-ligand complex next interacts with the xenobiotic-response element (XRE) in the promoter regions of target genes such as the phase I metabolizing enzymes cytochrome (CYP) 1A1 and 1B1. DEP extracts (DEPe) have been shown to activate AhR and to increase pro-inflammatory cytokine expression in the human monocytic U937 cell line [6]; they also induce intracellular ROS generation through CYP system in M $\Phi$  and human airway epithelial cells [11–12]. Moreover, AhR is involved in cytokine expression [13] and immune regulation [14]. The detoxification of quinones found in DEP requires the phase II enzyme NADPH-quinone oxidoreductase (NQO-1), a typical NF-E2-related factor 2 (Nrf2) target gene. In normal situations, Nrf2 protein action is repressed due to its interaction with the Keap1 protein, which results in proteosomal Nrf2 degradation. Upon oxidative and/or electrophilic stress, Nrf2 dissociates from Keap1, translocates into the nucleus, dimerizes with a small Maf protein and then binds to an antioxidant response element (ARE) found in the promoter regions of Nrf2 target genes such as antioxidant and phase II detoxification enzymes. DEPe has thus been shown to up-regulate expression of heme oxygenase-1 (HO-1) and some detoxification enzymes via ARE, in order to protect against pro-inflammatory effects of particulate pollutants in the murine macrophagic RAW 264.7 cell line [15–16]. Moreover, emerging evidence suggests that Nrf2-regulated genes may control inflammation and immune tolerance [17]. Thus, Nrf2-deficient mice exhibit more susceptibility to airway inflammation and emphysema after DEP inhalation and cigarette smoke, respectively [18–20]; moreover, Nrf2-deficient dendritic cells exposed to PM secrete more pro-inflammatory mediators than the wild-type cells [21], strongly suggesting a protective health effect of Nrf2 against air pollutants.

As DEP have been shown to impair some differentiation programs of the monocyte/ M $\Phi$  cell lineage, including dendritic cell maturation [22–24] and human monocyte differentiation

and function [25], and owing to the fact that polarization is a key feature of M $\Phi$  physiology, we examined the hypothesis that DEP extract (DEPe) may alter agonist-induced human M $\Phi$  polarization process in the present study. Our results indicate that exposure to DEPe impaired expression of some macrophagic M1 and M2 markers, in an AhR- and Nrf2-dependent manner.

## Materials and Methods

### Chemicals and reagents

Human recombinant IL-4 and IFN $\gamma$  were purchased from Peprotech (Neuilly sur Seine, France) whereas human recombinant M-CSF was obtained from Miltenyi Biotec SAS (Paris, France). Lipopolysaccharide (LPS) from *E. Coli* (serotype:055:B5), phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA), fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran, tert-butylhydroquinone (tBHQ), dimethylsulfoxide (DMSO), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT) and benzo(a)pyrene (B(a)P) were purchased from Sigma–Aldrich (St Louis, MO) whereas 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) was obtained from Cambridge Isotope Laboratories (Cambridge, MA). Standard Reference Material 1975 (SRM1975), corresponding to DEPe resulting from dichloromethane-based extraction of DEP, was purchased from the National Institute of Standards and Technology (Gaithersburg, USA); dichloromethane was evaporated under nitrogen gas and the residue was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) for cell exposure to obtain a stock solution at 10 mg/ml. Final concentration of solvent DMSO in culture medium did not exceed 0.2% (v/v); control cultures received the same dose of solvent as treated counterparts.

### Polarization and exposure of human primary M $\Phi$

Monocytes were purified from peripheral blood mononuclear cells obtained, as previously described [26]. Blood buffy coats of healthy subjects were provided by “Etablissement Français du sang” (EFS) after their written consent to use their blood sample for research. EFS is the Blood national french agency which has the authorization to supply blood sample from healthy subjects (French law No 93–5 of January 4th, 1993) without requirement of an ethic committee. Monocytes were then differentiated into M $\Phi$  by treatment by M-CSF (50 ng/ml) for 6 days in RPMI 1640 medium (Gibco) supplemented with 2 mM glutamine, 10% decomplexed fetal calf serum (FCS), 100 IU/ml penicillin and 100  $\mu$ g/ml streptomycin. To study DEPe effect during M $\Phi$  polarization, M $\Phi$  ( $1 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>) were next exposed for 24 h to a fresh medium supplemented with 5% FCS and containing IFN $\gamma$  (20 ng/ml) (for getting type M1 M $\Phi$ ) or M-CSF (10 ng/ml) + IL-4 (20 ng/ml) (for getting type M2 M $\Phi$ ) [27], in absence or presence of DEPe. To study DEPe effect on already polarized M $\Phi$ , M1 or M2 M $\Phi$ , previously generated as described above, were exposed to DEPe for additional 24 h. The experiments were done in accordance with the World Medical Association declaration of Helsinki (1997) [28].

### Cell viability

Cytotoxic effect of DEP treatment toward primary human M $\Phi$  was assessed using the 3-(4–5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) colorimetric assay. Briefly, 4-days differentiated M $\Phi$  were seeded in 96-well plates at  $1 \times 10^5$  cells/well to achieve their differentiation. Six days-old M $\Phi$  were then exposed for 24 h to various concentration of DEPe during M1 or M2 polarization triggered as described above. Cells were then incubated with 100  $\mu$ l of MTT solution (0.5 mg/ml) for 2 h at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Medium was thereafter discarded and replaced by 100  $\mu$ l of DMSO. Blue formazan formed products were

further quantified by their absorbance at 540 nm using SPECTROstar Nano (BMG Labtech, Ortenberg, Germany).

### Transfection of si RNAs

SMARTpool of individual siRNAs directed against human Nrf2 (si Nrf2) (reference J-003755–12), AhR (si AhR) (reference J-004990–05) and an untargeted sequence (si Ct), used as control, were from Dharmacon (Lafayette, CO, USA). Human M $\Phi$  ( $1 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>) were transfected using Lipofectamine RNA<sup>imax</sup> (Invitrogen) with 100 nM si Nrf2 for 16 h and 50 nM si AhR for 40 h. M $\Phi$  were then polarized into M1 and M2 types and exposed to DEPe for additional 8 h or 24 h. Silencing efficiency of targeted sequences was analyzed by RT-qPCR and Western blot analysis.

### Immunolabelling by flow cytometry

Phenotypic analysis of M $\Phi$  was performed using flow cytometric direct immunofluorescence. Cells rinsed in phosphate-buffered saline (PBS) were recovered from culture plates by gently scrapping. They were next incubated for 1 h in PBS with 5% human AB serum at 4°C to avoid nonspecific mAb binding. Several mouse mAbs were then used for immunolabelling: FITC-conjugated mAbs against CD64 (Becton Dickinson Biosciences, Le Pont de Claix, France) and PE-conjugated mAbs against CD200R and against CD71 provided from eBiosciences SAS (Paris, France). Isotypic control labeling was performed in parallel. Thereafter, cells were analysed with a FC500 flow cytometer (Beckman Coulter, Villepinte, France) using CXP Analysis software (Beckman Coulter). Values were expressed as the ratio of the mean fluorescence intensity (MFI) of the marker of interest over the MFI of the isotype control.

### Endocytosis assay

Briefly, M $\Phi$  exposed to DEPe or B(a)P during M1 or M2 polarisation were incubated with 1 mg/ml FITC-dextran wt 40 000 for 60 min at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Cellular uptake of FITC-dextran was then monitored by flow cytometry. A negative control was performed in parallel by incubating cells with FITC-dextran at 4°C instead of 37°C. Uptake of FITC-dextran was expressed as  $\Delta$ MFI, calculated by subtracting MFI measured for uptake at 4°C from that measured for uptake at 37°C, and as % of positive cells, i.e., % positive cells (uptake at 37°C)–% positive cells (uptake at 4°C).

### Quantification of cytokine and chemokine levels

Levels of TNF $\alpha$ , IL-8, IL-10, CXCL10, CCL17, CCL18, CCL22, IL-12p40, IL-12p70, IL-23, and IL-6 secreted in culture medium were quantified by ELISA using specific Duoset ELISA development system kits (R&D Systems).

### RNA isolation and reverse transcription-real time quantitative PCR analysis

Total RNA were isolated from primary M $\Phi$  using the TRIzol method (Invitrogen) and were then subjected to reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) analysis as previously described [29]. Gene-specific primers, presented in the Table 1, are intron-spanning and purchased from Sigma or as Quantitect (QT) primer assay from Qiagen. Amplification curves of the PCR products were analyzed with the ABI Prism SDS software using the comparative cycle threshold method. Relative quantification of the steady-state target

**Table 1. Primer sequence list.**

gene	Name	Forward primer	Reverse primer
18S	ARN 18S	5'-CGCCGCTAGAGGTGAAATTC-3'	5'-TTGGCAAATGCTTTCGCTC-3'
AhR	Aryl hydrocarbon receptor	5'-CTTCCAAGCGGCATAGAGAC-3'	5'-AGTTATCCTGGCCTCGGTTT-3'
BIRC3	Baculoviral IAP Repeat Containing 3	Qiagen PPH0032613–200	
CCL17	CC chemokine type 17	5'-AGCCATTCCCCTTAGAAAGC-3'	5'-CTGCCCTGCACAGTTACAAA-3'
CCL18	CC chemokine type 18	5'-TACCTCCTGGGCAGATTCCAC-3'	5'-CCCCTTCTTATTGGGGTCA-3'
CCL22	CC chemokine type 22	5'-ATTACGTCCGTTACCGTCTG-3'	5'-TAGGCTCTTCATTGGCTCAG-3'
CCL5	CC chemokine type 5	5'-CGCTGTATCCTCATTGCTA-3'	5'-GCACCTGCCACTGGTGTAGA-3'
CCR7	CC chemokine receptor type 7	5'-GTGGTGGCTCTCCTTGTCAT-3'	5'-TGTGGTGTGTCTCCGATGT-3'
CD36	Cluster of differentiation 36	5'-AGATGCAGCCTCATTCCAC-3'	5'-GCCTTGGATGGAAGAACAAA-3'
cox2	Cyclo-oxygenase 2	5'-GAATGGGGTGATGAGCAGTT-3'	5'-GCCACTCAAGTGTGCACAT-3'
CXCL10	CXC chemokine type 10	5'-CCACGTGTTGAGATCATTGGC-3'	5'-TTCTTGATGGCCTTCGATTC-3'
CXCL11	CXC chemokine type 11	5'-CCTGGGGTAAAAGCAGTGAA-3'	5'-TGGGATTTAGGCATCGTTGT-3'
CYP1B1	Cytochrome P450 1B1	5'TGATGGACGCCTTTATCCTC-3'	5'-CCACGACCTGATCCAATTCT-3'
FABP4	Fatty acid binding protein 4	5'-CCTTTAAAAATACTGAGATTT-3'	5'-GGACACCCCATCTAAGGTT-3'
GCLm	Glutamate-cysteine ligase regulatory subunit	5'-GCGAGGAGCTTCATGATTGT-3'	5'-CTGGAAACTCCCTGACCAAA-3'
Hmox-1	Heme oxygenase 1	5'-ACTTTCAGAAGGGCCAGGT-3'	5'-TTGTTGCGCTCAATCTCCT-3'
ICAM1	InterCellular Adhesion Molecule 1	Qiagen PPH0046OF-200	
IDO1	Indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase	5'-GCGCTGTTGAAATAGCTTC-3'	5'-CAGGACGTCAAAGCACTGAA-3'
IL10	Interleukin-10	5'-CCTGGAGGAGGTGATGCCCA-3'	5'-CCTGCTCCACGGCCTTGCTC-3'
IL-12p35	Interleukin-12 p35	5'-GATGGCCCTGTGCCTTAGTA-3'	5'-TCAAGGGAGGATTTTTGTGG-3'
IL-12p40	Interleukin-12 p40	5'-CTCGGCAGGTGGAGGTCAGC-3'	5'-TTGCGGCAGATGACCGTGGC-3'
IL-6	Interleukin-6	5'-AGGCACTGGCAGAAAACAAC-3'	5'-TTTTACCAGGCAAGTCTCC-3'
IL-8	Interleukin-8	5'-AAGAAACCACCGGAAGGAAC-3'	5'-AAATTTGGGGTGAAAGGTT-3'
LIPA	Lipase A	5'-GGATGAATTCTGGGCTTCA-3'	5'-TAGCCAGCTCAGGGATCTGT-3'
MRC1	Mannose receptor C type 1	5'-GGCGGTGACCTCACAAGTAT-3'	5'-ACGAAGCCATTTGGTAAACG-3'
NOS3	Nitric oxide synthase 3	Qiagen PPH01298F-200	
NQO1	NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1	5'-GCCGCAGACCTTGATATT-3'	5'-TTTCAGAATGGCAGGGACTC-3'
Nrf2	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2	5'-AAACCAGTGGATCTGCCAAC-3'	5'-AGCATCTGATTTGGGAATGTG-3'
PPARγ	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	5'-TTCAGAAATGCCTTGCAAGT-3'	5'-CCAACAGCTTCTCCTTCTCG-3'
PTGS1	Cyclooxygenase-1	Qiagen PPH01306F-200	
SLC7A5	Solute carrier family 7 member 5	5'-AATGCATTGGCCTCTGTACC-3'	5'-ACAGGACATGAGCGTGACAG-3'
SR-A1	Scavenger receptor A1	5'-CCTCGTGTTCAGTTCTCA-3'	5'-CCATGTTGCTCATGTGTTCC-3'
SR-B1	Scavenger receptor B1	5'-GTGTGGGTGAGATCATGTGG-3'	5'-GTTCCACTTGCCACGAGGT-3'
TGFβ	Transforming growth factor beta	5'-TGCGCTTGAGATCTTCAA-3'	5'-GGGCTAGTCGCACAGAACT-3'
TNC	Tenascin C	Qiagen PPH02442A-200	
TNFα	Tumor necrosis factor alpha	5'-AACCTCTCTCTGCCATC-3'	5'-ATGTTCTGCTCCTCACA-3'

doi:10.1371/journal.pone.0116560.t001

mRNA levels was calculated after normalization of the total amount of cDNA tested to an 18S RNA endogenous reference.

### Western blot analysis

Cells were harvested and lysed on ice with lysis buffer as previously described [30]. Then, cell lysates were sonicated on ice and protein concentration was quantified using the Bradford's method. Samples were analyzed by 10% SDS-PAGE, and then electroblotted overnight onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad). After blocking, membranes were hybridized with primary Abs overnight at 4°C; these primary Abs were directed against AhR (Biomol Research Labs,

Plymouth, PA, USA), Nrf2, HSC70 and p38 total (Santa Cruz Biotechnology, USA), knowing that the anti-Nrf2 antibody (H-300) recognizes two bands of Nrf2 around a size of 98–118 kDa [31]. After washing, blots were incubated with appropriate HRP-conjugated secondary Abs. Immunolabelled proteins were finally visualized by autoradiography using chemiluminescence.

## Cell migration assay

Chemotaxis assays were carried out with 12-wells plates exhibiting a 3  $\mu\text{m}$  pore size membrane (Corning, Amsterdam, NDL). Briefly,  $3.5 \times 10^5$  M2 M $\Phi$  were exposed for 24 h to DEPe during the polarization step as described above to obtain M2 M $\Phi$  conditioned medium;  $2 \times 10^5$  of T-lymphocyte H9 cells, placed in the upper chamber, were allowed to migrate towards M $\Phi$ -conditioned media for 4 h at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Cells which migrated across the membrane were harvested and subsequently counted by Malassez counting slide. Data were expressed as the number of migrated cells.

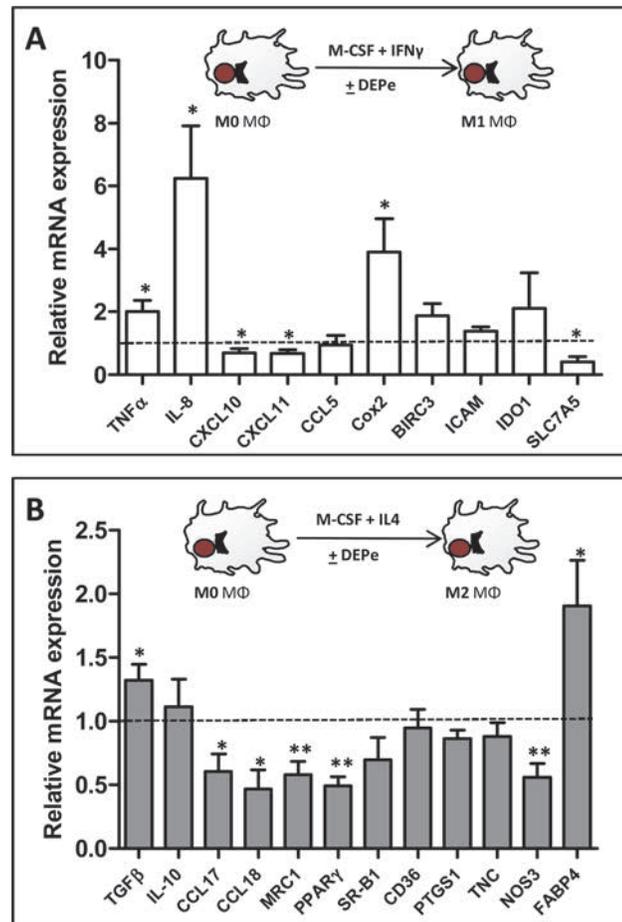
## Statistical analysis

The number of subjects and experiments used in each group is stated in the respective figures. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Significant differences were evaluated using Student's *t*-test or ANOVA followed by the Newman-Keuls multiple comparison test.

## Results

### DEPe effects on polarization marker expression in human M1 and M2 M $\Phi$

DEPe toxicity towards M $\Phi$  was first evaluated using the viability MTT assay; DEPe concentrations resulting in a loss of 50% of viability were found to be similar in M1 ( $IC_{50} = 59.5 \pm 14.4 \mu\text{g/ml}$ ) and in M2 M $\Phi$  ( $IC_{50} = 51.5 \pm 12.0 \mu\text{g/ml}$ ), allowing to retain, for further experiments, the non-toxic concentration of 10  $\mu\text{g/ml}$  of DEPe, as attested by the pictures of DEPe-treated macrophages (S1A Fig.). Moreover, a 24-h exposure to this DEPe concentration maximally induced mRNA expression of a reference DEP-target gene, the CYP1B1 (S2 Fig.) [32] [33]. DEPe effects towards a selection of various M1 and M2 macrophagic markers were next analysed by RT-qPCR in M $\Phi$  placed in M1 or M2 polarizing conditions. Polarization markers were chosen from our previous results [34] and from the study of Martinez et al. [27] and their validity and relevance in the present study, i.e., their preferential expression in M1 or M2 M $\Phi$ , was fully confirmed by RT-qPCR (S3 Fig.). Among the 10 classically activated M1 M $\Phi$  markers analysed by RT-qPCR, we found an induction of TNF $\alpha$ , cyclooxygenase-2 (*cox-2*) and IL-8 and a significant down-regulation of the chemokines CXCL10 and CXCL11 and of the aminoacid transporter SLC7A5 in DEPe-treated M1 M $\Phi$  when compared to their untreated counterpart (Fig. 1A); by contrast, mRNA expression of the M1 markers CCL5, BIRC3, ICAM and indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase (IDO1) remained unchanged in response to DEPe (Fig. 1A). For the 12 alternative activated M2 M $\Phi$  markers analysed by RT-qPCR, we found a significant up-regulation of TGF- $\beta$  and fatty acid binding protein 4 (FABP4), and a down-regulation of CCL17, CCL18, mannose receptor (MRC1), peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) and nitric oxide synthase 3 (NOS3) in DEPe-treated M2 M $\Phi$  when compared to their untreated counterparts (Fig. 1B); by contrast, mRNA levels of other typical M2 markers such as IL-10, scavenger receptor B1 (SR-B1), CD36, cyclooxygenase-1 (PTGS1) and tenascin C (TNC) were not modified in M2 M $\Phi$  exposed to DEPe (Fig. 1B). Altogether, these data demonstrated that DEPe exposure impaired the acquisition of several markers of classically (M1) and alternative (M2) M $\Phi$  polarization, without impairment of

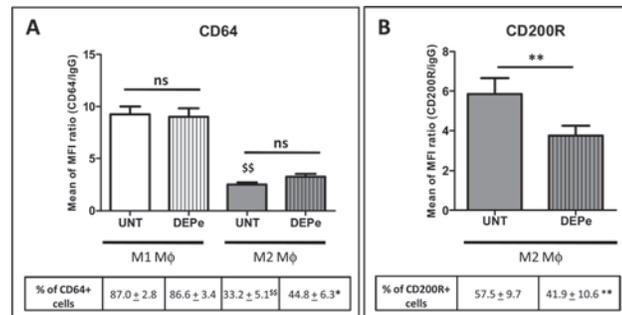


**Fig 1. Effects of DEPe on polarization marker mRNA expression during human MΦ polarization.** Six-day cultured M-CSF MΦ were activated with IFN $\gamma$  or with IL-4 to obtain M1 and M2 MΦ, respectively, in the presence of 10  $\mu$ g/ml DEPe or DMSO during 24 h. Cells were harvested and after total RNA isolation, mRNA levels were determined by RT-qPCR assays. Data are expressed relatively to mRNA levels found in control DMSO-exposed M1 (A) or M2 (B) MΦ, arbitrarily set at the value of 1 and are the means  $\pm$  SEM of at least 5 independent experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

doi:10.1371/journal.pone.0116560.g001

MΦ differentiation, as attested by the fact that DEPe failed to abolish the up-regulation of CD71 (S1B Fig), a marker well-known to be induced during differentiation of monocytes into MΦ. Such DEPe-mediated regulations of M1 and M2 markers were however likely not sufficient in intensity and in the number of regulated genes to overall switch the polarization program of MΦ, i.e., the global profile of M1 and M2 marker mRNA expression was not changed in a major way by DEPe in polarizing MΦ (S3 Fig). In particular, M1 markers down-regulated by DEPe such as CXCL10, CXCL11 and SLC7A5 remain much more expressed in DEPe-treated M1 MΦ than in M2 MΦ; in the same way, M2 markers down-regulated by DEPe such as CCL17, CCL18, MRC1, PPAR $\gamma$  and NOS3 remain much more expressed in DEPe-treated M2 MΦ than in M1 MΦ (S3 Fig).

Surface expression of the typical M1 marker FC $\gamma$  receptor 1 (CD64) [35] was next found to be not altered in DEPe-treated M1 MΦ when compared to untreated counterparts, for both MFI ratio and percentage of CD64-positive cells (Fig. 2A). DEPe also failed to change the low expression of this M1 marker in M2 MΦ (Fig. 2A) even if a significant difference in percentage of cells CD64+ was found between untreated and DEP-treated M2 MΦ (Fig. 2A). By contrast, both MFI expression of the inhibitory receptor CD200R, a M2 marker [35] and the percentage



**Fig 2. Effects of DEPe on cell surface antigen expression during human MΦ polarization.** Six-day cultured M-CSF MΦ were activated with IFNγ or with IL-4 to obtain M1 and M2 MΦ, respectively, in the presence of 10 μg/ml DEPe or DMSO (UNT) during 24 h. Cells were then stained with conjugated mAbs directed against the surface markers CD64 (A) and CD200R (B) and then analyzed by flow cytometry. Histograms represent the means of fluorescence intensity (MFI) ratio + SEM of 9 independent experiments. \*p<0.05 and \*\*p<0.01 when compared with its control counterpart, §§p<0.01 when compared to UNT M1 MΦ; ns: not significant.

doi:10.1371/journal.pone.0116560.g002

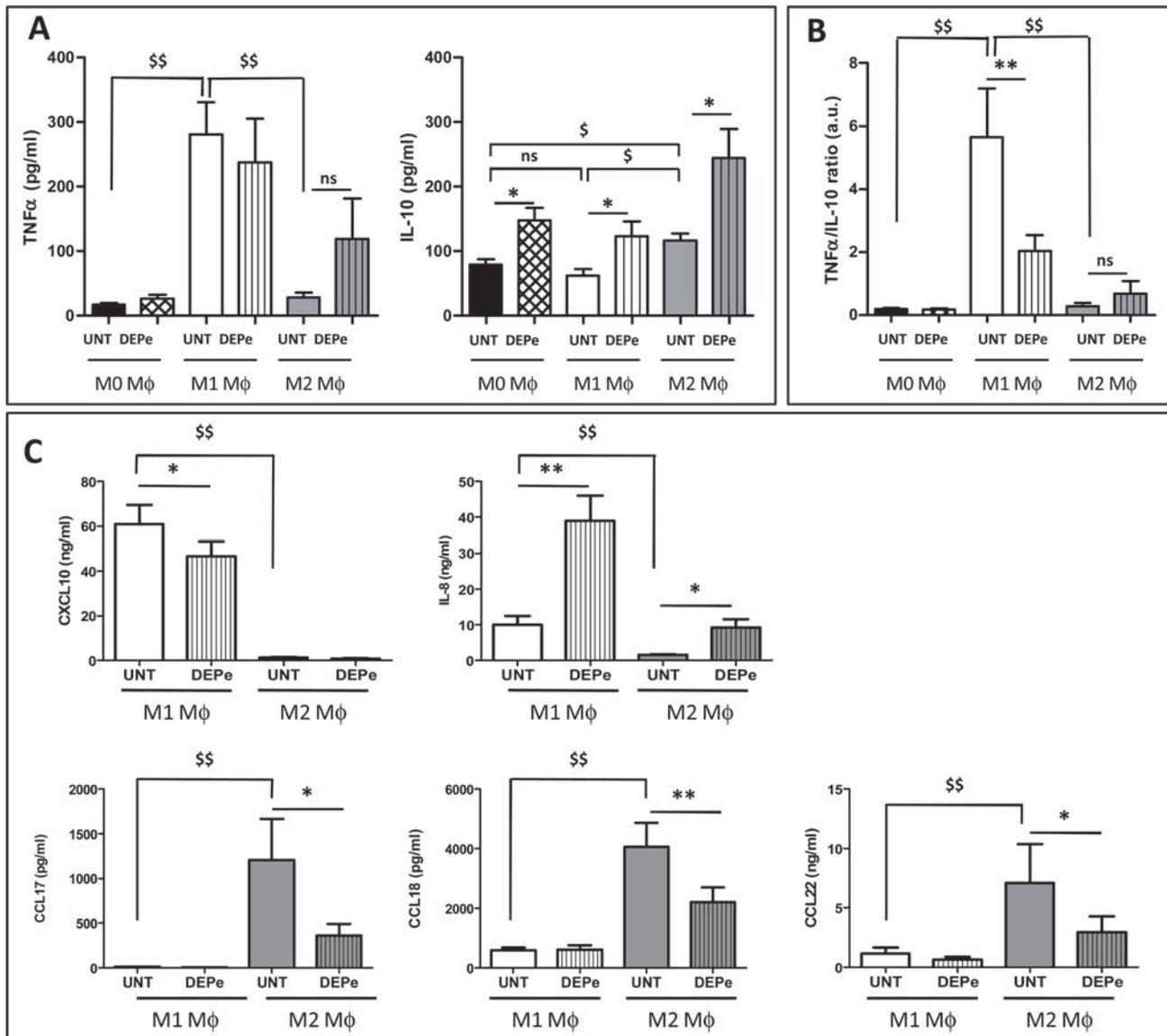
of CD200R positive cells were significantly decreased by DEPe in M2 MΦ when compared to their untreated counterparts (Fig. 2B). Expression of CD200R in M1 MΦ was very low, as previously described[34], and was not impaired by DEPe (data not shown).

### DEPe effects on human MΦ functions

We further determined whether the effect of DEPe on MΦ polarization has some functional consequences. For this purpose, the endocytic capacity of M1 and M2 MΦ exposed to DEPe during the polarization step was first measured. The endocytosis of the fluorescent FITC-dextran in DEPe-treated M1 or M2 MΦ was not modified when compared to that found in untreated counterparts, whereas, by contrast, B(a)P-treated M1 and M2 MΦ displayed reduced endocytosis (S4 Fig.), as previously described [36].

We next measured DEPe effect on cytokine and chemokine secretion capacity by M1 and M2 MΦ. As expected, the levels of the cytokine TNFα were significantly higher in untreated M1 MΦ than in M0 and M2 counterparts (Fig. 3A) and those of the chemokines IL-8 and CXCL10 were significantly higher in untreated M1 MΦ than in M2 counterparts (Fig. 3C). The levels of the cytokine IL-10 was also higher in M2 MΦ than in M0 and M1 counterparts (Fig. 3A) and those of the chemokines CCL17, CCL18 and CCL22 were found significantly higher in untreated M1 MΦ than in M2 counterparts (Fig. 3C); such data, associated to those of mRNA expression (S3 Fig.), fully validated our model of human MΦ polarization. DEPe exposure led to a significant increase of IL-10 secretion in supernatants from M0, M1 and M2 MΦ cultures, whereas TNFα secretion was not significantly modified by DEPe exposure neither in M0, M1 nor in M2 MΦ (Fig. 3A). The ratio of secretion of the pro-inflammatory cytokine TNFα to that of the anti-inflammatory cytokine IL-10 was consequently reduced in M1 MΦ, suggesting an anti-inflammatory impact of DEPe during M1 MΦ polarization (Fig. 3B). Exposure to DEPe was next found to decrease secretion levels of the typical M2 chemokines CCL17, CCL18, CCL22 in M2 MΦ, and of the M1 chemokine CXCL10 in M1 MΦ (Fig. 3C); by contrast, DEPe increased secretion of the M1 marker IL-8 in M1 MΦ and also in M2 MΦ (Fig. 3C).

As a decrease of CCL17 and CCL22 chemokine secretion was found in culture medium supernatant of M2 MΦ exposed to DEPe, we then wondered if such effect has an impact on chemotaxis of cells expressing CCR4, the surface receptor for CCL17 and CCL22. CCR4-positive

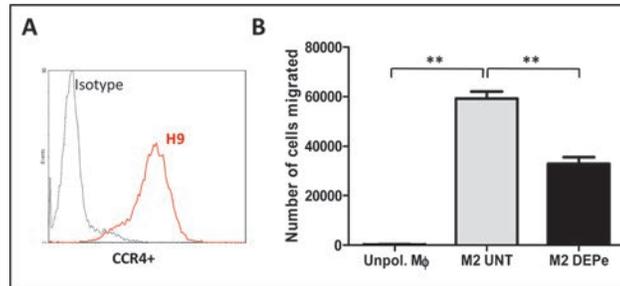


**Fig 3. Effects of DEPe on cytokine and chemokine secretion during human MΦ polarization.** Six-day cultured M-CSF MΦ were kept unactivated or were activated with IFN $\gamma$  or with IL-4 to obtain M0, M1 and M2 MΦ, respectively, in the presence of 10  $\mu$ g/ml DEPe or DMSO (UNT) during 24 h. Cytokine (A, B) and chemokine (C) levels in culture medium were determined by ELISA. (A and C) Data expressed in pg/ml (TNF $\alpha$ , IL-10, CCL17 and CCL18) or ng/ml (IL-8, CXCL10 and CCL22) are the means  $\pm$  SEM of 8 independent experiments. (B) Data expressed in ratio of TNF $\alpha$ /IL-10 secretion levels (a.u.: arbitrary unit) are the means  $\pm$  SEM of 7 independent experiments. \* $p$ <0.05 and \*\* $p$ <0.01 when compared with its control counterpart,  $^{ss}$  $p$ <0.01 when compared to M1 UNT MΦ, ns: not significant.

doi:10.1371/journal.pone.0116560.g003

lymphoblastic H9 cells (Fig 4A) strongly migrated in response to conditioned medium from control M2 MΦ, in comparison to cells exposed to conditioned medium of unpolarized MΦ (Fig 4B); such migration was significantly decreased when conditioned medium of DEPe-exposed M2 MΦ was used (Fig 4B) demonstrating that DEPe exposure reduced the chemoattractant potential of M2 MΦ.

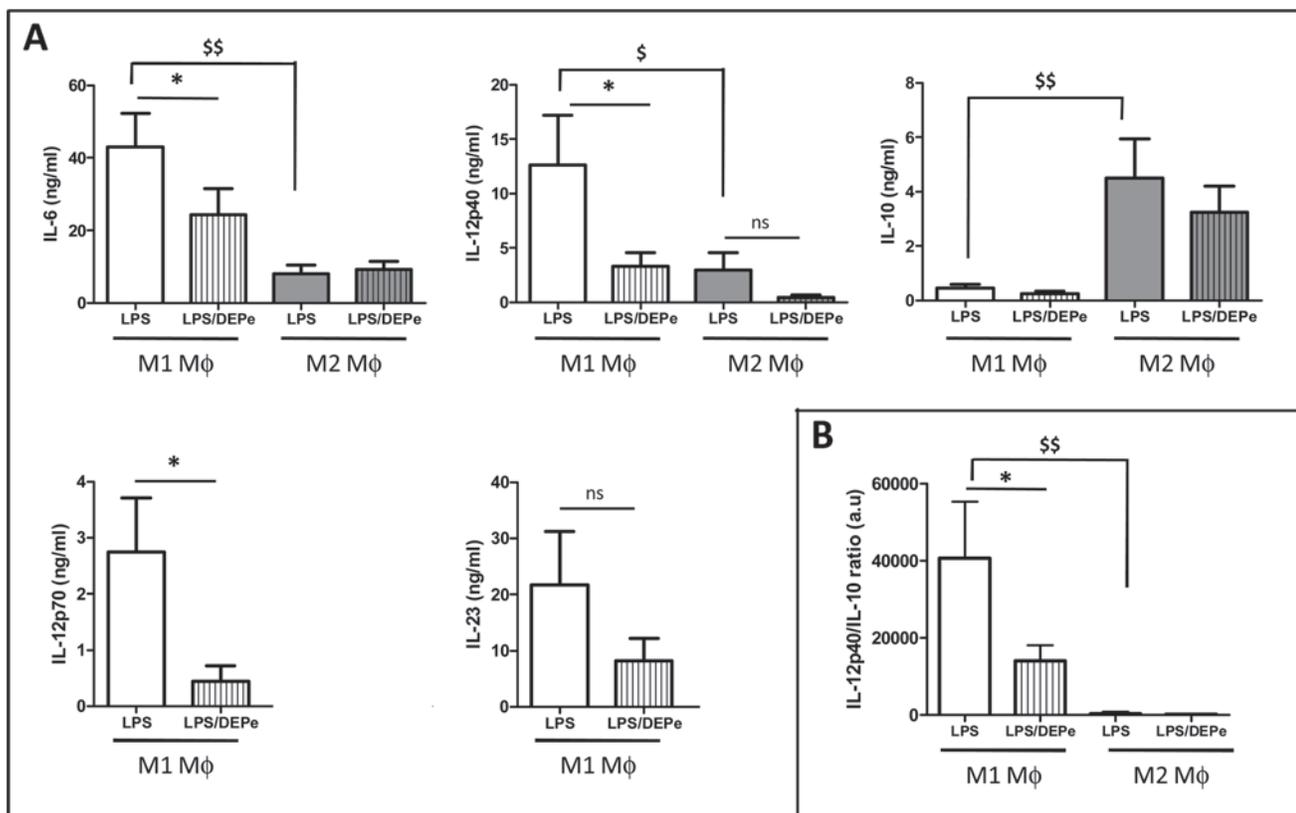
To determine whether DEPe may affect the response of M1 or M2 MΦ to an infectious/inflammatory stimulus, we next exposed untreated and DEPe-treated MΦ to LPS for a further 24-h period. As expected, LPS-exposed M1 MΦ secreted more IL-6 and IL-12p40, the common



**Fig 4. Impact of the down-secretion of CC chemokines by DEPe on the chemotaxis of CCR4+ cells.** (A) Graph from flow cytometry showing the CCR4 membrane expression of H9 cells. (B) The number of H9 cells which migrated in the presence of conditioned media of unpolarized MΦ (Unpol.MΦ) or of MΦ exposed to 10 μg/ml DEPe or to DMSO (UNT) during M2 polarization was evaluated by transwell migration assay. Data, representing 3 independent experiments, are expressed in number of cells migrated and are evaluated by cell count. \*\*p<0.01.

doi:10.1371/journal.pone.0116560.g004

subunit of IL-12p70 and IL-23, than LPS-exposed M2 MΦ (Fig. 5A). By contrast, IL-10 secretion level was significantly higher in M2 than M1 MΦ in the presence of LPS (Fig. 5A). The concentrations of IL-23 and IL-12p70 in culture media were too low to be detected in M2 MΦ



**Fig 5. Effects of LPS on cytokine secretion in DEPe-exposed MΦ.** Six-day cultured M-CSF MΦ were activated with IFN $\gamma$  or with IL-4 to obtain M1 and M2 MΦ, respectively, in the presence of 10 μg/ml DEPe or DMSO during 24 h. LPS (10 ng/ml) was next added to DEPe-M1 or DEPe-M2 MΦ for additional 24 h. Cytokine levels in culture medium were determined by ELISA. Data expressed in ng/ml (A) or (B) in ratio of IL-12p40 and IL-10 secretion levels (a.u.: arbitrary unit) are the means  $\pm$  SEM of 6 independent experiments. \*p<0.05 when compared with its LPS counterpart, §p<0.05 and §§p<0.01 when compared to M1 LPS MΦ. ns: not significant.

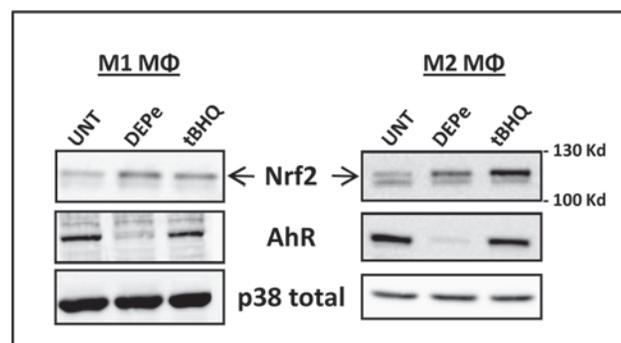
doi:10.1371/journal.pone.0116560.g005

(data not shown). Secretion levels of the cytokines IL-12p40, IL-12p70, IL-23 and IL-6 were all decreased in response to LPS in DEPe-exposed M1 MΦ, whereas those of IL-6 and IL-12p40 remained unaffected by DEPe in M2 MΦ (Fig. 5A). MΦ response to LPS with respect to the secretion of IL-10 was not modified by DEPe exposure, neither in M1 nor M2 MΦ (Fig. 5A). The ratio IL-12p40/IL-10 secretion was consequently reduced by DEPe in M1 subtype (Fig. 5B), likely demonstrating a lower capacity of DEPe-exposed MΦ to respond to LPS.

Finally, we wondered if exposure to DEPe could affect the expression of specific MΦ markers in already polarized MΦ. For this purpose, polarized M1 and M2 MΦ were treated by 10 μg/ml DEPe (S5A Fig.) and surface expression of CD64 and CD200R was first analysed. Similarly to polarizing M1 MΦ (Fig. 2), already polarized M1 MΦ did not exhibit change in CD64 expression in response to DEPe (S5B Fig.); by contrast, CD200R expression was reduced by DEPe in already polarized M2 MΦ (S5B Fig.), as previously described in polarizing M2 MΦ (Fig. 2). With respect to secretion of the cytokine TNFα and the chemokines CXCL10, CCL17, CCL18 and IL-8, treatment of polarized M1 or M2 MΦ by DEPe resulted in regulations (S5C Fig.) similar to those observed in polarizing counterparts (Fig. 3).

### DEPe activates AhR and Nrf2 pathways

Signalling pathways putatively involved in DEPe-altered secretion capacity of polarizing MΦ were then analyzed. For this purpose, we studied the putative contribution of AhR and Nrf2 pathways because (i) DEP contain some aryl hydrocarbons well known as AhR ligands, (ii) AhR can interfere with the LPS-TLR4 signalling pathway [37], (iii) DEP leads to nuclear Nrf2 translocation [38] and (iv) exposure to particulate matter results in production of more pro-inflammatory cytokines [21] and CCL17 chemokine [20] in Nrf2-deficient mice than in the wild-type mice. As shown in Fig. 6, a 6-h exposure to DEPe strongly reduced AhR protein expression in both M1 and M2 MΦ, most likely reflecting AhR activation because such activation commonly results in proteosomal degradation of AhR [39]; in parallel, mRNA expression of the CYP1B1, a well-known target of AhR, was increased. DEPe as well as the Nrf2 inducer tBHQ, used here as a reference Nrf2 activator, were also found to increase the expression of the upper band of Nrf2 protein in both M1 and M2 MΦ (Fig. 6), thus likely reflecting Nrf2 activation, because such activation is linked to inhibition of its degradation. Altogether, these results demonstrated that DEPe early activates the AhR and Nrf2 pathways in both M1 and M2 MΦ.



**Fig 6. DEPe activates the AhR and Nrf-2 pathways in M1 and M2 MΦ.** Six-day cultured M-CSF MΦ were activated with IFNγ or with IL-4 to obtain M1 and M2 MΦ, respectively, in the presence of 10 μg/ml DEPe or 10 μM tBHQ or DMSO (Ct) during 6 h. Western blot analysis of Nrf2 and AhR protein expressions were performed with whole-cell lysates. Equal gel loading and transfer efficiency were checked by blot incubating with Abs against p38 total. Experiments were repeated, 3 times, with similar results.

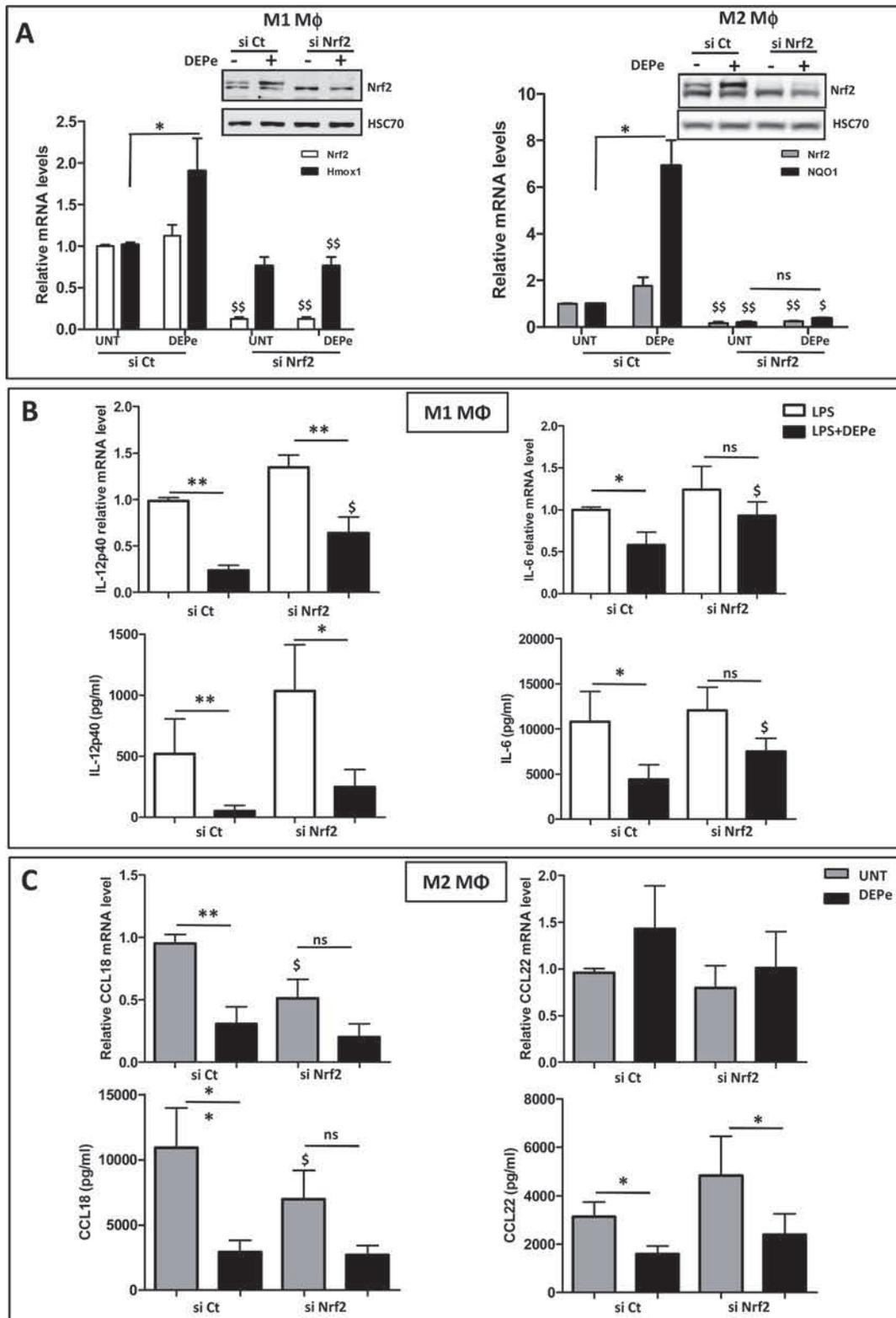
doi:10.1371/journal.pone.0116560.g006

## Involvement of the Nrf2 signalling pathway in DEPe effects towards M1 and M2 macrophagic markers

To further determine the role of Nrf2 in DEPe effects towards M $\Phi$ , we down-regulated the expression of Nrf2 by RNA interference. The transient transfection of RNAi against Nrf2 (si Nrf2) reduced endogenous and DEP-inducible Nrf2 protein expression in M1 and M2 M $\Phi$  in comparison to cells transfected with a non-targeting siRNA (si Ct) used as control (Fig. 7A, insert); the efficiency of si Nrf2 transfection was also confirmed by the down-expression of Nrf2 mRNA levels and of Nrf2 target genes Hmox-1 in M1 M $\Phi$  or NQO1 in M2 M $\Phi$  (Fig. 7A). DEPe significantly reduced LPS-induced IL-12p40 expression at both mRNA and protein levels in si Ct- and si Nrf2-transfected M1 cells (Fig. 7B). By contrast, DEPe significantly reduced the LPS-induced IL-6 expression at both the mRNA and protein levels only in si Ct-transfected cells, demonstrating that the lowest IL-6 secretion in DEPe-exposed M1 M $\Phi$  in response to LPS is Nrf2-dependent. In M2 M $\Phi$ , the absence of Nrf-2 reduces significantly CCL18 mRNA and secretion levels in untreated condition, suggesting a potential role of this transcription factor in CCL18 basal expression (Fig. 7C). The decrease of CCL18 mRNA and secretion levels was found significant in DEPe-treated si Ct-transfected cells but not in DEPe-treated si Nrf2-transfected cells, probably because of the reduced basal levels of CCL18 in untreated si Nrf2 transfected cells (Fig. 7C). In order to clarify the role of Nrf2, we compared the repression factors of the CCL18 secretion after DEPe exposure ( $4.5 \pm 0.81$  fold in si Ct-transfected cells and  $2.9 \pm 0.49$  fold in si Nrf2-transfected cells) and we found no significant difference between these repression factors, suggesting that DEPe effects on CCL18 secretion is probably Nrf2-independent. The significant decrease of CCL22 secretion observed in si Ct-transfected M2 M $\Phi$  was also well found in the si Nrf2-transfected M2 M $\Phi$  after DEPe exposure (Fig. 7C), suggesting that DEPe effects on CCL22 secretion are Nrf2-independent; moreover, mRNA levels of CCL22 were not modified by DEPe-treatment (Fig. 7C), indicating that DEPe effects towards CCL22 are likely post-transcriptional.

## Involvement of the AhR signalling pathway in DEPe effects towards M1 and M2 macrophagic markers

To further determine the role of AhR in DEPe effects towards M1 and M2 markers, we down-regulated the expression of AhR by RNA interference. As shown on the Western blot of the Fig. 8A, the transient transfection of RNAi against AhR (si AhR) reduced endogenous AhR protein expression in comparison to cells transfected with non-targeting siRNA (si Ct) in both M1 and M2 M $\Phi$ ; the efficiency of si AhR transfection was also confirmed by the down-expression of AhR mRNA levels and by the inhibition of DEPe-mediated induction of CYP1B1 in M1 and M2 M $\Phi$  (Fig. 8A). DEPe and TCDD, used here as a reference AhR ligand, reduced significantly LPS-induced IL-12p40 expression at both mRNA and protein levels in si Ct-transfected M1 cells but not in si AhR-transfected M1 cells (Fig. 8B). DEPe and TCDD also reduced significantly LPS-induced IL-6 secretion in si Ct-transfected M1 cells but not in si AhR-transfected M1 cells (Fig. 8B). We also observed that AhR seems to regulate basal secretion of IL-12p40 but not that of IL-6 in M1 M $\Phi$ . In M2 M $\Phi$ , DEPe and TCDD reduced significantly CCL18 expression at both mRNA and protein levels in si Ct-transfected cells but not in si AhR-transfected counterparts (Fig. 8C). The significant decrease of CCL22 secretion by DEPe exposure in si Ct-transfected cells was not confirmed at mRNA level, suggesting a post-transcriptional effect of DEPe on CCL22 expression as already indicated above. Similarly, TCDD exposure tends to decrease CCL22 secretion but not those of mRNA expression (Fig. 8C). Interestingly, basal secretions of CCL18 and CCL22 chemokines seem to require the presence of AhR because their levels were found to be decreased in untreated si AhR-transfected M2 M $\Phi$



**Fig 7. Impact of si Nrf2 on cytokine and chemokine secretions regulated by DEPe in M1 and M2 MΦ.** Six-day cultured M-CSF MΦ were transfected with siRNAs targeting Nrf2 (si Nrf2) or with non-targeting siRNAs (si Ct) and cultured for 16 h; they were then activated with IFN $\gamma$  + LPS or with IL-4 to obtain activated M1 and M2 MΦ, respectively, in the presence of 10  $\mu$ g/ml DEPe or DMSO (UNT) during 8 h or 24 h. (A) Validation of si Nrf2 efficiency: Western blot analysis of Nrf2 protein expression was performed with whole-cell lysates. Equal gel loading and transfer efficiency were checked by protein hybridization

with Abs against HSC70. Experiments were repeated, three times, with similar results. Cells were harvested and after total RNA isolation, mRNA levels of Nrf2 and Hmox-1 in M1 MΦ and Nrf2 and NQO1 in M2 MΦ were determined by RT-qPCR assays. Data are expressed relatively to mRNA levels found in si Ct-transfected cells, arbitrarily set at the value of 1 and are the means  $\pm$  SEM of at least 4 independent experiments. (B) Cytokine mRNA expression and secretion in culture medium of M1 MΦ were determined respectively by RT-qPCR and by ELISA after 8h. (C) Chemokine mRNA expression and secretion in culture medium of M2 MΦ were determined respectively by RT-qPCR and by ELISA after 24h. Data are the means  $\pm$  SEM of at least 5 independent experiments. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  when compared with its untreated counterpart;  $^{\S}p < 0.05$  and  $^{\S\S}p < 0.01$  when compared to their respective si Ct-transfected counterparts; ns: not significant.

doi:10.1371/journal.pone.0116560.g007

(Fig. 8C). Altogether, these data suggest that DEPe effects on IL-12p40 and IL-6 secretion in LPS-stimulated M1 MΦ and on CCL18 secretion in M2 MΦ require AhR.

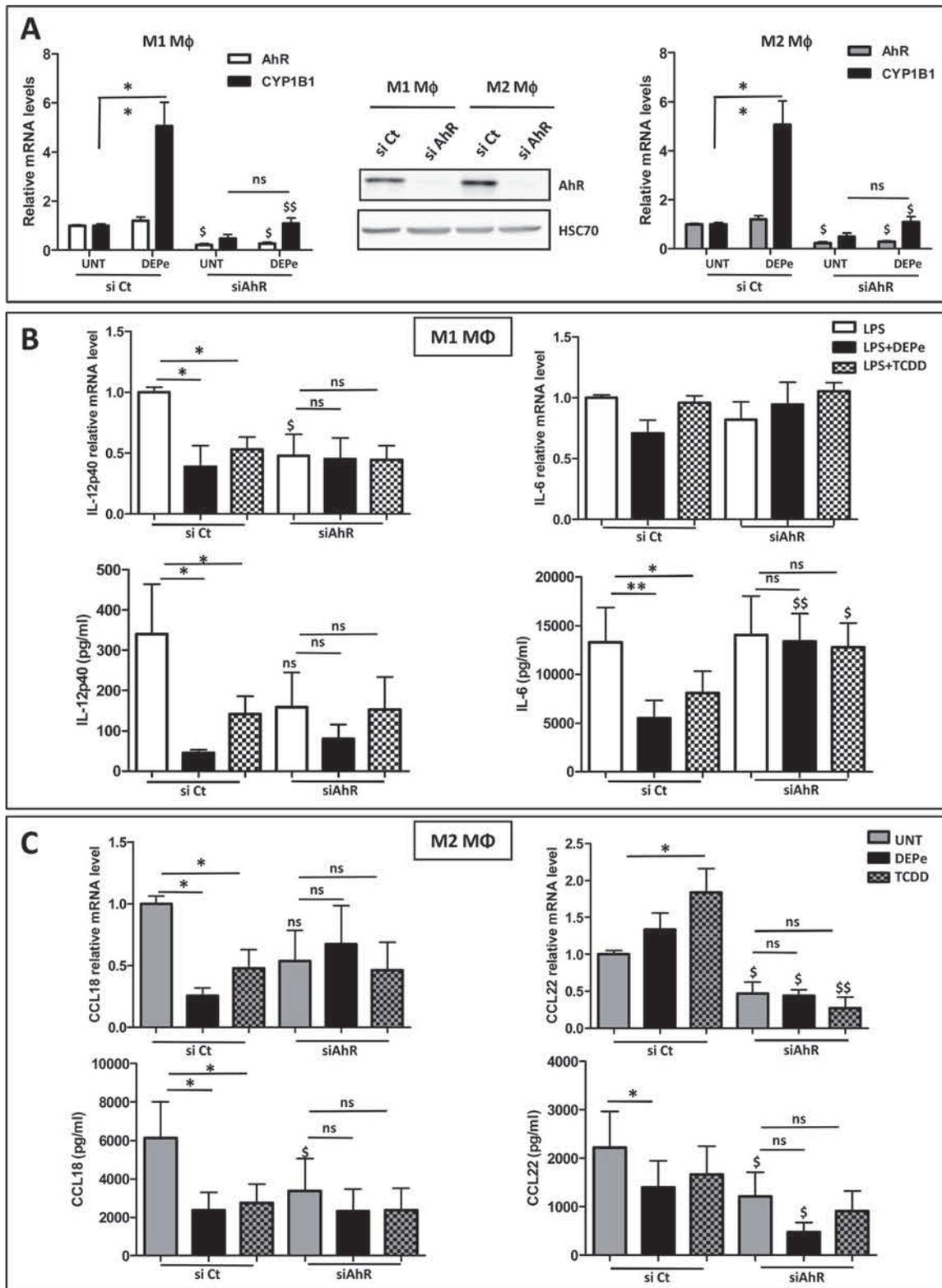
## Discussion

In the current study, we investigated the effects of DEPe on the acquisition of polarization markers in human M1 and M2 MΦ and the role of AhR and Nrf2 in these processes. Our results showed that 1) M1 and M2 human MΦ are both sensitive to DEPe; 2) DEPe effects seem gene-specific and not dependent on the type of MΦ polarization; 3) DEPe decreases the expression of the CD200R, a typical membrane marker of M2 MΦ; 4) DEPe decreases the capacity of M1 polarizing MΦ to secrete the pro-Th1 chemokine CXCL10 and the LPS-induced IL-6 and IL-12p40 cytokines; 5) the decreased capacity of M2 polarizing MΦ exposed to DEPe to secrete CCL17, CCL18 and CCL22 chemokines is associated to a lower chemotaxis of CCR4+ cells; 6) AhR and Nrf2 pathways are activated in both types of MΦ after DEPe exposure; 7) the DEPe-related decrease of IL-6 secretions is Nrf2- and AhR-dependent; 8) the DEPe-related decreases of IL-12p40 and CCL18 secretion are AhR-dependent but Nrf2-independent.

About fifty percent of the specific polarization genes that we have studied in the present study are regulated by DEPe in M1 and M2 MΦ (with a majority of down-expression), indicating that DEPe exposure during the polarisation step alters the acquisition of some macrophagic markers. We can reasonably exclude an inhibitory effect of DEPe on IFN $\gamma$  or IL-4 activation pathways, because the expression of some macrophagic markers under control of these factors is increased or unmodified by the pollutant. Likewise, the phosphorylation of STAT-1 by IFN- $\gamma$  in M1 MΦ and the phosphorylation of STAT-6 by IL-4 in M2 MΦ were not altered in the presence of DEPe in the first four hours of polarization (data not shown). The fact that some DEPe effects observed during the polarization step of MΦ were also confirmed on already polarized MΦ also supports the idea that DEPe effects that we observed are independent of agonist-induced polarization program (S5 Fig.). Therefore, our data reveal that DEPe effects are gene-specific and less linked to a family of gene or to a type of MΦ, and can therefore not reflect an overall alteration of M1 and M2 differentiation processes.

In mammals, the first line of defence includes antigen recognition by pattern recognition receptors such as Toll-like receptors, scavenger receptors (SR) and mannose receptors (MR). DEPe exposure reduced the mRNA expression of MRC1 and, to a lesser extent SR-B1, but not those of CD36 in M2 MΦ. Although the proteins encoded by these genes are involved in endocytosis, this function is not affected by DEPe in contrast to B(a)P, suggesting that their membrane expressions are not altered by DEPe exposure and remain functional.

The functions of MΦ depend largely of their ability to secrete mediators such as cytokines and chemokines. Thus, the decreased secretion of the pro-inflammatory cytokines IL-6 and IL-12p40 by DEPe that we observed in a context of TLR4 activation in M1 MΦ and of TNF $\alpha$  in LPS-stimulated human alveolar MΦ [9] will probably reduce their capacities to activate B and T lymphocytes and NK cells and therefore support the notion that DEP can reduce host defence, especially resistance to infection. In this context, it is noteworthy that diesel-enhanced influenza infection in lung mice was found to be associated with a decrease of IL-12p40 [40]. It



**Fig 8. Impact of si AhR on cytokine and chemokine secretions regulated by DEPe in M1 and M2 MΦ.** Six-day cultured M-CSF MΦ were transfected with siRNAs targeting AhR (si AhR) or with non-targeting siRNAs (si Ct) and cultured for 40 h; they were activated with IFN $\gamma$  + LPS or with IL-4 to obtain LPS activated M1 MΦ and M2 MΦ, respectively, in the presence of 10  $\mu$ g/ml DEPe, 10 nM TCDD or DMSO (UNT) during 8 h or 24 h. (A) Validation of si AhR efficiency: Western blot analysis of AhR protein expressions were performed with whole-cell lysates. Equal gel loading and transfer efficiency were checked

by protein hybridization with Abs against HSC70. Experiments were repeated, three times, with similar results. Cells were harvested and after total RNA isolation, mRNA levels of AhR and CYP1B1 were determined by RT-qPCR assays. Data are expressed relatively to mRNA levels found in si Ct-transfected cells, arbitrarily set at the value of 1 and are the means  $\pm$  SEM of at least 4 independent experiments. (B) Cytokine mRNA expression and secretion in culture medium of M1 M $\Phi$  were determined respectively by RT-qPCR and by ELISA after 8 h. (C) Chemokine mRNA expression and secretion in culture medium of M2 M $\Phi$  were determined respectively by RT-qPCR and by ELISA after 24h. Data are the means  $\pm$  SEM of at least 4 independent experiments. \* $p$ <0.05 and \*\* $p$ <0.01 when compared with its untreated counterpart;  $^{\$}$  $p$ <0.05 and  $^{\$}$  $p$ <0.01 when compared to their respective si Ct-transfected counterparts; ns: not significant.

doi:10.1371/journal.pone.0116560.g008

was also demonstrated that DEPe suppressed *Listeria monocytogenes*-induced secretion of IL-12 and TNF $\alpha$  in rat alveolar M $\Phi$  and that DEP-enhanced production of IL-10 may also increase the susceptibility of diesel particulate matter-exposed M $\Phi$  to bacterial infection [41]. Moreover, by decreasing the pro-Th1 chemokine CXCL10 secretion in M1 M $\Phi$ , DEPe can also reduce the chemotaxis of CXCR3-positive cells such as type 1 (Th1) T cells, exacerbating the decrease of T cell activation and may indirectly favour a type-2 response. This CXCL10 decrease is consistent with that found in DEP-treated monocyte-derived dendritic cells [42] and in PBMC of nonatopic subjects exposed to DEP-PAH [23]. Successful clearing of a respiratory bacterial infection depends on an adequate Th1 immune response; therefore, the subject would not control the infection as well if exposed to particulate matter. By contrast, DEPe-induced IL-8 secretion in both types of M $\Phi$  strongly suggests that neutrophil recruitment would be efficient in DEP-exposed tissue, in accordance with the lung inflammation observed in DEP-exposed subjects [43–44].

In addition, by decreasing CCL17 and CCL22 secretion capacity of M2 M $\Phi$ , DEPe may indirectly reduce chemotaxis of CCR4-positive cells such as type 2 (Th2) T cells and basophils, both involved in the allergic immune response [45–46]. Moreover, the decrease of CCL18 secretion after DEPe exposure may alter the chemoattractive capacity of this chemokine toward several cell types; thus CCL18 which is constitutively expressed at high level in the lung and mainly by alveolar M $\Phi$  acts as a chemoattractant for naive CD4+ T lymphocytes and immature monocyte-derived dendritic cells, which may lead to the development of tolerogenic immune response. The chemokines CCL17, CCL18 and CCL22 could also play a crucial role in maintaining lung tolerance by attracting Tregs into lung [47]. Therefore, we can presume that a reduction of such chemokine secretion by DEP exposure would lead to a decrease of lung immune response.

Although the AhR was initially recognized as a receptor of several pollutants such as PAHs, AhR by itself is now recognized to play an important role in the control of the adaptive immune response [14, 48]. Moreover, immunity- and inflammation-related functions were found up-regulated in response to the AhR agonist B(a)P in primary human M $\Phi$  [49] and various cytokines and chemokines have been shown to be targeted by AhR [13]. So, B(a)P has been shown to induce IL-8 expression in both human M $\Phi$  or in mouse lung [50], but AhR activation is also able to inhibit LPS-induced IL-1 $\beta$ , IL-6 or IL-12 expression in M $\Phi$  or dendritic cells [51, 13]. Here, we report that the activation of AhR by DEPe is involved in the lower capacity of human M $\Phi$  to secrete some specific cytokines of M1 subtype such as IL-6 and IL-12p40 and the specific CCL18 chemokine specific of the M2 subtype. Importantly, the basal level of AhR and its activation by DEPe was not found to differ in both M1 and M2 M $\Phi$ , thus likely discarding a role for AhR in M $\Phi$  polarization. IL-6 and IL-12 are both regulated by NF- $\kappa$ B and the mechanisms by which AhR exerts its anti-inflammatory activity could be related to its capacity to interact with RelB, a member of the NF- $\kappa$ B family [52], with STAT-1 [37] or with Sp1 [53] after LPS stimulation as previously described in mouse M $\Phi$ . Among the CC chemokines family, AhR has been shown to be involved in the up-regulation of CCL1 after B(a)P [54] or TCDD [55] exposure in human M $\Phi$  but also in the down-regulation of CCL5 after an exposure to a

AhR ligand *in vivo* [56] and in the human keratinocyte Hacat cell line [57]. However, it is the first time to our knowledge that the CCL18 chemokine was found regulated by DEP and by AhR. Such down-regulation of CCL18 previously described in alveolar M $\Phi$  of cigarette smokers [58] therefore suggests that some common components of these two air pollutants (DEP and cigarette smoke), such as PAHs, could be involved in CCL18 down-regulation via AhR activation. Despite AhR knock-down has reversed DEP-induced CCL22 down-secretion, the role of AhR in such regulation is not clear; thus, the mRNA and secretion levels were not well correlated and the referent AhR ligand TCDD failed to decrease the CCL22 secretion, knowing moreover that CCL22 was previously found up-regulated by DEPe in alveolar M $\Phi$  from allergic patients [59]. Interestingly, an *in silico* analysis has permitted the identification of some XREs in the promoter regions of the CCL17, CCL18 and CCL22 genes [60]; however the functionality of these XRE sites has not been investigated and we cannot exclude a regulation of the chemokines by AhR independently of XRE. Moreover, the mechanisms leading to a decrease of CCL17 and CCL22 production in the human keratinocyte Hacat cell line would be associated to an overexpression of HO-1 [61].

Nrf2, one of the principal regulators of the cellular line of defense, was well activated after DEPe exposure in human M1 and M2 M $\Phi$ ; such activation was validated by the overexpression of some stress defense genes as Hmox-1 and NQO1. In parallel to its role in defense against oxidative stress, Nrf2 has been shown to suppress pro-inflammatory signaling pathway [16]. Thus, in respiratory models, DEP caused a significantly enhanced airway responsiveness and eosinophilic inflammation in Nrf2-deficient mice [20] and, in models of chronic obstructive pulmonary disease, Nrf2-deficient mice have increased recruitment of neutrophils and M $\Phi$  to the lung [62]. In this study, we demonstrated that the down-expression of Nrf2 permits to maintain the level of LPS-induced IL-6 secretion in M1 M $\Phi$  but not of IL-12p40. These results contrast to previous studies showing an increase of both IL-6 and IL-12p40 secretion in a model of ventilator-induced lung injury in Nrf2-deficient mice [63], and demonstrating that DEP-reduced LPS induction of IL-12p40 in human dendritic cells involves Nrf2 [23]. These differences may be related to some variations in regulatory pathways between species or the cellular models. The mechanisms by which Nrf2 controls the expression levels of IL-6 after DEPe exposure could be related to an activation of the nuclear factor NF- $\kappa$ B observed after a disruption of Nrf2 in a murine model of sepsis [19]. The role of ATF3, a TLR- and a ROS-inducible transcription factor, which acts a negative regulator of IL-6 and IL-12p40 in mice [64–65] needs to be accurately studied, because DEPe seems to increase its mRNA expression in our models of M $\Phi$  (data not shown). Recently, the anti-inflammatory effect of Nrf2 on IL-6 secretion in LPS-stimulated M $\Phi$  was proposed to be connected to AMP-activated protein kinase (AMPK) activation [66]. To our knowledge, the DEP effects on AMPK activation has not been studied, but we previously demonstrated that 1-nitropyrene, a nitro-polycyclic aromatic hydrocarbon present in diesel exhaust, increases AMPK activity [67], thus suggesting that AMPK way could be an another regulatory way of IL-6 by DEP. The role of Nrf2 on the CCL18 chemokine secretion is not easy to determine because of the decrease of the basal level of secretion in Nrf2-deficient cells. Therefore, we propose that IL-4-induced CCL18 could be Nrf2-dependent and that the down-regulation of DEPe on CCL18 but also on CCL22 could be Nrf2-independent. A down-expression of CCL22 in M $\Phi$  by the inorganic arsenic which activates Nrf2, has previously been related to a decrease of the transcriptional factor Egr2 expression [68], which is moreover more expressed in human M2 M $\Phi$  than M1 M $\Phi$  [34]; however, we do not found a similar Egr2 regulation by DEPe in M2 M $\Phi$  (data not shown).

The DEPe concentration used (10  $\mu$ g/ml) in the present study was selected on the basis of the absence of cell toxicity and on previous studies realized on M $\Phi$  [69, 9]. This concentration of DEPe seems to be equivalent to an *in vitro* particles deposition of 2  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> and corresponds

to a 24 h exposure to a polluted urban environment [23]. However, the effects of DEPe on the mRNA expression of some activated macrophages (CXCL10, CCL18 and IL-8) start from 1–5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (S2 Fig.) suggesting that macrophage polarization could be altered at lower concentration than 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of DEPe. Although the effects of DEPe do not accurately reflect those of the whole particulates, it seems that the alteration of M $\Phi$  functions could appear at doses of DEP commonly reached in urban areas or during peak pollution, highlighting the putative relevance of our *in vitro* data to environmental exposure.

In summary, this study demonstrates that *in vitro* exposure of polarizing human M $\Phi$  to DEPe significantly reduces the acquisition of several M1 and M2 markers of M $\Phi$  activation and the response of M1 M $\Phi$  to LPS, as monitored by the reduction of IL-12p40 and IL-6 secretion. It further indicates that AhR and Nrf2 are involved in such effects. Through altering some M1 and M2 marker expression, DEP, which constitute the main atmospheric pollutant in urban areas, may alter the immune response of individuals exposed to these atmospheric pollutants and may therefore increase their susceptibility to respiratory infections.

## Supporting Information

**S1 Fig. Phenotypic effects of DEPe.** Six-day cultured M-CSF M $\Phi$  were unpolarized or activated with IFN $\gamma$  or with IL-4 to obtain M1 and M2 M $\Phi$ , respectively, in the presence of 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  DEPe during 24 h. (A) Morphological feature of DMSO- or DEPe-exposed M $\Phi$  (Phase-contrast microscopy, magnification x200) (B) Cells were then stained with conjugated mAbs directed against the surface markers CD71 and then analyzed by flow cytometry. Data are representative of 2 independent experiments.

(TIF)

**S2 Fig. Effects of various DEPe concentrations on polarization marker mRNA expression during human M $\Phi$  polarization.** Six-day cultured M-CSF human primary were activated with IFN $\gamma$  or with IL-4 to obtain classically activated M $\Phi$  (M1) or alternative activated M $\Phi$  (M2), respectively, in the presence of indicated doses of DEPe ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) during 24 h. CYP1B1, IL-8, CXCL10 and CCL18 mRNA level was estimated by RT-qPCR; data were expressed relatively to mRNA levels found in control DMSO-exposed cells, arbitrarily set at the value of 1 unit and are the means  $\pm$  SEM of at least 3 independent experiments. \* $p < 0.05$ .

(TIF)

**S3 Fig. Comparison of DEPe effects on polarization marker mRNA expression during human M $\Phi$  polarization.** Six-day cultured M-CSF M $\Phi$  were activated with IFN $\gamma$  or with IL-4 to obtain M1 and M2 M $\Phi$  respectively, in the presence of 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  DEPe or DMSO (UNT) during 24 h. Cells were harvested and after total RNA isolation, mRNA levels were determined by RT-qPCR assays. Quantification of the steady-state target mRNA levels was calculated after normalization of the total amount of cDNA tested to an 18S RNA endogenous reference, using the  $2^{-\Delta\text{Ct}}$  method. This allowed to get a value of expression for each gene specific of M1 (A) or M2 (B) activation, comparatively to the 18S RNA amount found in RT-qPCR sample, which is presumed to remain constant between the different samples and which was arbitrarily set at  $10^7$  units (a.u) (Moreau *et al.*, 2011). Data are the means  $\pm$  SEM of at least 4 independent experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

(TIF)

**S4 Fig. Effects of DEPe on endocytosis.** Six-day cultured M-CSF M $\Phi$  were activated with IFN $\gamma$  or with IL-4 to obtain M1 and M2 M $\Phi$ , respectively, in the presence of 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  DEPe, 2  $\mu\text{M}$  B(a)P or DMSO (UNT) during 24 h. M $\Phi$  were incubated with FITC-dextran at 4°C (negative control) or 37°C to measure endocytosis. Cellular uptakes of FITC-dextran, determined

by flow cytometry, are expressed as  $\Delta\text{MFI}$  ( $\Delta\text{MFI} = \text{MFI}_{37^\circ\text{C}} - \text{MFI}_{4^\circ\text{C}}$ ) and are the means of 7 independent experiment. \*  $p < 0.05$  when compared with untreated M $\Phi$ . Ns: not significant. (TIF)

**S5 Fig. Effects of DEPe on polarization marker expression and cytokine and chemokine secretion on already polarized M1 and M2 human M $\Phi$ .** (A) Six-day cultured M-CSF M $\Phi$  were activated during 24 h with IFN $\gamma$  or with IL-4 to obtain M1 and M2 M $\Phi$ , respectively. M $\Phi$  were then exposed to 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  DEPe or to DMSO (UNT) for additional 24 h. (B) Supernatants were collected and cells were then stained with conjugated mAbs directed against the surface markers CD64 and CD200R to be analyzed by flow cytometry. Histograms represent the means of fluorescence intensity (MFI) ratio  $\pm$  SEM of 7 independent experiments; \*\* $p < 0.01$ . (C) Cytokine and chemokine levels in culture medium were determined by ELISA. Data expressed in  $\text{pg}/\text{ml}$  are the means  $\pm$  SEM of 5 independent experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , ns: not significant. (TIF)

## Acknowledgments

We would like to thank Dr L.Vernhet for helpful comments and critical reading of the manuscript, C. Morzadec for technical helpful and the cytometry platform of Biosit, University of Rennes 1, France.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MJ VL OF. Performed the experiments: MJ VL. Analyzed the data: MJ VL. Contributed reagents/materials/analysis tools: MJ VL OF. Wrote the paper: VL OF.

## References

1. Miller MR, Shaw CA, Langrish JP (2012) From particles to patients: oxidative stress and the cardiovascular effects of air pollution. *Future Cardiol* 8: 577–602. doi: [10.2217/fca.12.43](https://doi.org/10.2217/fca.12.43) PMID: [22871197](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22871197/)
2. Ghio AJ, Smith CB, Madden MC (2012) Diesel exhaust particles and airway inflammation. *Curr Opin Pulm Med* 18: 144–150. doi: [10.1097/MCP.0b013e32834f0e2a](https://doi.org/10.1097/MCP.0b013e32834f0e2a) PMID: [22234273](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22234273/)
3. Møller P, Mikkelsen L, Vesterdal LK, Folkmann JK, Forchhammer L, et al. (2011) Hazard identification of particulate matter on vasomotor dysfunction and progression of atherosclerosis. *Crit Rev Toxicol* 41: 339–368. doi: [10.3109/10408444.2010.533152](https://doi.org/10.3109/10408444.2010.533152) PMID: [21345153](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21345153/)
4. Gordon S (2003) Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3: 23–35. PMID: [12511873](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12511873/)
5. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, et al. (2004) The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 25: 677–686. PMID: [15530839](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15530839/)
6. Vogel CFA, Sciuillo E, Wong P, Kuzmicky P, Kado N, et al. (2005) Induction of proinflammatory cytokines and C-reactive protein in human macrophage cell line U937 exposed to air pollution particulates. *Environ Health Perspect* 113: 1536–1541. PMID: [16263508](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16263508/)
7. Miyata R, van Eeden SF (2011) The innate and adaptive immune response induced by alveolar macrophages exposed to ambient particulate matter. *Toxicol Appl Pharmacol* 257: 209–226. doi: [10.1016/j.taap.2011.09.007](https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.09.007) PMID: [21951342](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21951342/)
8. Amakawa K, Terashima T, Matsuzaki T, Matsumaru A, Sagai M, et al. (2003) Suppressive effects of diesel exhaust particles on cytokine release from human and murine alveolar macrophages. *Exp Lung Res* 29: 149–164. PMID: [12637227](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12637227/)
9. Mundandhara SD, Becker S, Madden MC (2006) Effects of diesel exhaust particles on human alveolar macrophage ability to secrete inflammatory mediators in response to lipopolysaccharide. *Toxicol Vitro* 20: 614–624. PMID: [16360300](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16360300/)
10. Sawyer K, Mundandhara S, Ghio AJ, Madden MC (2010) The effects of ambient particulate matter on human alveolar macrophage oxidative and inflammatory responses. *J Toxicol Environ Health A* 73: 41–57. doi: [10.1080/15287390903248901](https://doi.org/10.1080/15287390903248901) PMID: [19953419](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19953419/)

11. Hiura TS, Kaszubowski MP, Li N, Nel AE (1999) Chemicals in diesel exhaust particles generate reactive oxygen radicals and induce apoptosis in macrophages. *J Immunol* 163: 5582–5591. PMID: [10553087](#)
12. Baulig A, Garlatti M, Bonvallot V, Marchand A, Barouki R, et al. (2003) Involvement of reactive oxygen species in the metabolic pathways triggered by diesel exhaust particles in human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285: L671–679. PMID: [12730081](#)
13. Fardel O (2013) Cytokines as molecular targets for aryl hydrocarbon receptor ligands: implications for toxicity and xenobiotic detoxification. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 9: 141–152. doi: [10.1517/17425255.2013.738194](#) PMID: [23230817](#)
14. Nguyen NT, Hanieh H, Nakahama T, Kishimoto T (2013) The roles of aryl hydrocarbon receptor in immune responses. *Int Immunol* 25: 335–343. doi: [10.1093/intimm/dxt011](#) PMID: [23580432](#)
15. Li N, Venkatesan MI, Miguel A, Kaplan R, Gujuluva C, et al. (2000) Induction of heme oxygenase-1 expression in macrophages by diesel exhaust particle chemicals and quinones via the antioxidant-responsive element. *J Immunol* 165: 3393–3401. PMID: [10975858](#)
16. Li N, Alam J, Venkatesan MI, Eiguren-Fernandez A, Schmitz D, et al. (2004) Nrf2 is a key transcription factor that regulates antioxidant defense in macrophages and epithelial cells: protecting against the proinflammatory and oxidizing effects of diesel exhaust chemicals. *J Immunol* 173: 3467–3481. PMID: [15322212](#)
17. Li N, Nel AE (2006) Role of the Nrf2-mediated signaling pathway as a negative regulator of inflammation: implications for the impact of particulate pollutants on asthma. *Antioxid Redox Signal* 8: 88–98. PMID: [16487041](#)
18. Rangasamy T, Cho CY, Thimmulappa RK, Zhen L, Srisuma SS, et al. (2004) Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *J Clin Invest* 114: 1248–1259. PMID: [15520857](#)
19. Thimmulappa RK, Lee H, Rangasamy T, Reddy SP, Yamamoto M, et al. (2006) Nrf2 is a critical regulator of the innate immune response and survival during experimental sepsis. *J Clin Invest* 116: 984–995. PMID: [16585964](#)
20. Li YJ, Takizawa H, Azuma A, Kohyama T, Yamauchi Y, et al. (2008) Disruption of Nrf2 enhances susceptibility to airway inflammatory responses induced by low-dose diesel exhaust particles in mice. *Clin Immunol Orlando Fla* 128: 366–373. doi: [10.1016/j.clim.2008.05.005](#) PMID: [18614404](#)
21. Williams MA, Rangasamy T, Bauer SM, Killedar S, Karp M, et al. (2008) Disruption of the transcription factor Nrf2 promotes pro-oxidative dendritic cells that stimulate Th2-like immunoresponsiveness upon activation by ambient particulate matter. *J Immunol* 181: 4545–4559. PMID: [18802057](#)
22. Bleck B, Tse DB, Jaspers I, Curotto de Lafaille MA, Reibman J (2006) Diesel exhaust particle-exposed human bronchial epithelial cells induce dendritic cell maturation. *J Immunol* 176: 7431–7437. PMID: [16751388](#)
23. Chan RC-F, Wang M, Li N, Yanagawa Y, Onoé K, et al. (2006) Pro-oxidative diesel exhaust particle chemicals inhibit LPS-induced dendritic cell responses involved in T-helper differentiation. *J Allergy Clin Immunol* 118: 455–465. PMID: [16890772](#)
24. Braun A, Bewersdorff M, Lintelmann J, Matuschek G, Jakob T, et al. (2010) Differential impact of diesel particle composition on pro-allergic dendritic cell function. *Toxicol Sci* 113: 85–94. doi: [10.1093/toxsci/kfp239](#) PMID: [19805405](#)
25. Chaudhuri N, Jary H, Lea S, Khan N, Piddock KC, et al. (2012) Diesel exhaust particle exposure in vitro alters monocyte differentiation and function. *PloS One* 7: e51107. doi: [10.1371/journal.pone.0051107](#) PMID: [23236439](#)
26. Van Grevenynghe J, Rion S, Le Ferrec E, Le Vee M, Amiot L, et al. (2003) Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit differentiation of human monocytes into macrophages. *J Immunol* 170: 2374–2381. PMID: [12594260](#)
27. Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A (2006) Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J Immunol* 177: 7303–7311. PMID: [17082649](#)
28. World Medical Association Declaration of Helsinki (1997) Recommendations guiding physicians in biomedical research involving human subjects *Cardiovasc Res* 35: 2–3. PMID: [9302340](#)
29. Moreau A, Le Vee M, Jouan E, Parmentier Y, Fardel O (2011) Drug transporter expression in human macrophages. *Fundam Clin Pharmacol* 25: 743–752. doi: [10.1111/j.1472-8206.2010.00913.x](#) PMID: [21210849](#)
30. Lecureur V, Ferrec EL, N'diaye M, Vee ML, Gardyn C, et al. (2005) ERK-dependent induction of TNF $\alpha$  expression by the environmental contaminant benzo(a)pyrene in primary human macrophages. *FEBS Lett* 579: 1904–1910. PMID: [15792794](#)

31. Pi J, Bai Y, Reece JM, Williams J, Liu D, et al. (2007) Molecular mechanism of human Nrf2 activation and degradation: role of sequential phosphorylation by protein kinase CK2. *Free Radic Biol Med* 42: 1797–1806. PMID: [17512459](#)
32. Hatanaka N, Yamazaki H, Kizu R, Hayakawa K, Aoki Y, et al. (2001) Induction of cytochrome P450 1B1 in lung, liver and kidney of rats exposed to diesel exhaust. *Carcinogenesis* 22: 2033–2038. PMID: [11751436](#)
33. Verheyen GR, Nuijten J-M, Van Hummelen P, Schoeters GR (2004) Microarray analysis of the effect of diesel exhaust particles on in vitro cultured macrophages. *Toxicol Vitro* 18: 377–391. PMID: [15046786](#)
34. Jaguin M, Houlbert N, Fardel O, Lecureur V (2013) Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. *Cell Immunol* 281: 51–61. doi: [10.1016/j.cellimm.2013.01.010](#) PMID: [23454681](#)
35. Ambarus CA, Krausz S, van Eijk M, Hamann J, Radstake TRDJ, et al. (2012) Systematic validation of specific phenotypic markers for in vitro polarized human macrophages. *J Immunol Methods* 375: 196–206. doi: [10.1016/j.jim.2011.10.013](#) PMID: [22075274](#)
36. Laupeze B, Amiot L, Sparfel L, Le Ferrec E, Fauchet R, et al. (2002) Polycyclic aromatic hydrocarbons affect functional differentiation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 168: 2652–2658. PMID: [11884429](#)
37. Kimura A, Naka T, Nakahama T, Chinen I, Masuda K, et al. (2009) Aryl hydrocarbon receptor in combination with Stat1 regulates LPS-induced inflammatory responses. *J Exp Med* 206: 2027–2035. doi: [10.1084/jem.20090560](#) PMID: [19703987](#)
38. Chao MW, Po IP, Laumbach RJ, Koslosky J, Cooper K, et al. (2012) DEP induction of ROS in capillary-like endothelial tubes leads to VEGF-A expression. *Toxicology* 297: 34–46. doi: [10.1016/j.tox.2012.03.009](#) PMID: [22507881](#)
39. Davarinos NA, Pollenz RS (1999) Aryl hydrocarbon receptor imported into the nucleus following ligand binding is rapidly degraded via the cytoplasmic proteasome following nuclear export. *J Biol Chem* 274: 28708–28715. PMID: [10497241](#)
40. Gowdy KM, Krantz QT, King C, Boykin E, Jaspers I, et al. (2010) Role of oxidative stress on diesel-enhanced influenza infection in mice. *Part Fibre Toxicol* 7: 34. doi: [10.1186/1743-8977-7-34](#) PMID: [21092162](#)
41. Yin XJ, Dong CC, Ma JYC, Roberts JR, Antonini JM, et al. (2007) Suppression of phagocytic and bactericidal functions of rat alveolar macrophages by the organic component of diesel exhaust particles. *J Toxicol Environ Health A* 70: 820–828. PMID: [17454558](#)
42. Taront S, Dieudonné A, Blanchard S, Jeannin P, Lassalle P, et al. (2009) Implication of scavenger receptors in the interactions between diesel exhaust particles and immature or mature dendritic cells. *Part Fibre Toxicol* 6: 9. doi: [10.1186/1743-8977-6-9](#) PMID: [19284653](#)
43. Salvi S, Blomberg A, Rudell B, Kelly F, Sandström T, et al. (1999) Acute inflammatory responses in the airways and peripheral blood after short-term exposure to diesel exhaust in healthy human volunteers. *Am J Respir Crit Care Med* 159: 702–709. PMID: [10051240](#)
44. Stenfors N, Nordenhäll C, Salvi SS, Mudway I, Söderberg M, et al. (2004) Different airway inflammatory responses in asthmatic and healthy humans exposed to diesel. *Eur Respir J* 23: 82–86. PMID: [14738236](#)
45. Chvatchko Y, Hoogewerf AJ, Meyer A, Alouani S, Juillard P, et al. (2000) A key role for CC chemokine receptor 4 in lipopolysaccharide-induced endotoxic shock. *J Exp Med* 191: 1755–1764. PMID: [10811868](#)
46. De Nadaï P, Charbonnier A-S, Chenivresse C, Sénéchal S, Fournier C, et al. (2006) Involvement of CCL18 in allergic asthma. *J Immunol* 176: 6286–6293. PMID: [16670340](#)
47. Chenivresse C, Chang Y, Azzaoui I, Ait Yahia S, Morales O, et al. (2012) Pulmonary CCL18 recruits human regulatory T cells. *J Immunol* 189: 128–137. doi: [10.4049/jimmunol.1003616](#) PMID: [22649201](#)
48. Quintana FJ, Sherr DH (2013) Aryl hydrocarbon receptor control of adaptive immunity. *Pharmacol Rev* 65: 1148–1161. doi: [10.1124/pr.113.007823](#) PMID: [23908379](#)
49. Sparfel L, Pinel-Marie M-L, Boize M, Koscielny S, Desmots S, et al. (2010) Transcriptional signature of human macrophages exposed to the environmental contaminant benzo(a)pyrene. *Toxicol Sci* 114: 247–259. doi: [10.1093/toxsci/kfq007](#) PMID: [20064835](#)
50. Podechard N, Lecureur V, Le Ferrec E, Guenon I, Sparfel L, et al. (2008) Interleukin-8 induction by the environmental contaminant benzo(a)pyrene is aryl hydrocarbon receptor-dependent and leads to lung inflammation. *Toxicol Lett* 177: 130–137. doi: [10.1016/j.toxlet.2008.01.006](#) PMID: [18289803](#)
51. Benson JM, Shepherd DM (2011) Dietary ligands of the aryl hydrocarbon receptor induce anti-inflammatory and immunoregulatory effects on murine dendritic cells. *Toxicol Sci* 124: 327–338. doi: [10.1093/toxsci/kfr249](#) PMID: [21948866](#)

52. Vogel CFA, Sciallo E, Li W, Wong P, Lazennec G, et al. (2007) RelB, a new partner of aryl hydrocarbon receptor-mediated transcription. *Mol Endocrinol Baltim Md* 21: 2941–2955. PMID: [17823304](#)
53. Masuda K, Kimura A, Hanieh H, Nguyen NT, Nakahama T, et al. (2011) Aryl hydrocarbon receptor negatively regulates LPS-induced IL-6 production through suppression of histamine production in macrophages. *Int Immunol* 23: 637–645. doi: [10.1093/intimm/dxr072](#) PMID: [21930594](#)
54. N'Diaye M, Le Ferrec E, Lagadic-Gossmann D, Corre S, Gilot D, et al. (2006) Aryl hydrocarbon receptor- and calcium-dependent induction of the chemokine CCL1 by the environmental contaminant benzo[a]pyrene. *J Biol Chem* 281: 19906–19915. PMID: [16679317](#)
55. Vogel CFA, Sciallo E, Matsumura F (2007) Involvement of RelB in aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of chemokines. *Biochem Biophys Res Commun* 363: 722–726. PMID: [17900530](#)
56. Rebourcet D, Odet F, Vérot A, Combe E, Meugnier E, et al. (2010) The effects of an in utero exposure to 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin on male reproductive function: identification of Ccl5 as a potential marker. *Int J Androl* 33: 413–424. doi: [10.1111/j.1365-2605.2009.01020.x](#) PMID: [20059583](#)
57. Morino-Koga S, Uchi H, Tsuji G, Takahara M, Kajiwara J, et al. (2013) Reduction of CC-chemokine ligand 5 by aryl hydrocarbon receptor ligands. *J Dermatol Sci* 72: 9–15. doi: [10.1016/j.jdermsci.2013.04.031](#) PMID: [23810773](#)
58. Kollert F, Probst C, Müller-Quernheim J, Zissel G, Prasse A (2009) CCL18 production is decreased in alveolar macrophages from cigarette smokers. *Inflammation* 32: 163–168. doi: [10.1007/s10753-009-9115-5](#) PMID: [19357939](#)
59. Fahy O, Sénéchal S, Pène J, Scherpereel A, Lassalle P, et al. (2002) Diesel exposure favors Th2 cell recruitment by mononuclear cells and alveolar macrophages from allergic patients by differentially regulating macrophage-derived chemokine and IFN-gamma-induced protein-10 production. *J Immunol* 168: 5912–5919. PMID: [12023397](#)
60. Sun YV, Boverhof DR, Burgoon LD, Fielden MR, Zacharewski TR (2004) Comparative analysis of dioxin response elements in human, mouse and rat genomic sequences. *Nucleic Acids Res* 32: 4512–4523. PMID: [15328365](#)
61. Jeong S-I, Choi B-M, Jang SI (2010) Sulforaphane suppresses TARC/CCL17 and MDC/CCL22 expression through heme oxygenase-1 and NF- $\kappa$ B in human keratinocytes. *Arch Pharm Res* 33: 1867–1876. doi: [10.1007/s12272-010-1120-6](#) PMID: [21116791](#)
62. Iizuka T, Ishii Y, Itoh K, Kiwamoto T, Kimura T, et al. (2005) Nrf2-deficient mice are highly susceptible to cigarette smoke-induced emphysema. *Genes Cells Devoted Mol Cell Mech* 10: 1113–1125. PMID: [16324149](#)
63. Papaiahgari S, Yerrapureddy A, Reddy SR, Reddy NM, Dodd-O JM, et al. (2007) Genetic and pharmacologic evidence links oxidative stress to ventilator-induced lung injury in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 176: 1222–1235. PMID: [17901416](#)
64. Gilchrist M, Thorsson V, Li B, Rust AG, Korb M, et al. (2006) Systems biology approaches identify ATF3 as a negative regulator of Toll-like receptor 4. *Nature* 441: 173–178. PMID: [16688168](#)
65. Hoetzenecker W, Echtenacher B, Guenova E, Hoetzenecker K, Woelbing F, et al. (2012) ROS-induced ATF3 causes susceptibility to secondary infections during sepsis-associated immunosuppression. *Nat Med* 18: 128–134. doi: [10.1038/nm.2557](#) PMID: [22179317](#)
66. Mo C, Wang L, Zhang J, Numazawa S, Tang H, et al. (2014) The crosstalk between Nrf2 and AMPK signal pathways is important for the anti-inflammatory effect of berberine in LPS-stimulated macrophages and endotoxin-shocked mice. *Antioxid Redox Signal* 20: 574–588. doi: [10.1089/ars.2012.5116](#) PMID: [23875776](#)
67. Podechard N, Tekpli X, Catheline D, Holme JA, Rioux V, et al. (2011) Mechanisms involved in lipid accumulation and apoptosis induced by 1-nitropyrene in Hepa1c1c7 cells. *Toxicol Lett* 206: 289–299. doi: [10.1016/j.toxlet.2011.07.024](#) PMID: [21872649](#)
68. Bourdonnay E, Morzadec C, Fardel O, Vernhet L (2009) Redox-sensitive regulation of gene expression in human primary macrophages exposed to inorganic arsenic. *J Cell Biochem* 107: 537–547. doi: [10.1002/jcb.22155](#) PMID: [19350554](#)
69. Koike E, Hirano S, Shimojo N, Kobayashi T (2002) cDNA microarray analysis of gene expression in rat alveolar macrophages in response to organic extract of diesel exhaust particles. *Toxicol Sci* 67: 241–246. PMID: [12011483](#)

**Figure S1**

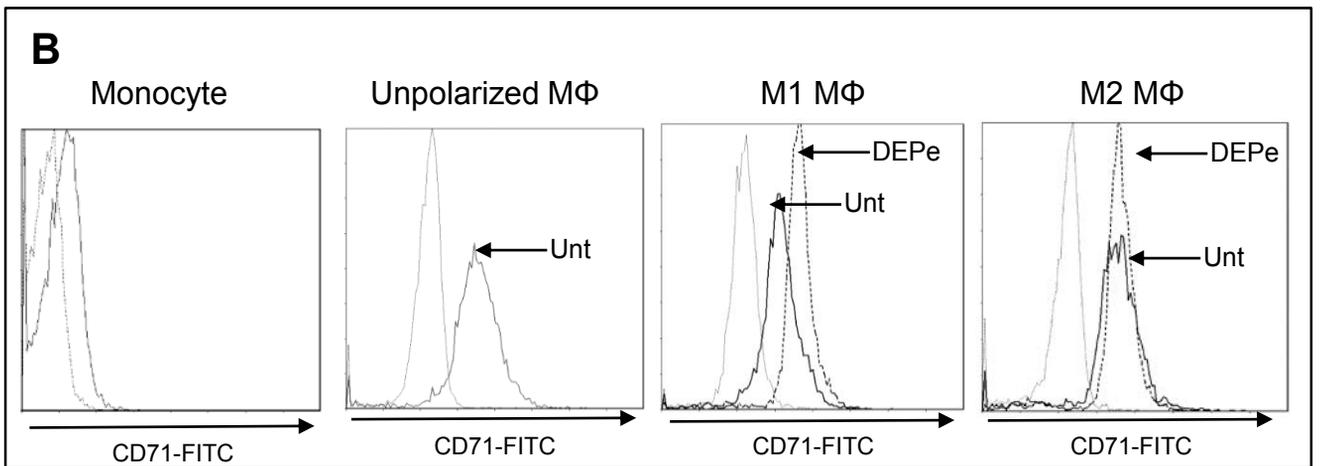
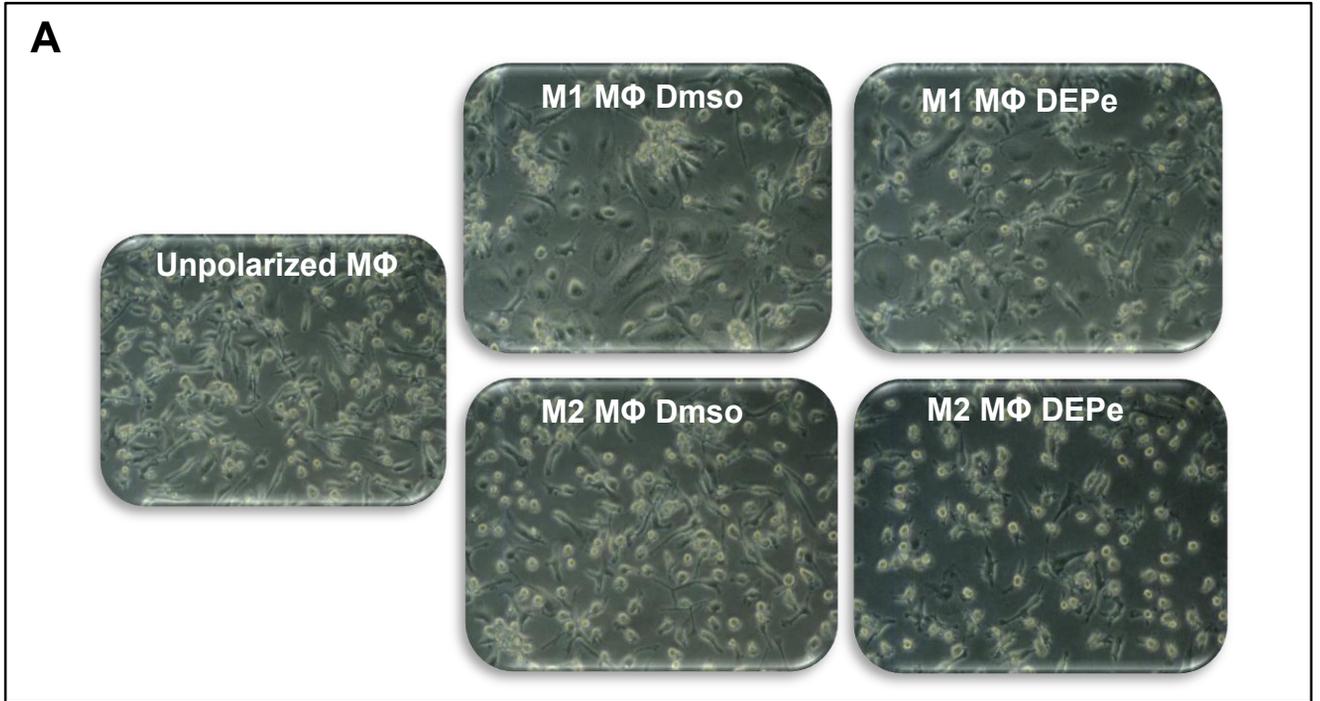
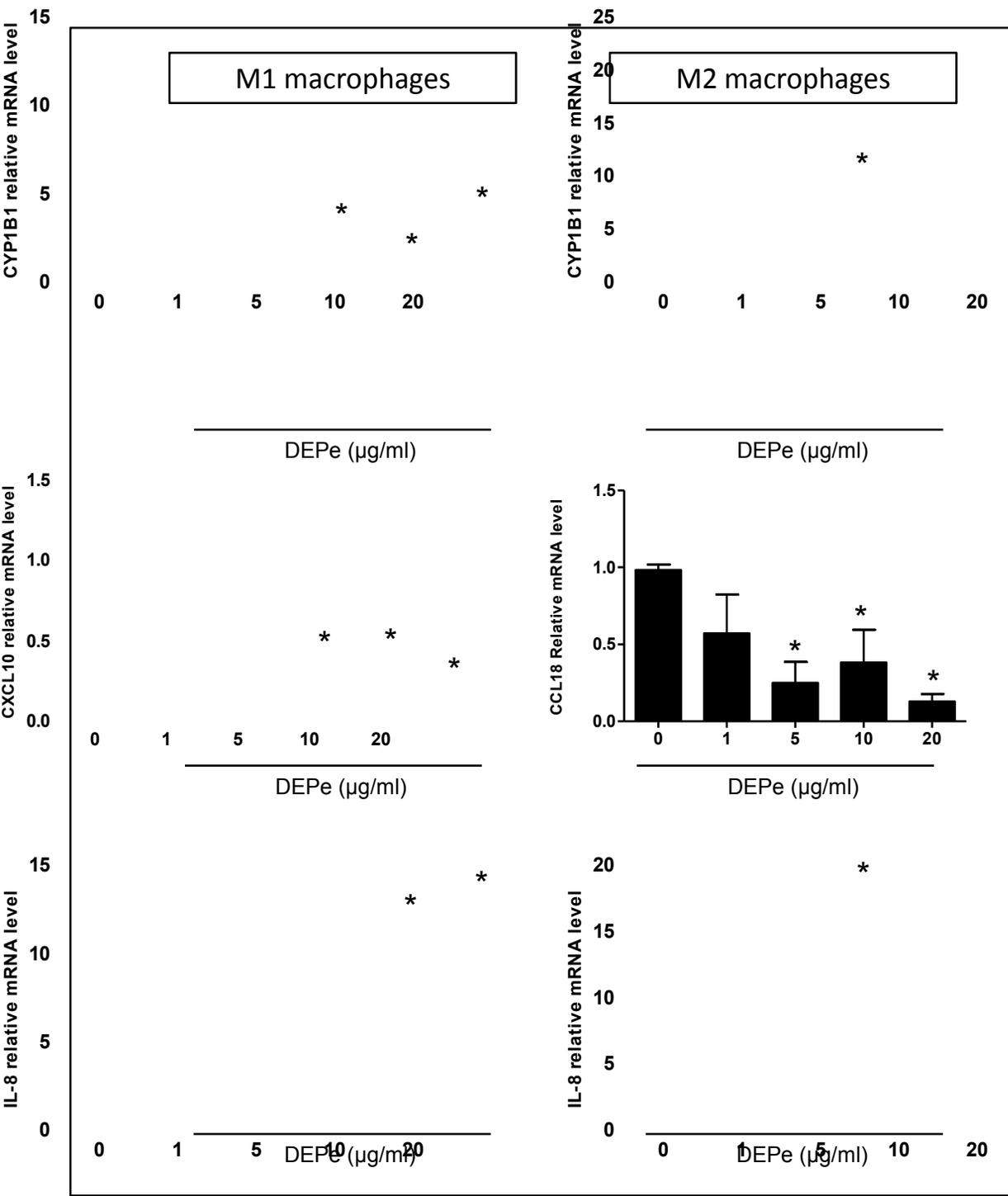
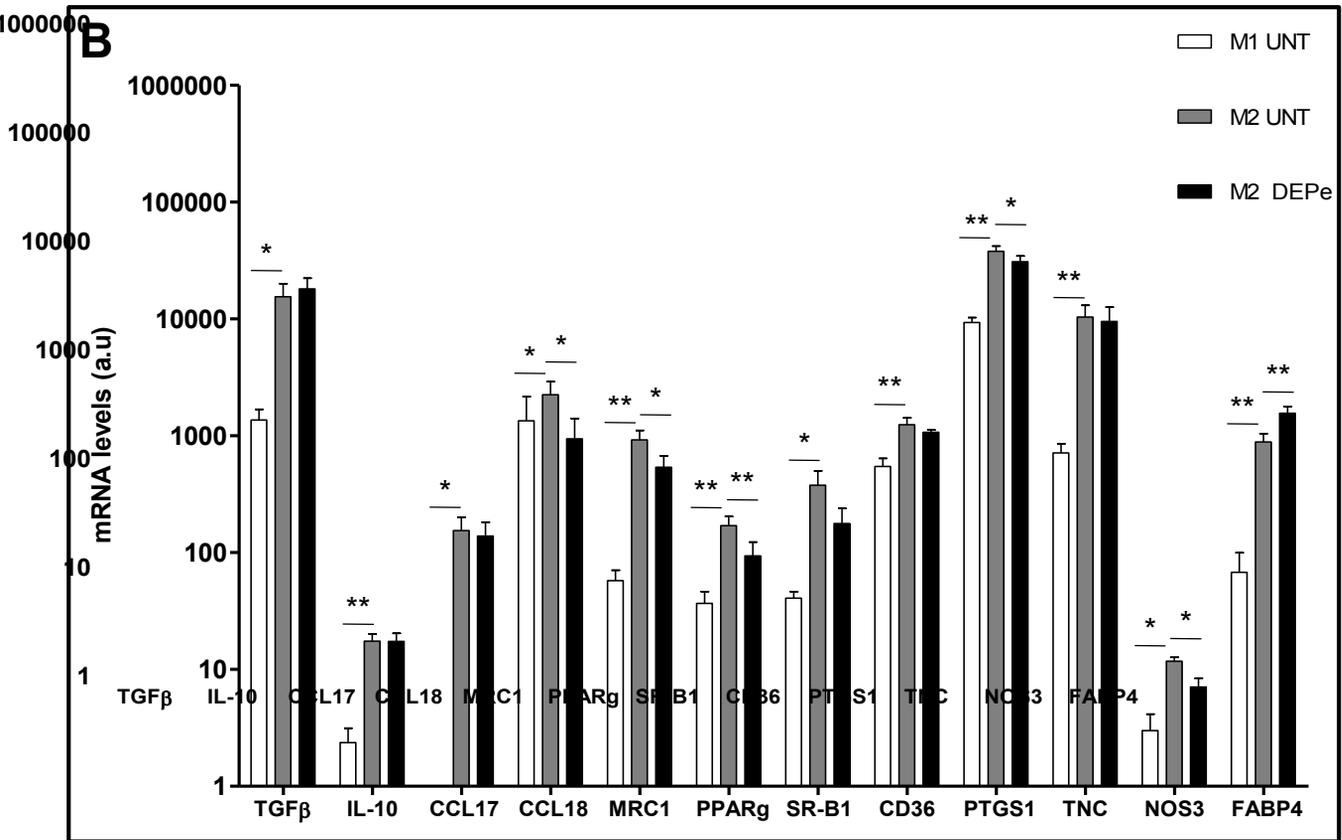
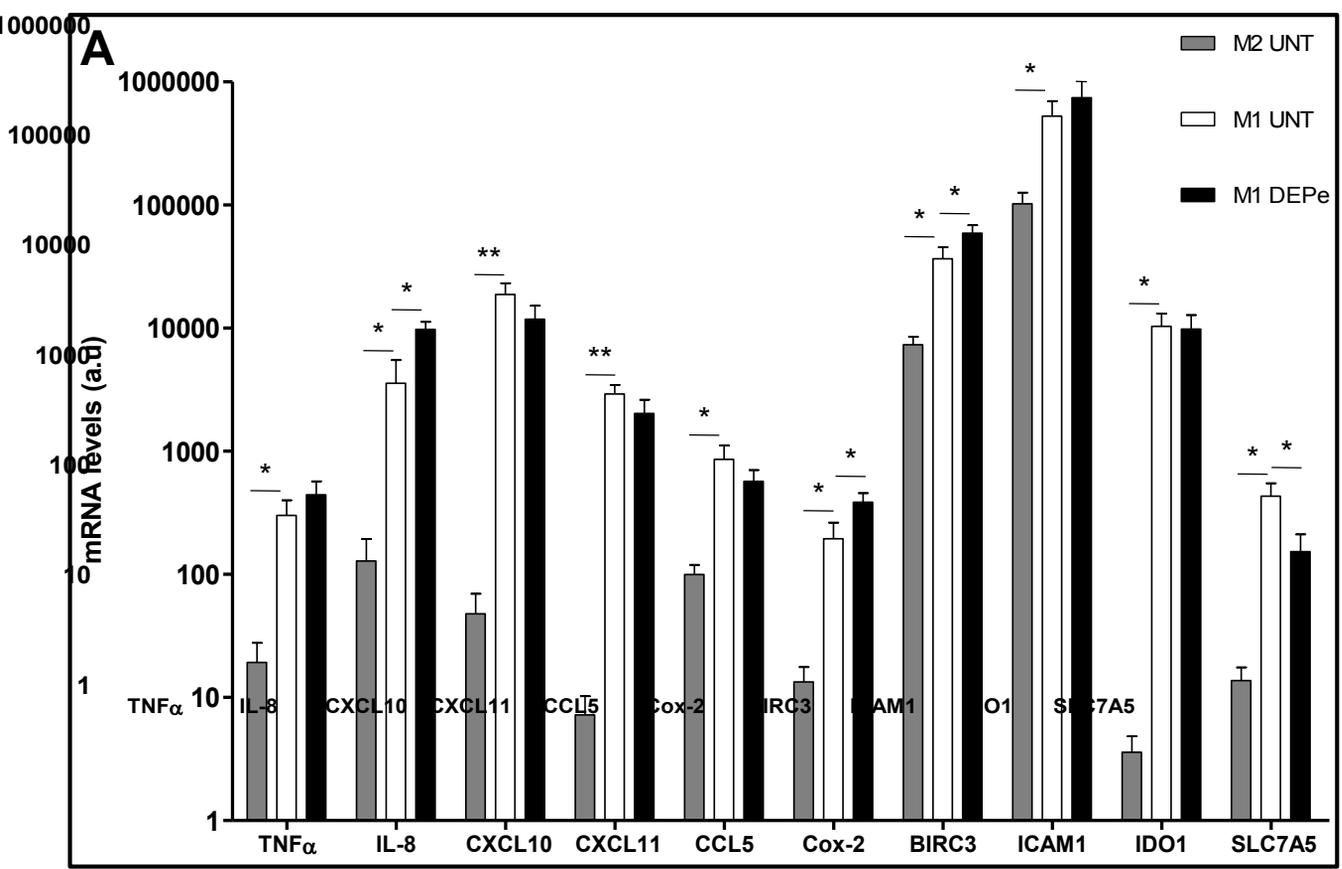


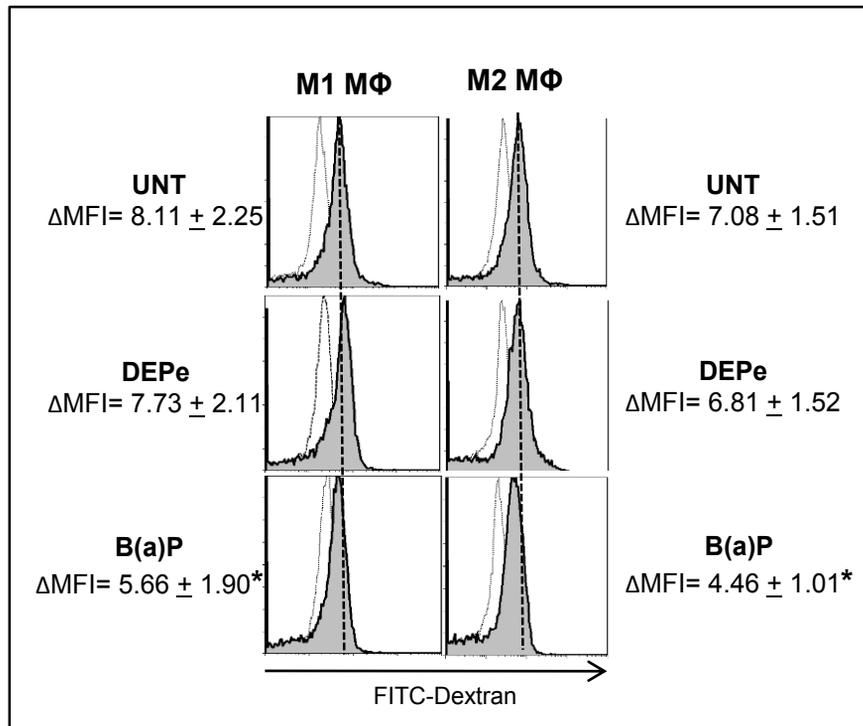
Figure S2



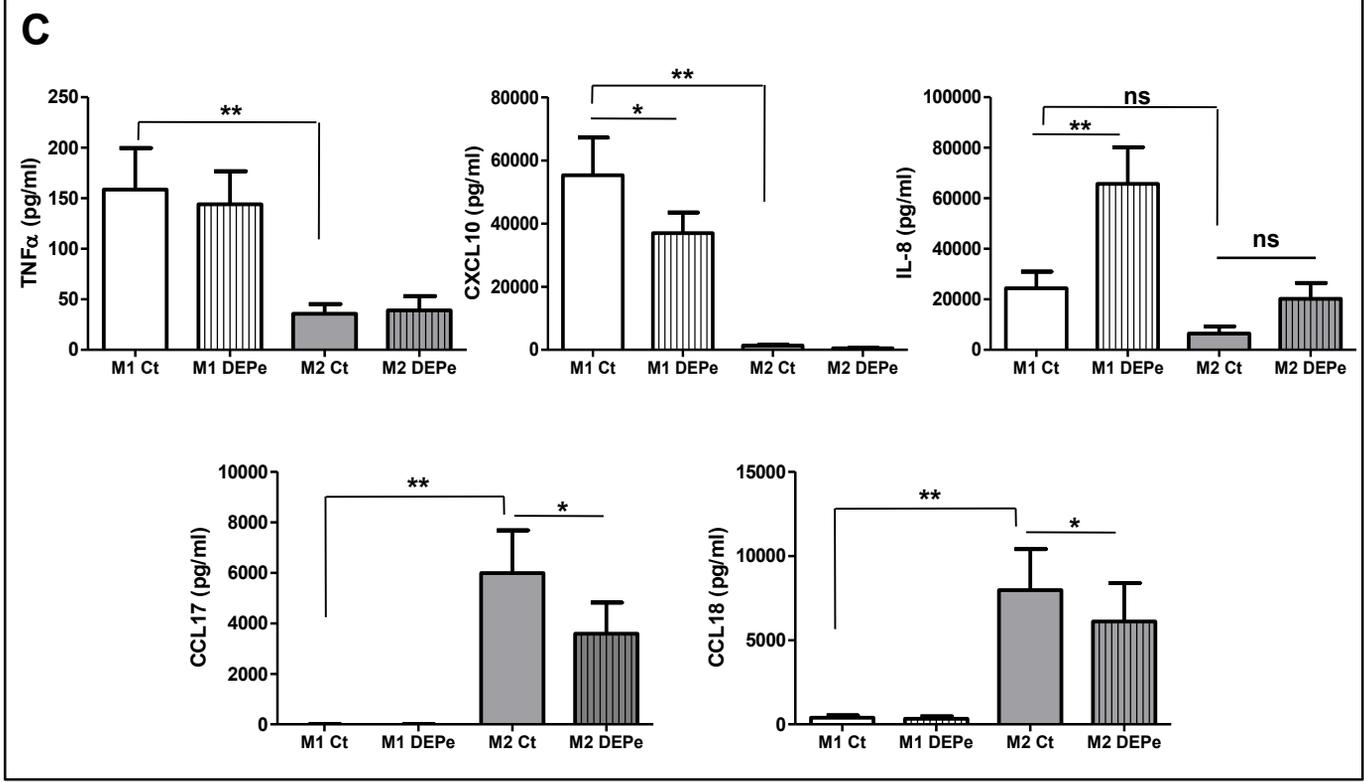
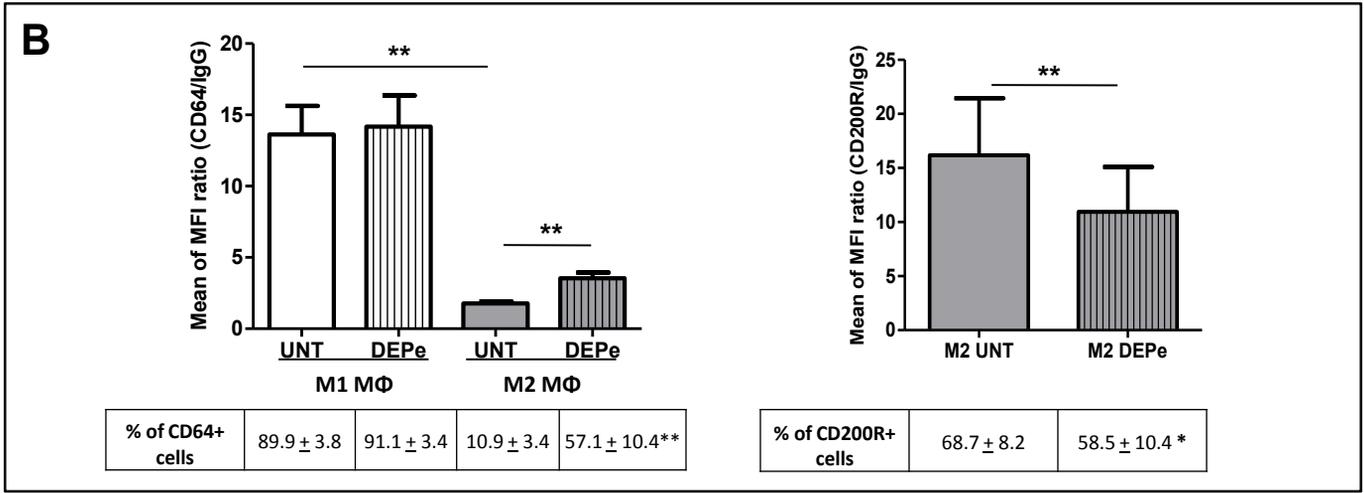
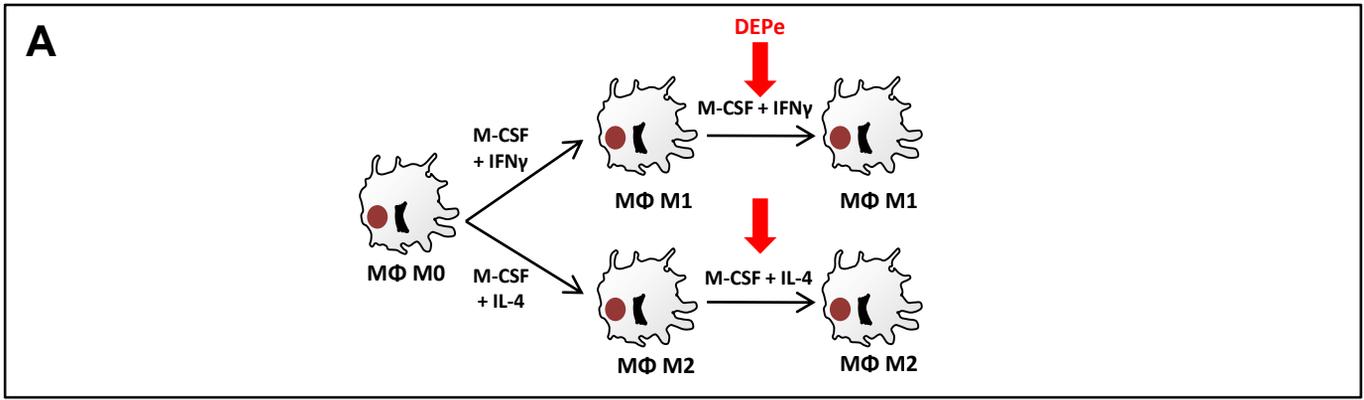
**Figure S3**



**Figure S4**



**Figure S5**



### *III.2.3. Discussion et perspectives*

#### *III.2.3.1. Apport du travail*

Notre étude a permis de mettre en évidence une altération de l'acquisition de certains marqueurs de polarisation dans les M $\phi$  humains M1 et M2 exposés aux extraits organiques de particules diesel (DEPe). Cette altération du phénotype est associée à une diminution de la fonction des M $\phi$ , en particulier le potentiel de réponse inflammatoire à une stimulation au LPS concernant les M $\phi$  M1 et les capacités chimiotactiques des M $\phi$  M2. Au niveau moléculaire, nous montrons également que la perturbation de la sécrétion de certaines cytokines ou chimiokines comme l'IL-6, l'IL-12p40 et CCL18 par les DEPe est dépendante de l'activation d'AhR et/ou de Nrf2.

Nous allons discuter de ce travail en pointant les questionnements restant et les approches envisagées pour y répondre.

#### *III.2.3.2. Effets géniques et phénotypiques des DEPe dans les M $\phi$*

Nous montrons que l'expression d'environ 50 % des gènes spécifiques de la polarisation des M $\phi$  que nous avons étudiés est impactée par les DEPe avec une majorité de diminution. Au niveau protéique, la sécrétion de nombreuses cytokines et chimiokines caractéristiques de l'état d'activation des M $\phi$  est altérée par l'exposition aux DEPe. Toutefois, *a contrario* des études menées sur les M $\phi$  murins exposés à des extraits de fumée de cigarette ou sur les M $\phi$  alvéolaires de patients atteints de BPCO tabagique (422, 421), nous n'observons pas de réelle commutation des M $\phi$  d'un phénotype vers un autre lors d'une exposition aux DEPe.

Les voies de signalisation AhR et Nrf2 sont activées par les DEPe dans les M $\phi$  M1 et M2. L'inhibition moléculaire de Nrf2 ou d'AhR par des ARN interférents prévient la diminution de l'IL-6 induite par les DEPe dans les M $\phi$  M1 stimulés au LPS tandis que seule l'inhibition d'AhR contrecarre la diminution d'IL-12p40 et de CCL18 induite par les DEPe dans les M $\phi$  M1 stimulés au LPS et les M $\phi$  M2 respectivement. Ainsi, il existe très probablement d'autres mécanismes moléculaires pouvant expliquer ces effets partagés.

### **III.2.3.3. Questionnements à approfondir...**

#### *III.2.3.3.1. Les DEPe affectent-ils la signalisation induite par l'IFN $\gamma$ ou l'IL-4 ?*

Les effets transcriptionnels et phénotypiques sur les marqueurs d'activation M1 ou M2 que nous observons lors d'une exposition des M $\phi$  aux DEPe pourraient résulter d'une perturbation des voies d'activation induites par l'IFN $\gamma$  ou l'IL-4.

Nous avons alors étudié l'impact des DEPe sur la phosphorylation de STAT1 induite par l'IFN $\gamma$  dans les M $\phi$  M1 et celle de STAT6 induite par l'IL-4 dans les M $\phi$  M2. Nous n'observons pas de modification de l'état de phosphorylation de ces deux cibles dans les 4 premières heures d'exposition aux DEPe. Ce résultat suggère également que les Suppressors Of Cytokine Signalling (SOCS), de petites protéines intracellulaires qui limitent le signal induit par les cytokines grâce à leur activité phosphatase sur les membres de la famille STAT, ne sont pas impliquées dans les effets des DEPe mis en évidence au cours de l'activation des M $\phi$ .

Un autre argument qui va à l'encontre d'une altération des voies d'activation induites par l'IFN $\gamma$  et l'IL-4 est le fait que l'expression de certains gènes sous le contrôle de ces cytokines ne soit pas modifiée (**article 2, Fig 1** : CCL5, IDO1, ICAM1, et CD36). De plus, nous avons obtenu des résultats similaires sur les M $\phi$  déjà activés puis exposés aux DEPe, indiquant que les effets des DEPe sont indépendants du contexte d'activation des M $\phi$  (**article 2, supp data S5**).

Au total, nous pensons que les effets des DEPe sont gènes-spécifiques et n'affectent pas la globalité du programme de polarisation des M $\phi$ . Néanmoins, l'activation des M $\phi$  induit l'expression d'un large éventail de gènes très distincts et les DEPe impactent l'expression de nombre d'entre eux en rapport avec les fonctions physiologiques soutenues par les M $\phi$  M1 et M2.

#### *III.2.3.3.2. Ahr ou Nrf2 jouent-ils un rôle inhibiteur direct sur l'expression des cytokines et des chimiokines dans les M $\phi$ exposés au DEPe ?*

AhR pourrait inhiber directement l'expression de l'IL-12, de l'IL-6 ou de CCL18 en se fixant sur des éléments XRE au niveau des promoteurs de ces gènes. En effet, il a été retrouvé des éléments XRE-like dans les promoteurs de l'IL-6 et de CCL18 (78, 423). Nrf2 pourrait également se fixer sur des ARE présent sur le promoteur de l'IL-6 (424) et réprimer son expression. Ces hypothèses ont toutefois rapidement été écartées, premièrement car AhR n'est pas connu pour exercer un effet répresseur de la transcription. Deuxièmement, l'analyse *in silico* du promoteur de l'IL-12 ne révèle ni XRE ni ARE. Et troisièmement, nous n'observons pas de surexpression d'IL-12, d'IL-6 ou de CCL18

dans les M $\phi$  contrôles où l'expression d'AhR ou de Nrf2 est inactivée suggérant que ces deux facteurs n'exercent pas du moins au niveau basal un effet répresseur.

#### *III.2.3.3.3. Les effets des DEPe sur les cytokines M1 résultent-ils d'un défaut d'activation de la voie NF- $\kappa$ B ?*

L'IL-6 et l'IL-12 sont deux cytokines dont l'expression est contrôlée par l'activation des membres de la famille NF- $\kappa$ B en réponse à l'activation des TLR, en particulier le TLR4. La diminution de l'expression et de la sécrétion de plusieurs cytokines lors d'une activation du TLR4 par le LPS dans les M $\phi$  préalablement exposés aux DEPe pourrait alors être due à un défaut d'activation de cette voie.

Nous avons donc étudié par western blot l'activation de cette voie par le LPS après exposition des M $\phi$  aux DEPe. Ces polluants ne réduisent ni le niveau de phosphorylation de la sous-unité p65 et de la protéine inhibitrice Ik-B $\alpha$  ni la dégradation de Ik-B $\alpha$ . Nous n'observons pas non plus de variation d'expression de la sous-unité inhibitrice p50. Ces données suggèrent que l'inhibition de la voie NF- $\kappa$ B n'est pas impliquée directement dans les effets observés sur l'expression des cytokines induite par le LPS lors d'une exposition des M $\phi$  à 10  $\mu$ g/ml de DEPe (données non présentées). Il faudrait toutefois vérifier si la translocation nucléaire de p65 et sa capacité de liaison à l'ADN est modifiée par les DEPe.

#### *III.2.3.3.4. La modification des interactions d'AhR avec ses partenaires potentiels peut-elle expliquer les effets des DEPe sur les cytokines et les chimiokines ?*

AhR est connu pour interagir avec d'autre partenaire que l'ARNT comme RelB (p65), STAT1 ou encore Spl et exercer une activité anti-inflammatoire (425–427).

Ainsi, pour faire la part entre ces différentes possibilités, il serait opportun dans notre étude d'immunoprécipiter AhR et NF- $\kappa$ B p65 afin d'identifier ces éventuels partenaires et de mettre en évidence une différence de recrutement de ces derniers lors de l'exposition des M $\phi$  aux DEPe. Il serait par la suite envisageable d'étudier par des techniques d'immunoprécipitation de la chromatine (chIP) l'appauvrissement ou l'enrichissement de ces différents facteurs au niveau des sites consensus  $\kappa$ B et XRE situés sur le promoteur de l'IL-6 et l'IL-12. A plus long termes, des expériences sur les M $\phi$  de souris déficientes pour AhR exposées aux DEP pourraient aussi apporter plus de réponses. Nous pourrions également nous intéresser de la même façon à la régulation de CCL18 par AhR dans les M $\phi$  humains exposés aux DEPe lors de leur activation alternative. En effet, c'est la première fois à notre connaissance que la chimiokine CCL18 est retrouvée régulée par les DEP de façon AhR dépendante.

Une telle diminution de cette chimiokine a également été décrite dans des M $\phi$  alvéolaires de fumeurs (428). Ces données suggèrent qu'un composant commun à ces deux polluants de l'air, comme par exemple les HAP pourrait être impliqué dans cette diminution de l'expression de CCL18 *via* des mécanismes dépendant d'AhR. Toutefois, l'utilisation de modèles murins génétiquement modifiés n'est pas une bonne approche concernant l'étude de la régulation de CCL18 car cette dernière existe seulement chez les primates et ne possède pas d'homologue chez le rongeur (329).

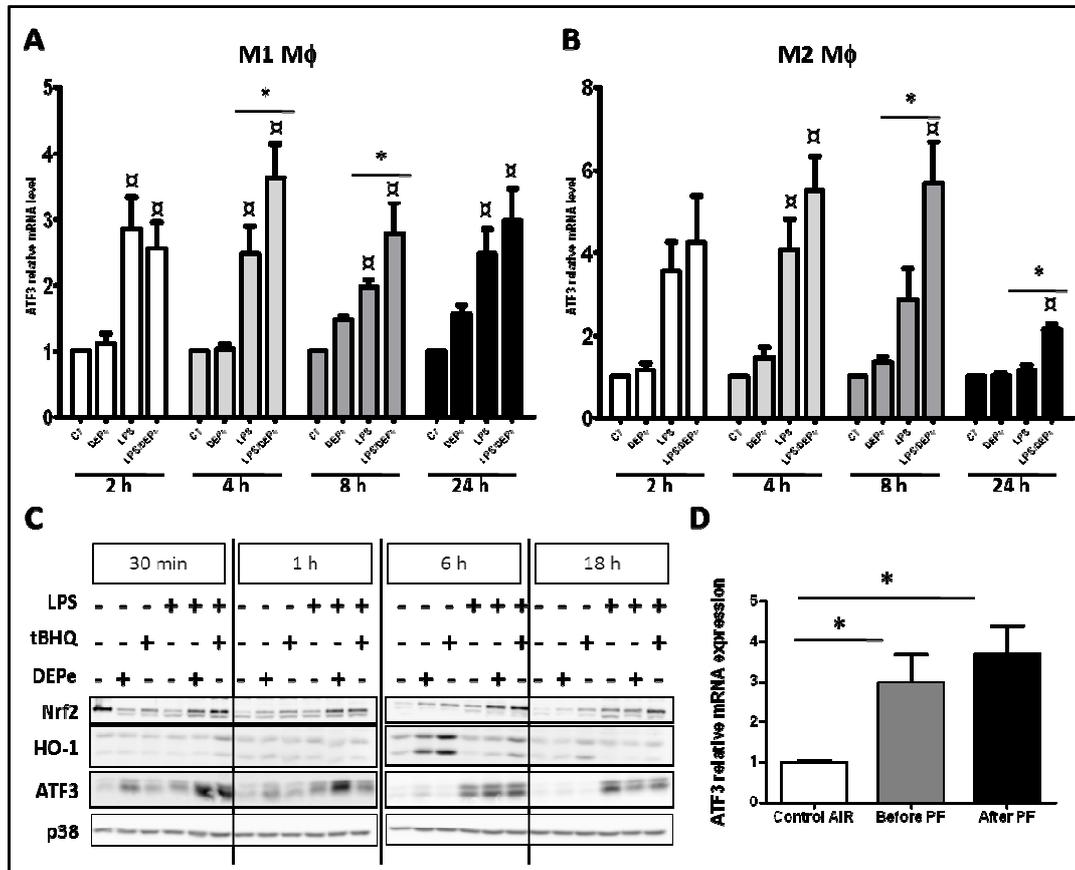
#### *III.2.3.3.5. La diminution de l'expression des cytokines pro-inflammatoires par les DEPe dans les M $\phi$ M1 implique-t-elle l'activation d'un répresseur de la réponse inflammatoire ?*

Les DEPe pourraient agir indirectement sur la diminution des cytokines et des chimiokines pro-inflammatoires en induisant l'expression d'un régulateur négatif de l'inflammation.

En suivant cette hypothèse, Twist2 est un facteur intéressant à étudier car il exprimé entre autre par les cellules myéloïdes (429). Son expression est augmentée par diverses voies de signalisation telles que les voies NF- $\kappa$ B et STAT3 dans un contexte pro-inflammatoire, ou les voies Wnt/ $\beta$ -caténine ou Hypoxic Inducible Factor 1 alpha (HIF-1 $\alpha$ ) en condition hypoxique (430). Twist2 agit comme un régulateur négatif de la réponse inflammatoire en augmentant l'expression de l'IL-10 et en inhibant celle de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires comme l'IL-12, l'IFN $\gamma$ , l'IL-1, le TNF $\alpha$ , l'IL-6, MCP1 et MIP1 $\alpha$  *via* l'inactivation de la voie NF- $\kappa$ B (429). Nous pourrions ainsi envisager d'étudier l'effet des DEPe sur l'expression de ce facteur dans les M $\phi$  M1 exposés aux DEPe.

Dans le même ordre d'idée, l'activation de Nrf2 par les DEPe pourrait agir indirectement sur l'IL-6 en stimulant l'expression du facteur de transcription ATF3 qui possède au niveau de son promoteur des éléments de réponse ARE fonctionnels (431). En effet, ATF3 est un facteur de transcription dont l'expression est induite par l'activation des TLR ou par un stress tel que la production d'EAO et qui exerce des fonctions inhibitrices sur l'expression de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 ou l'IL-12 en réprimant fortement les voies de signalisation activées par le TLR4 en réponse au LPS (432,433). Cette répression fait intervenir des modifications structurales de la chromatine qui restreignent l'accès du facteur de transcription NF- $\kappa$ B à ses séquences consensus situées dans le promoteur de l'IL-6 et de l'IL-12. L'hypothèse d'une implication d'ATF3 dans l'immunosuppression induite par l'exposition de M $\phi$  aux DEPe est à prendre sérieusement en considération compte tenu du fait que les DEPe et le tBHQ (un activateur de Nrf2) semble induire très précocement l'expression d'ATF3 dans les M $\phi$  stimulés au LPS (**Figure 32A, B et C**) ainsi que dans les M $\phi$  M2 (données non présentées). Une étude transcriptomique a d'ailleurs mis en évidence une augmentation de l'expression d'ATF3 dans la lignée macrophagique THP1 après six heures

d'exposition aux DEP (434). De plus, dans un modèle d'exposition aiguë de rats aux particules diesel, des données préliminaires montrent une augmentation de l'expression des transcrits d'ATF3 au niveau pulmonaire (**Figure 32D**).



**Figure 32: Induction de l'expression d'ATF3 par les DEP et leurs composés organiques (DEPe) *in vitro* et *in vivo*.** Après 6 jours de différenciation en présence de M-CSF, les macrophages sont activés en présence d'IFN $\gamma$  (20ng/ml) ou d'IL-4 (20ng/ml)  $\pm$  LPS (20 ng/ml) en présence ou non de 5 $\mu$ g/ml de DEPe pendant le temps indiqué (2, 4, 8 et 24 h) pour obtenir des macrophages (M $\phi$ ) M1 (**A**) et M2 (**B**) respectivement. (**A**, **B**) les niveaux d'ARNm d'ATF3 sont déterminés par RT-qPCR; les données sont exprimées relativement par rapport au niveau d'ARN retrouvé dans les cellules non traitées (CT), arbitrairement fixé à la valeur de 1 et représentent la moyenne  $\pm$  SEM de 4 expériences indépendantes \* $p$ <0.05 ;  $\square$   $p$ <0.05 comparé aux cellules CT. (**C**) Après 6 jours de différenciation en présence de M-CSF, les macrophages sont activés en présence d'IFN $\gamma$  (20ng/ml)  $\pm$  LPS (20 ng/ml) en présence ou non de 5 $\mu$ g/ml de DEPe ou 10  $\mu$ M de tBHQ pendant le temps indiqué (0.5, 1, 6 et 18 h) pour obtenir des macrophages M1. L'analyse de l'expression des protéines par western-blot a été effectuée sur des lysats cellulaires totaux. Le chargement du gel et l'efficacité de transfert ont été vérifiés par l'hybridation la protéine p38 totale. (**D**) Des rat Wistar sont exposés par inhalation pendant 3 h à de l'air (Control Air) ou à 1 mg/m<sup>3</sup> d'émissions de moteur diesel standard (DEP) avant et après un filtre à particule (PF). Les poumons sont collectés après l'exposition; les ARNm totaux des poumons sont isolés et le niveau d'expression des ARNm d'ATF3 a été estimé par RT-qPCR. Les données sont exprimées relativement par rapport au niveau d'ARN retrouvé dans le groupe contrôle (Control AIR), arbitrairement fixé à la valeur de 1. Les résultats correspondent à la moyenne  $\pm$  SEM de 5 rats par groupe \* $p$ <0.05.

Pour évaluer plus précisément la pertinence de cette hypothèse, il faudrait réitérer les expériences pour s'assurer de la reproductibilité de cette surexpression d'ATF3 par les DEPe et des activateurs de Nrf2 dans les M $\phi$ . Pour faire le lien avec Nrf2 il faudrait également évaluer l'effet de l'inactivation de Nrf2 sur l'induction d'ATF3. Enfin, des expériences d'inactivation d'ATF3 par des ARN interférents sont à envisager dans les M $\phi$  exposés aux DEPe pour évaluer son implication dans la diminution de l'expression de cytokines comme l'IL-6, l'IL-12p40 ou même de chimiokines telles que CCL17 et CCL18 ou CCL22.

Etant donné que ces deux facteurs répresseurs (Twist2 et ATF3) agissent aussi par l'intermédiaire de modifications structurales de la chromatine en limitant l'accès au promoteur des gènes cibles, il ne faut pas exclure que les DEPe engendrent des modifications épigénétiques en agissant par exemple directement sur les Histone déacétylase ou les histones acétyl transférases.

#### *III.2.3.3.6. La diminution Nrf2-dépendante de l'IL-6 par les DEPe dans les M $\phi$ M1 est-elle liée à une activation de l'AMP-activated protein kinase (AMPK) ?*

A l'image de Nrf2, l'AMP-activated protein kinase (AMPK) peut aussi être activée par un stress oxydatif. L'AMPK constitue un senseur du statut énergétique de la cellule et son activation peut réduire le stress oxydatif et inhiber l'inflammation (435–437). Une étude récente lie les effets anti-inflammatoires de Nrf2 sur l'expression de l'IL-6 à l'activation de l'AMPK dans les M $\phi$  stimulés au LPS (438). En considérant le fait que (1) nous avons une activation de Nrf2 dans les M $\phi$  exposés aux DEPe et (2) qu'une étude de notre équipe a montré une activation de l'AMPK lors d'une exposition des cellules d'hépatocarcinome murin Hepa1c1c7 au 1-nitropyrene, un composant majeur des extraits de particules diesel (439), nous pouvons émettre l'hypothèse que la régulation de l'IL-6 par les DEPe implique en plus de Nrf2 l'activation de l'AMPK.

Pour tenter de valider cette hypothèse, la première étape serait d'évaluer l'activation de l'AMPK par les DEPe en analysant par western blot son niveau de phosphorylation. Il faudrait également tester si les activateurs de l'AMPK tels que le 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside (AICAR), la metformin ou encore le berberine (BBR) ont les mêmes effets sur l'expression des cytokines que les DEPe. Par la suite, il faudrait évaluer si les DEPe modifient le ratio AMP/ATP dans les M $\phi$  car une élévation de ce ratio est connu pour activer l'AMPK (440).

### *III.2.3.3.7. Un stress du réticulum causé par l'exposition des Mφ aux DEPe peut-il favoriser l'activation de Nrf2 et induire les effets décrits sur les cytokines et les chimiokines ?*

Comme nous l'avons évoqué dans la revue bibliographique (paragraphe I.1.3.5), les effets immunotoxiques des DEPe pourraient être dus à un mécanisme plus global et survenir suite à un stress du réticulum endoplasmique (RE) qui pourrait ainsi atténuer l'expression de nombreuses protéines telles que les cytokines et les chimiokines que nous avons décrits. Le stress engendré favoriserait l'activation de la kinase PERK qui à son tour pourrait activer son substrat Nrf2 (112). Nous avons toutefois écarté cette possibilité dans notre modèle. En effet, dans les Mφ M1 et M2 exposés aux DEPe ou à des molécules activatrices du stress du RE, la tHAPigargine et la tunicamycine pendant 6h, nous n'avons pas trouvé d'augmentation ni de l'expression de la protéine chaperonne BIP (Immunoglobulin binding protein) ni du niveau de phosphorylation de EIF2 $\alpha$ , deux éléments indiquant un stress du réticulum, excepté lors du traitement par les deux inducteurs du stress du RE. Ces données suggèrent qu'à la dose de 10  $\mu$ g/ml, les DEPe n'activent pas cette voie spécifique du stress du RE dans les Mφ humains polarisés (données non présentées). Toutefois, d'autres expériences seraient utiles pour résoudre clairement cette question puisque récemment des études ont mis en évidence une induction de l'expression du facteur ATF3 lors d'un stress du RE (441, 442). De manière intéressante, l'activation d'un stress du RE par la tHAPigargine conduit à une augmentation de l'expression de ATF3 qui à son tour inhibe l'expression du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  conduisant à une altération de la différenciation adipocytaire (442). D'après des données préliminaires, dans notre modèle et dans la lignée monocyttaire THP1 différenciée en Mφ par du phorbol 12-myristate 13 acetate (PMA), il semblerait que ATF3 soit aussi induit par la tHAPigargine et par la tunicamycine. Parallèlement à l'induction d'ATF3, nous observons une diminution de l'expression de PPAR $\gamma$  dans les Mφ M2 exposés aux DEPe laissant supposer qu'une régulation similaire est envisageable dans notre modèle.

### ***III.2.3.4. Conclusion et perspectives***

Cette étude démontre que l'exposition *in vitro* des Mφ aux DEPe au cours de leur activation réduit l'acquisition de nombreux marqueurs caractéristiques de la polarisation M1 et M2. Sur le plan fonctionnel, les DEPe diminuent fortement les capacités de réponses des Mφ M1 au LPS en limitant, la sécrétion de l'IL-12 et de l'IL-6, ainsi que les propriétés chimiotactiques des Mφ M2 en réduisant la migration de cellules lymphocytaires induite par les chimiokines CCL17 et CCL22.

Pour appuyer nos résultats sur les effets immunosuppresseurs des DEPe, il pourrait être intéressant par la suite d'effectuer des expériences de co-cultures allogéniques afin d'évaluer les

conséquences d'une telle exposition sur l'activation et la polarisation des lymphocytes ou bien encore des cellules NK. Nous montrons également que les facteurs AhR et Nrf2 sont impliqués dans ces effets immunosupresseurs. Cependant, des études complémentaires sont à envisager pour préciser les mécanismes et identifier les acteurs moléculaires qui contrôlent les effets décrits. Pour conclure définitivement sur les voies de signalisation impactées par ces polluants urbains, des approches plus globales d'étude transcriptomique ou protéomique des M $\phi$  exposés aux DEPe et aux particules au cours des différents états d'activation pourraient apporter des réponses. Ainsi, en altérant l'expression des marqueurs d'activation M1 et M2 et la physiologie des M $\phi$ , les DEP peuvent altérer les réponses immunitaires et en définitive augmenter la susceptibilité aux infections respiratoires des individus exposés à ce polluant atmosphérique urbain majeur.



### III.3. Article 3:

#### **AhR-dependent secretion of PDGF-B by human M1 and M2 macrophages exposed to DEP extracts stimulates lung fibroblast proliferation**

Marie JAGUIN, Olivier FARDEL, and Valérie LECUREUR

*Soumis à Toxicology and Applied Pharmacology le 04.12.14*

*En révision depuis le 24.02.15*

##### *III.3.1. Contexte de l'étude*

Nous venons de décrire l'impact immunosuppresseur des DEPe sur l'activation M1 et M2 des M $\phi$ . Toutefois, la nature exacte des altérations subies par d'autres fonctions clés de ces cellules et leurs effets délétères sur la santé humaine n'est pas totalement caractérisée. En parallèle de ce travail et dans le but d'identifier de nouvelles cibles des DEPe, nous avons réalisé un criblage des gènes associés à l'exposition des M $\phi$  à ces polluants au cours de leur activation en utilisant une puce-PCR dédiée à l'athérosclérose (atherosclerosis RT2 profiler PCRarray Sabiosciences, Courtaboeuf, France). L'analyse des profils d'expression génique révèle une induction de l'expression des ARNm du platelet derived growth factor-B (PDGF-B) par les DEPe dans les M $\phi$  M0, M1 et M2.

**Nous avons donc mené une étude *in vitro* portant sur la régulation de PDGF-B par les DEPe dans les M $\phi$  activés M1 et M2.**

##### *III.3.2. Pourquoi s'intéresser à PDGF-B ?*

PDGF-B est un puissant facteur mitogène pour de nombreuses cellules d'origine mésenchymateuse, tels que les myofibroblastes et des cellules musculaires lisses (443, 444). Ce facteur de croissance contribue notamment aux physiopathologies associées à une exposition au DEP comme la fibrose pulmonaire, l'athérosclérose ou le cancer (445, 167, 446, 447). Récemment, une étude épidémiologique a associé pollution atmosphérique et développement de la fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) (448). En effet, la pollution particulaire urbaine et les résidus volatiles de cendres de pétrole favorisent la croissance des cellules mésenchymateuses en induisant l'expression du récepteur PDGF-R alpha (PDGF-R $\alpha$ ). Ces effets semblent dépendre de la sécrétion de cytokines par les M $\phi$  (449, 450). De plus, les M $\phi$  alvéolaires et les cellules épithéliales de rats exposés aux DEP produisent du PDGF (451). Toutefois, ni les effets des DEP sur l'expression de PDGF-B ou sur les

récepteurs aux PDGF dans les M $\phi$  humains et en particulier dans les M $\phi$  activés, ni les voies moléculaires impliquées dans cette régulation n'ont été à ce jour étudiés.

Avant de présenter notre travail, nous allons introduire dans le prochain chapitre la famille des PDGF et de leur récepteur.

### III.3.3. Le Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)

La famille PDGF est constituée de 5 protéines homo ou hétéro-dimériques PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC et PDGF-DD (Figure 34) encodées par 4 gènes PDGF-A et PDGF-B, PDGF-C et PDGF-D (Figure 33). Les membres de la famille PDGF ont un rôle crucial au cours du développement et dans une moindre mesure sur les fonctions physiologiques normales de l'adulte. L'augmentation de l'activité mitogène de PDGF contribue également au développement de certaines pathologies liées à une prolifération cellulaire excessive telles que certains cancers, l'athérosclérose ou encore la fibrose tissulaire. La famille PDGF appartient à une superfamille de facteurs de croissance structurellement et fonctionnellement apparentés aux facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGFs) (452).

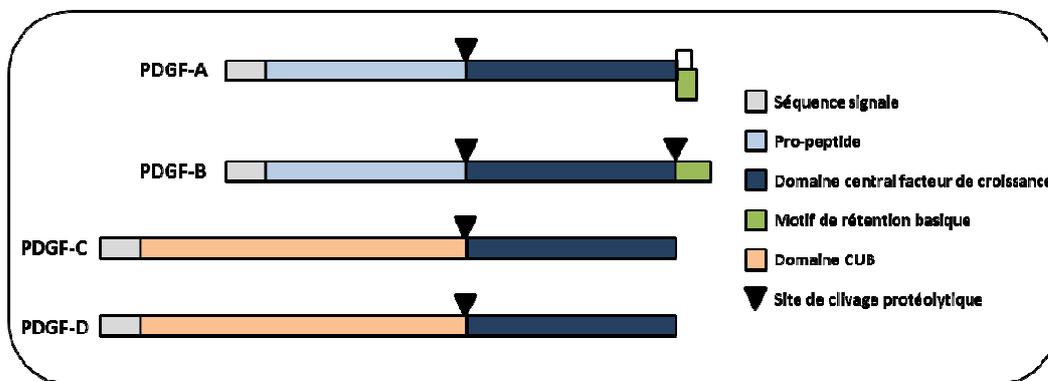
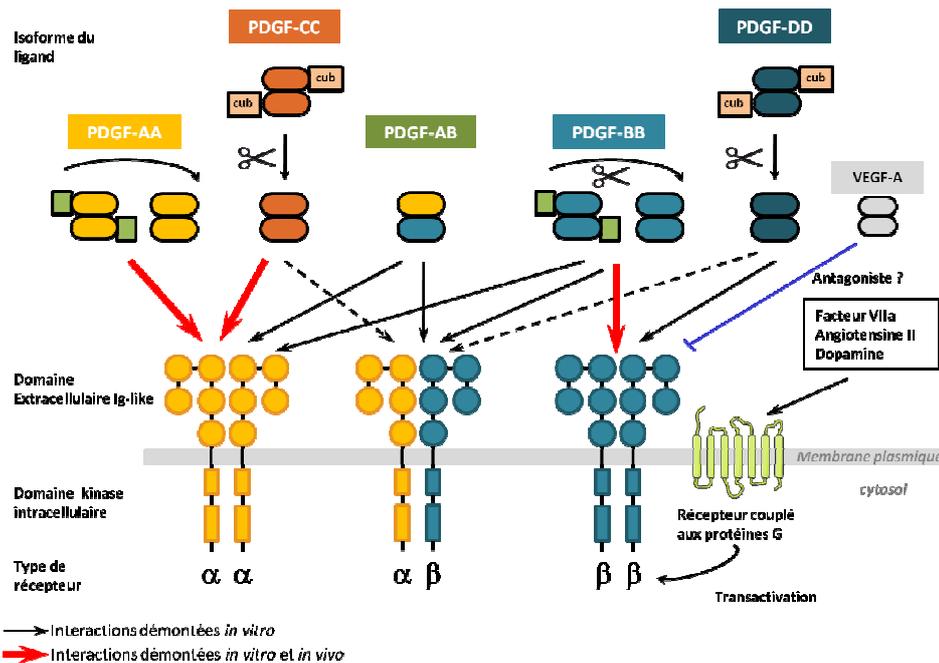


Figure 33: La famille des PDGF chez les mammifères. Adapté de (443).

#### III.3.3.1. La famille des ligands PDGF et leurs récepteurs

Les gènes de la famille PDGF ont évolué à partir de la duplication des gènes ancestraux VEGF présents chez *Caenorabditis elegans* et *Drosophilia melanogaster*. Les différentes isoformes de PDGF sont codées par quatre gènes différents : le PDGF-A, -B, -C et -D et sont sécrétées principalement sous forme d'homodimères reliés par deux ponts disulfures. Seul un hétérodimère PDGF-AB est sécrété par les plaquettes humaines activées, à partir desquelles il a été initialement purifié. Cependant, les profils d'expression endogènes de PDGF-A et PDGF-B ne se superposent pas suggérant que la présence d'hétérodimères *in vivo* est peu fréquente (443). Tous les membres de cette famille portent un domaine central facteur de croissance contenant un ensemble conservé de résidus cystéines (Figure 33). La présence de ce domaine est nécessaire et suffisante pour la liaison et l'activation de leur récepteur spécifique. Les PDGF agissent généralement en condition normale de façon paracrine. Ainsi, les ligands sont sécrétés par les plaquettes humaines activées et par d'autres types cellulaires comme les cellules endothéliales, épithéliales, gliales et les cellules inflammatoires telles que les M $\phi$  activés (447, 453). Les cellules cibles de ces ligands sont essentiellement d'origine mésenchymateuse.



**Figure 34: Interactions des différentes isoformes des ligands PDGF avec les récepteurs aux PDGF. Adapté de (447).** Les ligands PDGF agissent par l'intermédiaire de deux récepteurs à tyrosine kinase PDGFR $\alpha$  et PDGFR $\beta$ . Ces deux récepteurs possèdent des domaines structuraux communs dont 5 domaines extracellulaires Immunoglobuline-like impliqués dans la reconnaissance spécifique du ligand dimérique et une queue cytoplasmique comportant un domaine à activité tyrosine kinase responsable de la transduction intracellulaire du signal. La liaison du ligand entraîne la dimérisation du récepteur initiant ainsi la signalisation. En fonction du ligand et des profils d'expression des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ , trois types de récepteurs dimériques peuvent être formés:  $\alpha\alpha$ ;  $\alpha\beta$  et  $\beta\beta$ . PDGFR $\alpha$ / $\alpha$  lie toutes les isoformes de PDGF à l'exception de PDGF-DD tandis que PDGFR $\beta$ - $\beta\beta$  lie avec une forte affinité les homodimères PDGF-BB et PDGF-DD. In vivo, seules les interactions fonctionnelles entre le PDGFR $\alpha$ / $\alpha$  et les isoformes PDGF-AA et CC ainsi qu'entre le PDGFR $\beta$ - $\beta\beta$  et PDGF-BB ont été retrouvées. La forme hétérodimérique lie les isoformes PDGF-AB, BB et possiblement CC et DD (flèches pointillées). Le PDGFR $\beta$  peut également être transactivés via l'activation de RCPG par différents agonistes (angiotensine II, dopamine et Facteur VIIa) (454–456). Le facteur VEGF-A se lie aussi aux récepteurs PDGF et pourrait soit induire la migration de cellules mésenchymateuses (457), soit agir comme un antagoniste puissant des récepteurs PDGF (458).

### III.3.3.2. Expression, synthèse et biodisponibilité des ligands PDGF

Les ligands PDGF agissent en condition physiologique en tant que facteurs paracrines. Ils peuvent également être engagés dans des boucles de stimulation autocrines au niveau de certaines tumeurs. L'expression des ligands PDGF et de leurs récepteurs spécifiques est régulée de manière spatio-temporelle durant le développement et à l'âge adulte. L'expression des ligands PDGF dans des modèles de culture cellulaire est dynamique et peut être induit par de nombreux stimuli comme l'hypoxie, les thrombines, des cytokines, des esters de phorbol, le TGF $\beta$  et des facteurs de croissances dont le PDGF lui-même (443, 459). Une étude récente montre que la transcription de PDGF-B est régulée par CXCL12 (SDF-1 $\alpha$ ) qui stimule la liaison de ELK-1 sur ses éléments de réponses situés sur le promoteur de PDGF-B (460).

L'expression des récepteurs aux PDGF dans les cellules mésenchymateuses est globalement faible *in vivo* mais augmente de façon importante lors d'épisodes inflammatoires et également dans les cultures cellulaires *in vitro*. Plusieurs facteurs (TGF $\beta$ , oestrogènes, IL-1 $\alpha$ , FGF2, TNF $\alpha$  et le LPS) induisent l'expression de ces récepteurs (443).

Il existe des spécificités cellulaires au niveau de l'expression des ligands et des récepteurs : le PDGF-B est principalement exprimé dans les cellules vasculaires endothéliales, les mégacaryocytes et les neurones. Les isoformes PDGF-A et PDGF-C sont exprimées dans les cellules épithéliales et les progéniteurs musculaires et neuronaux. L'expression du PDGF-D est moins bien caractérisée mais est observée dans les fibroblastes et dans certaines cellules musculaires lisses. PDGFR $\alpha$  est particulièrement présent au niveau des précurseurs mésenchymateux pulmonaires, intestinaux, oligodendrocytaires et de la peau. L'expression du PDGFR $\beta$  est plus restreinte aux cellules musculaires lisses vasculaires et aux péricytes (443, 461).

La synthèse et la bioactivation des ligands PDGF sont contrôlées à plusieurs niveaux et diffèrent selon le ligand considéré. Les dimères PDGF-AA et PDGF-BB sont synthétisés sous forme de pro-peptides. L'activation de ces ligands nécessite le clivage de ces pro-domaines localisés en N-terminal par des protéases intracellulaires. Une fois sécrétés, la distribution cellulaire de PDGF-AA et PDGF-BB est régulée par leur interaction avec des composants de la matrice extracellulaire. Pour ces deux dimères cette rétention s'effectue grâce à un motif C-terminal chargé positivement (appelé motif de rétention) qui contient une forte proportion d'acides aminés basiques (**Figure 33 et 34**). La présence de ce motif de rétention est régulée par épissage alternatif pour PDGF-AA et par clivage protéolytique pour PDGF-BB. L'interaction des différentes isoformes des ligands PDGF avec les récepteurs aux PDGF est détaillée **Figure 34**.

### ***III.3.3.3. Signalisation induite par le PDGF***

La liaison du ligand entraîne la dimérisation du récepteur conduisant à son autophosphorylation en trans au niveau des résidus tyrosines intracellulaires (462). Cette autophosphorylation fournit des sites de recrutement au niveau du récepteur pour les molécules effectrices de la signalisation. La plupart des molécules impliquées dans la transduction intracellulaire du signal PDGF-R reconnaissent spécifiquement les résidus tyrosines phosphorylés au niveau du récepteur à travers leurs domaines SH2 (Src Homology 2). L'engagement des récepteurs PDGFR $\alpha$  et  $\beta$  active différentes voies de signalisation et principalement les voies Ras-MAPK, PI3K et PLC $\gamma$  conduisant à différentes réponses cellulaires et développementales (prolifération, migration ou survie) (**Figure 35**).

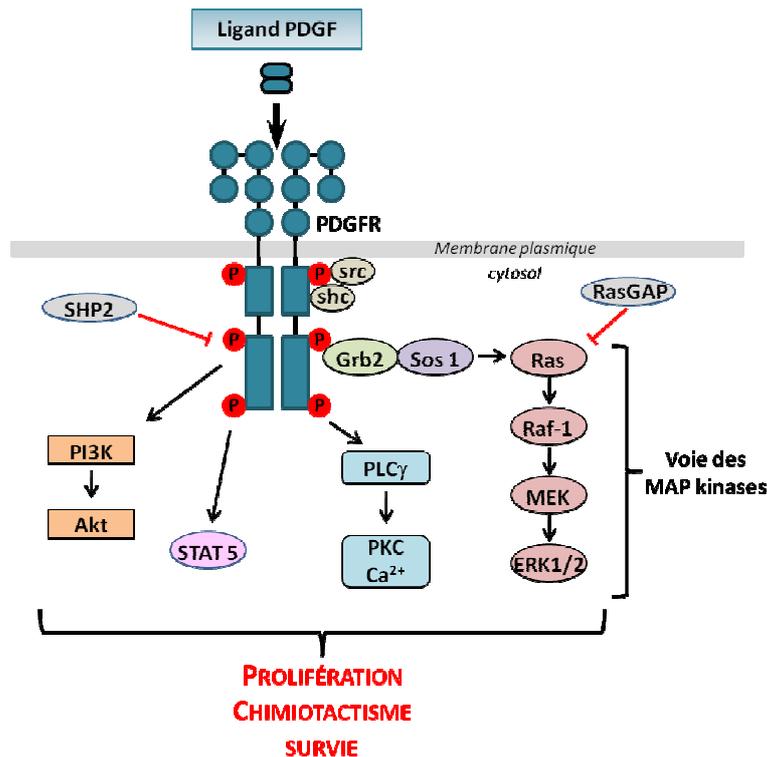


Figure 35: Voies de signalisation activées par les PDGFR. D'après (447).

L'activation de la voie Ras-MAPK par les récepteurs PDGF passe essentiellement par deux protéines adaptatrices Grb2 et Shc. Grb2 se lie au récepteur PDGF activé par l'intermédiaire de son domaine SH2 et recrute alors Sos1 *via* son domaine SH3. En retour, Sos1 active Ras conduisant à l'activation séquentielle en aval de Raf-1 et de la cascade des MAPK, MEK, ERK1 et 2 (Figure 35). L'activation de cette voie induit la transcription de gènes stimulant la croissance, la différenciation et la migration cellulaire (443).

Les PI3 kinases (PI3K) constituent une famille d'enzyme comprenant des effecteurs comme la sérine/thréonine kinase Akt/PKB, quelques membres des PKC, la p70S6 kinase, JNK et les petites Rho-GTPases qui phosphorylent les phosphoinositides. L'activation de cette voie par les récepteurs aux PDGF favorise la réorganisation des filaments d'actine, dirige les mouvements cellulaires, stimule la croissance cellulaire et inhibe l'apoptose (463).

La phospholipase C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) est aussi capable de se lier aux PDGFR ce qui conduit à sa phosphorylation. L'activation de la PLC $\gamma$  déclenche la mobilisation intracellulaire de calcium et conduit à l'activation de PKC. L'activation de cette voie par les PDGFR favorise la croissance cellulaire et la motilité (464).

La signalisation déclenchée par l'activation des PDGFR est fortement régulée par différents mécanismes de rétrocontrôle. Le récepteur activé ainsi que ses substrats sont notamment déphosphorylés par la tyrosine phosphatase SHP2 (465). La protéine Ras-GAP se lie au PDGFR $\beta$  *via* son domaine SH2 et inhibe l'action de Ras (466) (**Figure 35**). Par ailleurs, l'interaction PDGF/PDGFR favorise l'ubiquitination et l'internalisation du complexe par endocytose et conduit à sa dégradation au niveau des lysosomes limitant ainsi la durée du signal PDGF (467).

#### ***III.3.3.4. Fonctions physiologiques de PDGF***

Le PDGF est un facteur de croissance avec des propriétés mitogènes et chimiotactiques importantes vis-à-vis des cellules mésenchymateuses comme les fibroblastes ou les cellules musculaires lisses (461).

L'étude du phénotype des souris déficientes pour les ligands PDGF ou leurs récepteurs a révélé des rôles essentiels de ces facteurs de croissance au niveau du développement embryonnaire qui sont résumés dans le **Tableau 5**.

Moins d'informations sont disponibles concernant le rôle physiologique des PDGF à l'âge adulte notamment à cause de la mortalité précoce des modèles murins génétiquement modifiés. Toutefois, la sécrétion de PDGF par les plaquettes et leur activité mitogène et chimiotactique sur les fibroblastes suggèrent fortement leur implication dans la réparation tissulaire. Une étude vient renforcer cette idée en montrant que le traitement par du Becaplermin, un gel cicatrisant à base de PDGF-BB recombinant, accélère la réparation des ulcères chez des patients diabétiques (468). De plus, un effet secondaire de l'inhibition des PDGFR chez des patients atteints de cancer est la présence d'œdèmes. En lien avec cette observation, les souris mutantes viables exprimant des PDGFR $\beta$  avec un défaut d'activation de la voie PI3K ont des problèmes de régulation de la pression des fluides interstitiels. Ces effets semblent liés à la capacité du PDGF-BB à induire la contraction des fibroblastes dans la MEC (469). Par ailleurs, une surexpression ectopique de PDGF-B dans l'épithélium pulmonaire de souris génétiquement modifiées conduit à une réponse pléiotropique avec principalement la formation de lésions emphysémateuses, fibrotiques et inflammatoires (470).

#### ***III.3.3.5. Rôles physiopathologiques des PDGF***

Considérant les fonctions des PDGF, leur profil d'expression et leurs cellules cibles, ces facteurs de croissances sont impliqués dans de nombreuses pathologies principalement divisées en 3 groupes : les tumeurs, les maladies vasculaires comme l'athérosclérose et les fibroses. De manière générale, deux types cellulaires semblent répondre de manière pathologique aux PDGF, les cellules

	Souris PDGF-A <sup>-/-</sup> et PDGFα <sup>-/-</sup>		Souris PDGF-B <sup>-/-</sup> et PDGFβ <sup>-/-</sup>	
ORGANE CIBLE	PHÉNOTYPE OBSERVÉ	CELLULES IMPLIQUÉES	PHÉNOTYPE OBSERVÉ	CELLULES IMPLIQUÉES
POUMON	- Phénotype emphysémateux: défaut de formation des alvéoles pulmonaires, absence de cellules musculaires lisses alvéolaires, absence de dépôt d'élastine	- Défaut de migration et de prolifération des précurseurs		
SYSTÈME NERVEUX CENTRAL (SNC)	- Malformation du SNC : hypomyélinisation	- Défaut de prolifération des progéniteurs oligodendrocytaires		
TESTICULES	- Dysfonctionnement des testicules : arrêt de la spermatogonie	- Absence de prolifération et de différenciation des précurseurs des cellules de Leydig		
SQUELETTE	- Défaut squelettique: altération du développement des vertèbres et des côtes	- Réduction de la taille des somites		
VAISSEAUX SANGUINS			- Défaut de morphogénèse des capillaires sanguins (diminution de la taille)	- Hémorragies microvasculaires généralisées
REIN			- Malformation des structures glomérulaires rénales	- Absence de cellules mésangiales (péricytes des glomérules rénaux).
OEIL			- Rétinopathie sévère	- Diminution de la densité des péricytes au niveau de la rétine

musculaires lisses vasculaires (CMLV) qui sont à l'origine de pathologies des parois des vaisseaux et les fibroblastes impliqués dans le développement des lésions fibrotiques.

**Tableau 5: Phénotypes observés chez les souris PDGF-A<sup>-/-</sup>, PDGFRα<sup>-/-</sup> et PDGF-B<sup>-/-</sup> et PDGFRβ<sup>-/-</sup>. D'après (461, 471, 472).**

### *III.3.3.5.1. PDGF et cancers*

Les ligands PDGF et leur récepteurs sont des proto-oncogènes qui peuvent être surexprimés ou suractivés dans les cellules cancéreuses par de nombreuses altérations génétiques (amplification génique, translocation et mutations activatrices) (473). En accord avec les profils d'expression des

PDGF et des PDGFR, ces altérations sont essentiellement retrouvées dans les tumeurs d'origines mésenchymateuses et gliales comme les sarcomes et les gliomes. Dans 95% des dermatofibrosarcomes protuberans, il existe une translocation du gène PDGF-B qui conduit à la fusion du promoteur de la chaîne de collagène de type 1 (COL1A1) et du gène PDGF-B (474). Ce défaut induit la sécrétion massive de PDGF-BB par les fibroblastes de la peau (exprimant normalement COL1A1) et crée ainsi une boucle autocrine qui favorise la prolifération cellulaire et la fibrose (475). Une amplification du gène PDGFR $\alpha$  est couramment retrouvée dans certains glioblastomes provoquant une activation constitutive de ce récepteur (443). De plus, les tumeurs stromales gastrointestinales sont souvent porteuses de mutations activatrices au niveau du domaine kinase des PDGFR (443). Il existe au moins 6 types de translocations différentes du gène PDGFR $\beta$  dans les désordres myéloïdes et les leucémies aiguës (475). Ces réarrangements chromosomiques créent des gènes de fusion encodant des oncoprotéines chimériques constitutivement actives formées de la partie N-terminale d'une protéine intracellulaire fusionnée au domaine catalytique cytosolique du PDGFR $\alpha$  ou  $\beta$ .

Une boucle de stimulation autocrine de PDGF joue aussi un rôle dans le développement de tumeurs cérébrales malignes ou de gliomes en stimulant la prolifération des clones préneoplasiques et/ou génétiquement instables. Le mécanisme par lequel la surexpression de PDGF est activée dans les cellules cancéreuses gliales n'est pas bien caractérisé mais pourrait impliquer le TGF $\beta$  qui activerait la transcription et la sécrétion de PDGF-B. La production autocrine de PDGF peut aussi favoriser l'invasion et les métastases de certaines tumeurs épithéliales.

Par ailleurs, l'existence d'un signal paracrine de PDGF favorise le recrutement et le développement de différentes cellules stromales comme les fibroblastes associés aux tumeurs solides. En régulant ainsi les fonctions des cellules du stroma tumoral, les signaux induits par le PDGF favorisent l'angiogénèse et limitent la délivrance des thérapies anti-cancéreuses du fait de l'action de ces ligands sur la pression tissulaire interstitielle (469).

#### *III.3.3.5.2. PDGF et athérosclérose*

Les cellules présentes au niveau des lésions athérosclérotiques (CMLV, cellules inflammatoires et immunitaires infiltrantes) sont toutes susceptibles d'exprimer les PDGF. Les niveaux d'expression de PDGF-A et PDGF-B en particulier sont augmentés dans ce type de lésions comparés à ceux retrouvés dans les vaisseaux normaux (476). Les récepteurs PDGFR $\alpha$  et  $\beta$  sont également plus exprimés au niveau des CMLV des parois des vaisseaux athérosclérotiques. Plusieurs conditions associées avec le développement de maladies cardiovasculaires comme l'augmentation de la pression sanguine ou l'hypercholestérolémie affectent l'expression des PDGF et de leurs récepteurs. Une stimulation  $\alpha$ -adrénergique dans la paroi des vaisseaux conduit également à une surexpression vasculaire de PDGF-A (477). L'adhérence des monocytes au niveau de lésions de l'endothélium et

leur accumulation dans l'intima où ils se différencient en M $\phi$  contribuent à la formation initiale des lésions athéromateuses (478). L'hypercholestérolémie constitue le facteur de risque le plus important associé au développement des maladies cardiovasculaires. Ainsi, une étude révèle que les niveaux d'ARNm de PDGF-A et PDGF-B sont 15 à 20 fois supérieurs dans les leucocytes circulants de 12 patients présentant une hypercholestérolémie comparés à ceux retrouvés chez 8 individus sains (479, 480). La libération de PDGF par les plaquettes agrégées au niveau des lésions de l'endothélium joue également un rôle important dans la migration des CMLV de la média vers l'intima et dans leur prolifération au niveau des sites lésionnels (443).

De nombreuses études de perte ou de gain de fonction ont mis en évidence l'implication des PDGF dans des modèles animaux d'athérosclérose. L'absence de PDGF-B ou le blocage de ces récepteurs réduit ou tout du moins retarde la progression des lésions athérosclérotiques principalement en inhibant la migration des CMLV de la média vers l'intima (481). Dans des modèles de lésion artérielle aiguë par exemple, l'accumulation de CMLV dans l'intima est réduite par l'administration d'inhibiteurs de la voie des PDGF (anticorps neutralisant le PDGF (A et B), inhibiteurs de l'activité kinase des PDGFR ou anticorps neutralisant les PDGFR) (443). Chez les souris ApoE<sup>-/-</sup>, la surface des lésions athérosclérotiques ainsi que l'accumulation de CMLV sont inhibées par l'utilisation d'anticorps neutralisant le PDGFR $\beta$  (482). A l'inverse, l'administration de PDGF-BB stimule la prolifération des CMLV et conduit à un épaississement de l'intima dans certains modèles de lésions artérielles (483). Néanmoins, une équipe a réalisé des souris chimères ApoE<sup>-/-</sup> dont la moelle osseuse est reconstituée à l'aide de cellules déficientes ou non en PDGF-B. L'absence de production de PDGF-B par les monocytes/ M $\phi$  infiltrés conduit à diminution transitoire de la fréquence d'apparition de la couche sclérotique fibreuse avec un aspect moins avancé des lésions. Cependant, après 45 semaines, l'accumulation de CMLV dans la plaque fibreuse est similaire dans les deux types de souris (484). Ainsi, l'élimination de la production de PDGF-B par les cellules inflammatoires retarde la formation de la plaque fibreuse mais l'accumulation des CMLV dans les lésions avancées semble dépendre d'une autre source de PDGF-B par des cellules non-inflammatoires. Une autre hypothèse expliquant ces effets modérés est que le PDGF-B peut avoir des effets opposés dans l'athérosclérose en stimulant la prolifération des CMLV d'une part et en exerçant des effets anti-inflammatoires d'autre part (485).

#### *III.3.3.5.3. PDGF et fibroses*

Le développement de fibroses tissulaires chroniques peut se produire dans de nombreux organes (poumon, foie, cœur, peau, rein). La signalisation dépendante des PDGF est impliquée dans la formation de conditions pro-fibrosantes en stimulant la prolifération des fibroblastes et en favorisant

leur transdifférenciation vers un phénotype myofibroblastique. Le développement de fibrose tissulaire implique également un dépôt excessif de matrice extracellulaire qui peut en partie être attribué à une augmentation de l'activité des PDGF mais aussi du TGF $\beta$ . La combinaison d'une prolifération excessive de fibroblastes et d'un dépôt accru de MEC conduit à une cicatrisation incontrôlée des tissus et à une perte progressive de la fonction des organes touchés. Les cellules inflammatoires et essentiellement les M $\phi$  activés qui sécrètent du PDGF apparaissent comme les acteurs centraux communs à la plupart des pathologies fibrotiques. De plus, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par ces M $\phi$  activés stimule aussi l'expression des récepteurs au PDGF sur les cellules mésenchymateuses amplifiant ainsi la signalisation dépendante de ces ligands (453).

#### *III.3.3.5.3.1. PDGF et fibrose pulmonaire*

La fibrose pulmonaire est caractérisée par une prolifération des myofibroblastes au niveau des parois alvéolaires, des vaisseaux sanguins pulmonaires et des bronches. Elle peut survenir chez l'Homme suite à une exposition à différents types de toxiques environnementaux conduisant à des réponses inflammatoires aiguës ou chroniques dans le poumon. Il est également établi que des réactions fibrotiques sont associées à un remodelage tissulaire des voies aériennes dans des pathologies comme l'asthme, la bronchite chronique et la BPCO. Dans ces pathologies, les réponses cellulaires sont orchestrées par une variété de cytokines et de facteurs de croissance. La progression de la plupart sinon de la totalité des fibroses pulmonaires est associée à une augmentation des niveaux de PDGF et de leurs récepteurs dans le tissu pulmonaire et les lavages bronchoalvéolaires (443). Dans les pathologies humaines et dans les modèles *in vivo*, l'expression des ligands PDGF stimulent la prolifération et la migration des myofibroblastes ce qui contribue à la production de composés de la MEC (collagène, fibronectine et glycoaminoglycanes). L'expression de ces protéines dépend aussi de l'action du TGF $\beta$ . Le M $\phi$  alvéolaire a été identifié comme la source principale de PDGF et plus particulièrement de PDGF-B dans le développement de la fibrose pulmonaire (453, 486). Martinet et al. (1987) (487) ont montré que les monocytes humains exprimaient le gène encodant pour PDGF-B et que son expression était augmentée dans les M $\phi$  alvéolaires de patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique par rapport aux M $\phi$  de sujets sains. Une autre étude a mis en évidence une expression dix fois plus importante des ARNm de PDGF-B par rapport aux ARNm de PDGF-A dans les M $\phi$  alvéolaires humains normaux (486). Cette étude révèle également une sécrétion accrue de PDGF par les M $\phi$  de patients atteints de fibrose pulmonaire résultant d'une augmentation considérable des taux d'ARNm de PDGF-A et PDGF-B. Les auteurs soulignent aussi que PDGF-BB est la principale forme libérée par ces M $\phi$ . Une surexpression de PDGF est également impliquée dans le développement de pathologies associées à un dépôt de particules fibrogéniques dans le poumon comme l'asbestose, ou la pneumoconiose des mineurs de charbon (453). L'exposition de rats aux particules d'amiante induit

une augmentation de l'expression de PDGF-A et PDGF-B dans les M $\phi$  alvéolaires et les cellules épithéliales broncho-alvéolaires au niveau des sites de dépôt des fibres (488). L'isoforme PDGF-BB sécrétée principalement par les M $\phi$  a des capacités chimiotactiques plus importantes vis-à-vis des myofibroblastes pulmonaires que l'isoforme PDGF-AA (489). PDGF-A et PDGF-C dont l'expression a aussi été détectée dans d'autres types cellulaires au niveau des poumons fibrosés peuvent contribuer aux processus de fibrogénèse pulmonaire (443).

Les mécanismes qui activent la production des ligands PDGF dans les processus de fibrose sont mal connus. Cependant, des cytokines inflammatoires peuvent stimuler une telle expression. Ainsi, l'expression du PDGF-B est augmentée par l'IFN $\gamma$  dans les M $\phi$  humains (490). L'IL-1 $\beta$  peut aussi induire la production de PDGF *in vitro* et *in vivo* et stimuler la prolifération *in vitro* des fibroblastes et des cellules musculaires lisses (491). Une étude reporte également que l'IL-13 stimule la production de PDGF-AA *via* un mécanisme dépendant de STAT6 (492).

**Comme évoqué dans un précédent paragraphe, la surexpression ectopique de PDGF-B dans un modèle de souris transgénique abouti à un phénotype complexe comprenant à fois les aspects de l'emphysème et de la fibrose pulmonaire (470).**

En plus de l'augmentation de l'expression des ligands PDGF au cours de la formation de lésions pulmonaires, la surexpression des PDGFR joue aussi un rôle important dans la croissance hyperplasique des myofibroblastes pulmonaires. PDGFR $\alpha$  est fortement surexprimé dans les cellules mésenchymateuses pulmonaires en réponse à différents médiateurs inflammatoires comme l'IL-1 $\beta$  et le TGF $\beta$  tandis que PDGFR $\beta$  est constitutivement exprimé et généralement pas affecté par ces stimuli (453). **Dans des modèles animaux de fibrose pulmonaire induite par des métaux ou par l'amiante, l'expression protéique de PDGFR est augmentée et précède la répllication *in vivo* des myofibroblastes (453). De manière intéressante, cette augmentation de l'expression des PDGFR dans les myofibroblastes est également observée directement en réponse à des facteurs environnementaux toxiques, comme l'amiante, le LPS et la pollution particulaire urbaine (493, 494, 449). Ces résultats suggèrent que l'inhalation de polluants atmosphériques sensibiliserait les myofibroblastes aux ligands PDGF ce qui pourrait ainsi contribuer significativement au remodelage tissulaire des voies aériennes lors de bronchite, d'asthme ou de pathologies pulmonaires chroniques.**

Des études utilisant des inhibiteurs de la voie des PDGF viennent renforcer le rôle prépondérant de ces ligands dans la pathogénèse de la fibrose pulmonaire. Dans un modèle expérimental de lésions pulmonaires induites par des radiations où les 4 isoformes de PDGF sont augmentées, l'utilisation de différents inhibiteurs des PDGFR a permis de réduire la fibrose pulmonaire dans tous les cas et d'augmenter l'espérance de vie des animaux (495). Dans une autre étude portant sur un modèle murin de fibrose induite par les métaux, les auteurs observent une

réduction de la prolifération des cellules mésenchymateuses et l'accumulation de collagène grâce à l'utilisation d'un inhibiteur sélectif de l'activité tyrosine kinase du PDGFR, l'AG1296 (496).

#### *III.3.3.5.3.2. PDGF et fibrose hépatique*

La fibrose hépatique et son étape ultime la cirrhose ont de nombreuses causes (alcool, médicaments, infections, désordre métabolique). Les cellules étoilées hépatiques sont les péricytes des vaisseaux sinusoidaux. Leur prolifération et leur capacité de synthèse des composants de la MEC sont responsables du développement de la fibrose hépatique. A l'état quiescent, les cellules étoilées n'expriment pas le PDGFR $\beta$ , cependant son expression est induite lors de l'activation de ces cellules en réponse au TGF $\beta$  (453). Cette augmentation de l'expression du PDGFR $\beta$  sensibilise les cellules étoilées aux PDGF sécrétés par les cellules de Kupffer et les M $\phi$  recrutés ce qui contribue à la prolifération de ces cellules étoilées et au processus de fibrogénèse (443).

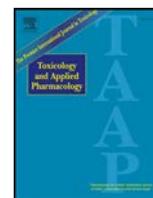
#### *III.3.3.5.3.3. PDGF et fibrose cardiaque*

La fibrose cardiaque peut se développer à la suite d'infarctus du myocarde, d'hypertension, de rejet de greffe, ou de troubles endocriniens. Celle-ci survient en réponse à une prolifération des fibroblastes cardiaques interstitiels associée à un dépôt excessif de collagène. L'inhibition chimique du PDGFR $\alpha$  ou l'utilisation de modèle transgénique déficient en PDGFR $\alpha$  diminue le dépôt de collagène et suggèrent un rôle de ce récepteur dans l'activation des fibroblastes cardiaques (497). Ainsi, l'expression des PDGF dans les cellules myocardiques favorise la prolifération des fibroblastes cardiaques exprimant le PDGFR $\alpha$  ainsi que le dépôt de collagène conduisant au développement d'une fibrose cardiaque sévère (443).

#### *III.3.3.5.3.4. PDGF et autres pathologies fibrosantes*

Le signal PDGF est également impliqué dans la formation de lésions fibrosantes survenant dans la sclérodermie (ou sclérose systémique) et dans la fibrose rénale. La sclérodermie est une maladie auto-immune caractérisée initialement par une fibrose dermique et vasculaire qui peut atteindre d'autres organes. Dans cette pathologie, l'expression des PDGF et de PDGFR $\alpha$  est induite sous l'effet de l'IL-1 $\beta$  et du TGF $\beta$ . Le PDGF-B libéré par les M $\phi$  activés favorise alors la prolifération des myofibroblastes dermiques (443). L'existence d'auto-anticorps activant les récepteurs aux PDGF ont aussi été décrits chez les patients atteints de sclérodermie (498).

Dans de nombreuses pathologies rénales, la libération de PDGF-B par les M $\phi$  infiltrés et de PDGF-D par les cellules mésangiales peut entraîner une prolifération de ces cellules mésangiales exprimant le PDGFR $\beta$  ainsi qu'un dépôt accru de matrice, conduisant à une glomérulosclérose (453, 443).



# AhR-dependent secretion of PDGF-BB by human classically activated macrophages exposed to DEP extracts stimulates lung fibroblast proliferation <sup>☆</sup>



Marie Jaguin <sup>a</sup>, Olivier Fardel <sup>a,b</sup>, Valérie Lecureur <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> UMR INSERM U1085, Institut de Recherche sur la Santé, l'Environnement et le Travail (IRSET), Université de Rennes 1, 2 Avenue du Pr Léon Bernard, 35043 Rennes Cedex, France

<sup>b</sup> Pôle Biologie, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Rennes, 2 rue Henri Le Guilloux, 35033 Rennes Cedex, France

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 4 December 2014

Revised 3 April 2015

Accepted 7 April 2015

Available online 17 April 2015

### Keywords:

Platelet Derived Growth Factor-beta (PDGF-B)

Aryl hydrocarbon receptor

Diesel exhaust particles

Macrophage polarization

Lung fibroblasts

## ABSTRACT

Lung diseases are aggravated by exposure to diesel exhaust particles (DEPs) found in air pollution. Macrophages are thought to play a crucial role in lung immune response to these pollutants, even if the mechanisms involved remain incompletely characterized. In the present study, we demonstrated that classically and alternative human macrophages (M $\Phi$ ) exhibited increased secretion of PDGF-B in response to DEP extract (DEPe). This occurred via aryl hydrocarbon receptor (AhR)-activation because DEPe-induced PDGF-B overexpression was abrogated after AhR expression knock-down by RNA interference, in both M1 and M2 polarizing M $\Phi$ . In addition, TCDD and benzo(a)pyrene, two potent AhR ligands, also significantly increased mRNA expression of PDGF-B in M1 M $\Phi$ , whereas some weak ligands of AhR did not. We next evaluated the impact of conditioned media (CM) from M $\Phi$  culture exposed to DEPe or of recombinant PDGF-B onto lung fibroblast proliferation. The tyrosine kinase inhibitor, AG-1295, prevents phosphorylations of PDGF-R $\beta$ , AKT and ERK1/2 and the proliferation of MRC-5 fibroblasts induced by recombinant PDGF-B and by CM from M1 polarizing M $\Phi$ , strongly suggesting that the PDGF-BB secreted by DEPe-exposed M $\Phi$  is sufficient to activate the PDGF-R $\beta$  pathway of human lung fibroblasts. In conclusion, we demonstrated that human M $\Phi$ , whatever their polarization status, secrete PDGF-B in response to DEPe and that PDGF-B is a target gene of AhR. Therefore, induction of PDGF-B by DEP may participate in the deleterious effects towards human health triggered by such environmental urban contaminants.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

## Introduction

Diesel exhaust particles (DEPs) are major components of air pollution around the world. They are composed of a carbon core to which vast amounts of chemical compounds such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are adsorbed, knowing that PAHs could be desorbed and dissolved after DEP deposition in the lung. Epidemiological studies have shown a consistent association between increased DEP exposure and adverse human health effects. DEPs are notably thought to favor and aggravate cardiovascular and pulmonary diseases as well as lung cancer mortality (Pope et al., 2002; Takano et al., 1997). It has been

suggested that these DEP-related toxic biological effects are linked, at least in part, to activation of the cytosolic Ah receptor (AhR). Indeed, DEP-contained PAHs are thought to bind to cytoplasmic AhR, thereby triggering its translocation into the cell nucleus and its association with its partner coactivator; this complex then binds to their recognition DNA sequence, termed the xenobiotic responsive element, leading to the gene expression of responsive genes such as drug-metabolizing enzymes like cytochrome P450 1B1 (Hankinson, 2005; Srivastava et al., 2012).

With respect to the cell types targeted by DEPs, macrophages (M $\Phi$ ), peripheral blood mononuclear cells or epithelial and endothelial cells constitute the major ones. In this context, studies in our laboratory have shown that blood monocyte-derived macrophages represent a well-established model for investigating PAH-induced toxicological process (Lecureur et al., 2005; N'Diaye et al., 2006; Podechard et al., 2009; Pinel-Marie et al., 2009), knowing that M $\Phi$  are involved in the development of diseases associated with DEP exposure (Campen et al., 2010; Becker et al., 2005). Interestingly, M $\Phi$  heterogeneity and detrimental roles in diseases are now well-recognized to depend on activation status. These activation states are sub-classified as classically activated M1 M $\Phi$  or alternatively activated M2 M $\Phi$ . The M1 M $\Phi$  subtype is induced by a combination of mediators, such as IFN- $\gamma$  in

*Abbreviations:* AhR, aryl hydrocarbon receptor; CM, conditioned media; DEPe, Diesel exhaust Particles extract; FCS, fetal calf serum; IPF, idiopathic pulmonary fibrosis; M-CSF, macrophage colony-stimulating factor; M $\Phi$ , macrophage; PDGF-B, Platelet Derived Growth Factor-beta; PDGF-BB, homodimer Platelet Derived Growth Factor-beta protein; PDGF-R $\beta$ , Platelet Derived Growth Factor-receptor beta; PAHs, polycyclic aromatic hydrocarbons.

<sup>☆</sup> Author contributions: Conceived and designed the experiments: MJ and VL. Performed the experiments and analyzed the data: MJ and VL. Wrote the manuscript: MJ, VL and OF.

\* Corresponding author. Fax: +33 2 23 23 47 94.

E-mail address: [valerie.lecureur@univ-rennes1.fr](mailto:valerie.lecureur@univ-rennes1.fr) (V. Lecureur).

the presence or not of LPS, resulting in a pro-inflammatory and microbicidal phenotype. In contrast, M2 M $\Phi$  are usually activated by T-helper (Th2) cytokines such as Interleukin (IL)-4 (IL-4) and IL-13, and exert functional roles in the resolution of inflammation and tissue remodeling (Mosser and Edwards, 2008; Gordon, 2003). The molecular nature of DEP-induced alteration of M $\Phi$ , that potentially contributes to their deleterious health effects, remains incompletely characterized.

In this context, a role of urban pollution in developing lung fibrosis has been suspected. So, urban particulate matter and residual oil fly ash have been shown to favor the growth of mesenchymal cells by up-regulation of Platelet Derived Growth Factor (PDGF)-receptor  $\alpha$  expression via cytokines secreted by M $\Phi$  (Bonner et al., 1998; Lindroos et al., 1997). In addition, PDGF-B, a ubiquitous and potent mitogen factor for many cells of mesenchymal origin, including myofibroblasts and smooth muscle cells (Andrae et al., 2008; Noskovičová et al., 2015), was produced by alveolar M $\Phi$  and bronchial epithelial cells of rat exposed to DEP (Yamashita et al., 2001). However, neither the effects of DEP on PDGF or PDGF receptor expression in human M $\Phi$ , and, in particular in polarized M $\Phi$ , nor of the molecular pathway implicated have been studied.

To address this issue, we have analyzed the effects of DEP extracts (DEPe) in human M $\Phi$  polarizing into the M1 and M2 subtypes on PDGF-B expression and have determined the role of AhR in its regulation. Our data showed that DEPe increases the mRNA and secretion levels of PDGF-B into both types of human polarizing M $\Phi$  via the AhR pathway activation and that such PDGF-B secretion is sufficient to favor lung fibroblast proliferation, thus supporting that air pollutants may favor lung fibrosis.

## Materials and methods

**Chemicals and reagents.** Human recombinant IL-4, IFN- $\gamma$  and PDGF-BB (homodimer protein) were purchased from Peprotech (Neuilly sur Seine, France), whereas human recombinant M-CSF was obtained from Miltenyi Biotec SAS (Paris, France). Benzo(a)pyrene (B(a)P), benzo(e)pyrene (B(e)P), 1-nitropyrene (1-NP), dimethylsulfoxide (DMSO), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT), actinomycin D (ACTD), cycloheximide (CHX) and lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* (serotype: 055:B5) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). The selective PDGF receptor kinase tyrosinase AG-1295 was purchased from Calbiochem (La Jolla, CA), whereas 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) was obtained from Cambridge Isotope Laboratories (Cambridge, MA). DEPe (standard reference material 1975, corresponding to a dichloromethane-extract of filter-collected combustion of particle matter from operating a forklift with a diesel engine), were used at least in part for their good characterization in terms of PAH concentrations and were procured by the National Institute of Standards and Technology (NIST) (Gaithersburg, MD, USA). The dichloromethane solvent was evaporated and the residue was dissolved in DMSO for cell exposure. The final concentration of solvent DMSO did not exceed 0.2% (v/v); the control cultures received the same dose of solvent as for their treated counterparts.

**Cell culture.** Monocytes were purified from peripheral blood mononuclear cells obtained from blood buffy coats (provided by Etablissement Français du Sang, Rennes, France), as previously described (van Grevenynghe et al., 2003). Monocytes were then differentiated in M $\Phi$  by M-CSF (50 ng/ml) for 6 days in RPMI 1640 medium (Gibco) supplemented with 2 mM glutamine, 10% deplete fetal calf serum (FCS), 100 IU/ml penicillin and 100  $\mu$ g/ml streptomycin. To study chemical effects during M $\Phi$  polarization, M $\Phi$  were next exposed to a fresh medium supplemented with 5% FCS and containing IFN- $\gamma$  (20 ng/ml) or M-CSF (10 ng/ml) + IL-4 (20 ng/ml) in the absence or presence of an indicated concentration of DEPe or different compounds for an additional 24 h to obtain M1 M $\Phi$  and M2 M $\Phi$ , respectively (Martinez et al., 2006). The experiments were done in accordance with the World

Medical Association Declaration of Helsinki (World Medical Association, 2013). The MRC-5 cell line was derived from a normal fetal lung tissue and was cultured in a MEM–glutamax medium (Gibco) containing 10% FCS, 20 IU/ml penicillin and 20  $\mu$ g/ml streptomycin, 1 nM sodium pyruvate and 75  $\mu$ g/ml sodium bicarbonate. Cells were incubated at 37 °C, under 95% humidity and in the presence of 5% CO<sub>2</sub>.

**MRC-5 cell proliferation assay.** The studies of the effects of recombinant PDGF-BB or of conditioned media from human M $\Phi$  cultures on MRC-5 cell proliferation were assessed using the Malassez counting slide. Briefly, MRC-5 were seeded in 24-well plates at  $2.2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> and then incubated in complete medium containing 10% FCS. 24 h after seeding, MRC-5 cells were exposed to indicated concentrations of rPDGF-BB or DEPe-exposed M1 or M2 M $\Phi$ -conditioned media (CM) in the presence or not of 5  $\mu$ M AG-1295 for an additional 72 h. Cells were harvested and subsequently counted on the Malassez counting slide. Cell proliferation was also evaluated using a MTT assay as previously described (Fardel et al., 1997). Data were expressed as percentage of cells maintained in a culture medium without FCS, considered as weakly proliferative cells.

**Transfection of siRNAs.** siRNA oligonucleotide sequences directed against human AhR (si AhR) (reference J-004990-05) and a not targeted sequence (si CT), used as control, were purchased from Dharmacon (Lafayette, CO, USA). Human M $\Phi$  ( $1 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>) were transfected using Lipofectamine -RNAiMAX (Invitrogen). Following 40 h of exposure to 40 nM si AhR, the macrophages were then treated by DEPe, for 8 h or 24 h during M1 or M2 polarization for RNA and protein expression analyses, respectively. Silencing efficiency of the targeted sequence was next confirmed by RT-qPCR and western blot analysis.

**Quantification of cytokine levels.** The levels of the homodimer PDGF-BB were quantified by the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) from supernatants of M $\Phi$  culture using a specific human DuoSet ELISA Kit according to the instructions of the manufacturer (R&D Systems) and by using an automatic plate reader associated with genesis software (LabSystems Spectrophotometer, Cambridge, UK.)

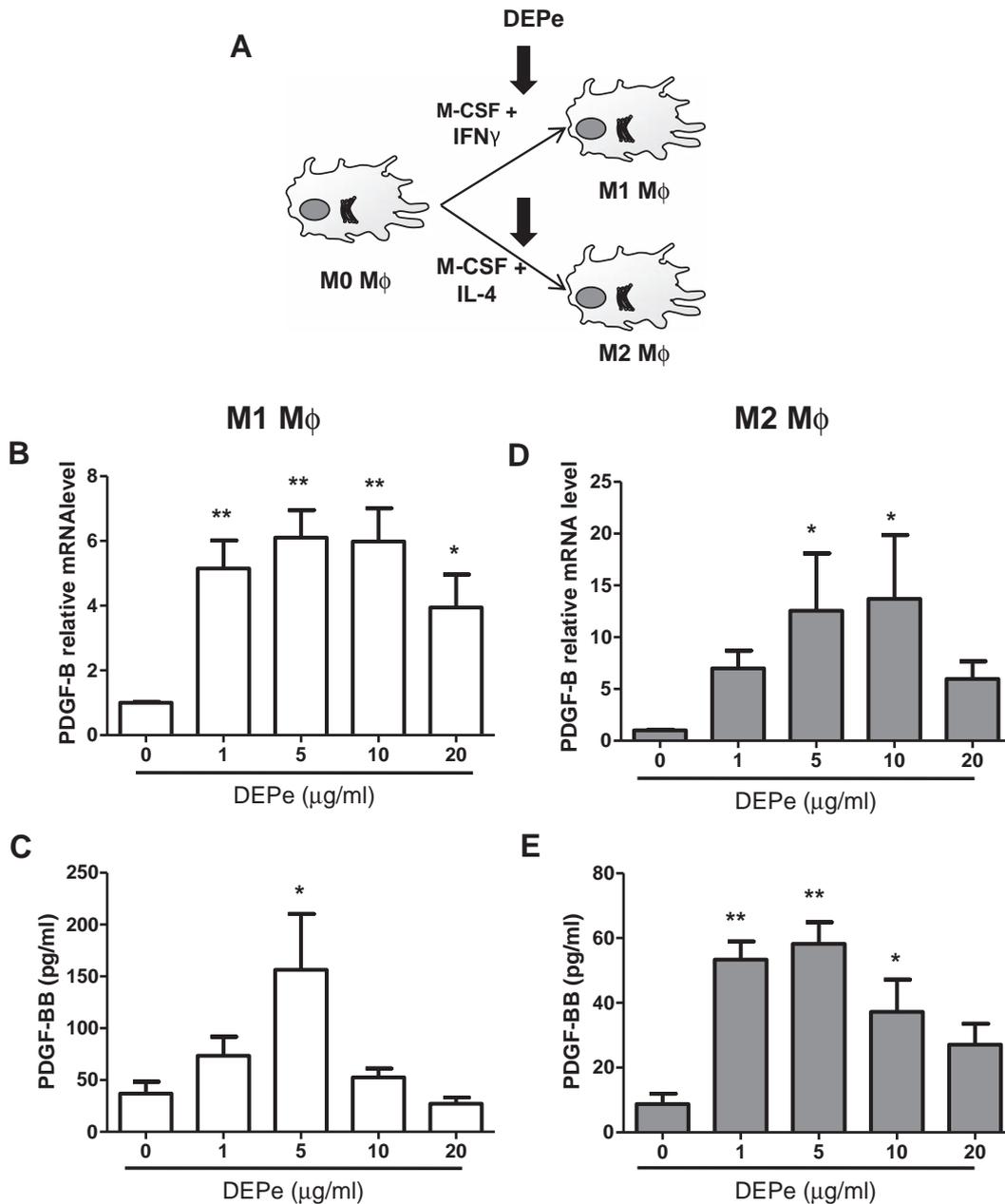
**RNA isolation and reverse transcription- quantitative PCR analysis.** Total RNA were isolated from primary M $\Phi$  using the TRIzol method (Invitrogen) and were then subjected to reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) analysis as previously described (Podechard et al., 2008). Gene-specific primers, purchased from Sigma-Aldrich, are intron-spanning and are presented in Table 1. The amplification curves of the PCR products were analyzed with the ABI Prism SDS software using the comparative cycle threshold method. Relative quantification of the steady-state target mRNA levels was calculated after normalization of the total amount of cDNA tested to an 18S RNA endogenous reference.

**Western blot analysis.** Cells were harvested and lysed on ice with a lysis buffer as previously described (Lecœur et al., 2005). Then, lysates were sonicated on ice and protein concentration was quantified using Bradford's method. Samples were analyzed by 10% SDS-PAGE, and then electroblotted overnight onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad). After blocking, membranes were hybridized with primary Abs anti-PDGF-R $\beta$ , anti-phospho PDGF-R $\beta$ , anti-AKT, anti-phospho AKT, anti-ERK1/2 and anti-phospho ERK1/2 (Cell Signaling Technology) overnight at 4 °C and incubated with appropriate HRP-conjugated secondary Abs. Immunolabeled proteins were visualized by autoradiography using chemiluminescence.

**Statistical analysis.** Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Significant differences were evaluated using Student's t-test or ANOVA followed

**Table 1**  
Primer sequence list.

Gene	Name	Forward primer	Reverse primer
18S	ARN 18S	5'-CGCCGCTAGAGGTGAAATTC-3'	5'-TTGGCAAATGCTTTTCGCTC-3'
CCL18	CC chemokine type 18	5'-TACCTCTGGCAGATCCAC-3'	5'-CCCACCTCTTATTGGGTCA-3'
CXCL10	CXC chemokine type 10	5'-CCACGTGTGAGATCAITGGC-3'	5'-TTCTTGATGGCCTTCGATTC-3'
CXCL11	CXC chemokine type 11	5'-CCTGGGGTAAAAGCAGTAA-3'	5'-TGGGATTAGGCATCGTTGT-3'
CYP1B1	Cytochrome P450 1B1	5'TGATGGACGCCTTATCCTC-3'	5'-CCACGACCTGATCCAATTCT-3'
IL-10	Interleukin-10	5'-CCTGGAGGAGGTGATGCCCA-3'	5'-CCTGTCCACGGCCTTGCTC-3'
PDGF-B	Platelet-derived growth factor-B	5'-GTGGTATCTAGCCATCCT-3'	5'-CCTTCATCGGATCTCGTAA-3'
PPAR $\gamma$	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	5'-TTCAGAAATGCCITGCAGTG-3'	5'-CCAACAGCTTCTCTCTCG-3'
TNF $\alpha$	Tumor necrosis factor alpha	5'-AACCTCTCTGCGCATC-3'	5'-ATGTCCTCTCTCACA-3'



**Fig. 1.** Effect of DEPe on PDGF-B expression and secretion during polarization of human M $\Phi$  in the M1 and M2 subtypes. (A) Six-day cultured M-CSF human primary unactivated M $\Phi$  (M0) were activated with IFN- $\gamma$  or with IL-4 to obtain classically activated M $\Phi$  (M1) or alternative activated M $\Phi$  (M2), respectively, in the presence of the indicated doses of DEPe ( $\mu$ g/ml) for 24 h. (B and D) PDGF-B mRNA level was estimated by RT-qPCR; data were expressed relative to mRNA levels found in DMSO cells, arbitrarily set at a value of 1 unit and are the mean  $\pm$  SEM of 4 independent experiments. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  when compared to their respective untreated cells. (C, E) PDGF-BB secretion levels in DEPe-exposed M1- or M2 M $\Phi$ -conditioned media were determined by ELISA; data expressed in pg/ml are the mean  $\pm$  SEM of 4 independent experiments. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  when compared to their respective untreated cells (ANOVA followed by Dunnett's post-hoc test).

by the multi-range Newman–Keuls or Dunnett's test when multiple comparisons were studied.

## Results

### DEPe treatment can induce PDGF-B expression in human M $\Phi$

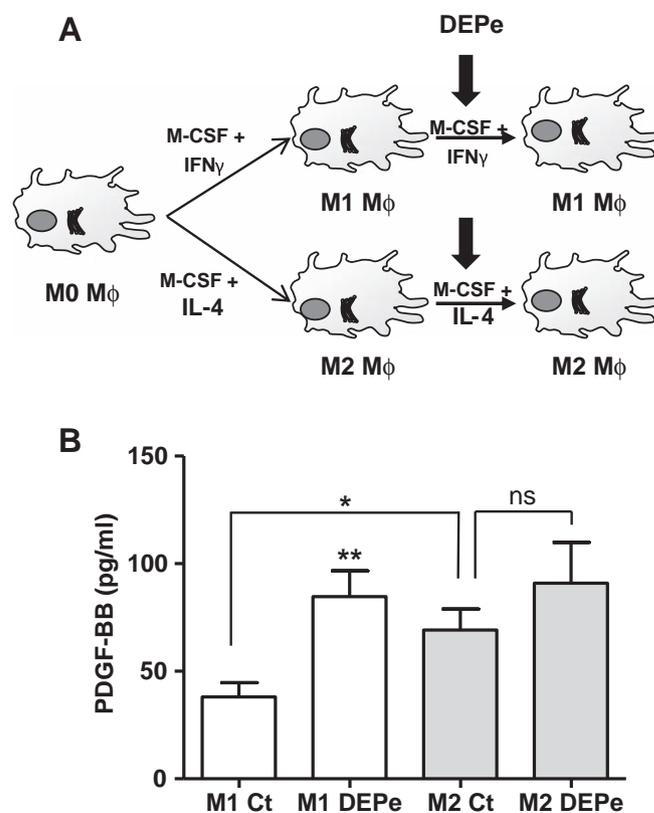
Firstly, the validation of M $\Phi$  polarization efficiency was confirmed by a significantly higher mRNA expression of CXCL10, CXCL11 and TNF $\alpha$  in M1 polarized M $\Phi$  when compared to M2 M $\Phi$  (Fig. S1A) and a significantly higher mRNA expression of PPAR $\gamma$ , CCL18 and IL-10 in M2 polarized M $\Phi$  when compared to M1 M $\Phi$  (Fig. S1B), in accordance with our previous studies (Jaguin et al., 2013, 2015).

Secondly, PDGF-B gene expression was investigated in primary human M $\Phi$  exposed to various DEPe concentrations (from 1 to 10  $\mu$ g/ml) during their polarization into the M1 or M2 subtypes for 24 h (Fig. 1). Such a range of concentrations was not found toxic after microscopic examination of cells and viability assays (data not shown). PDGF-B mRNA up-regulation was significantly detected after exposure to 1  $\mu$ g/ml and 5  $\mu$ g/ml DEPe in the M1 and M2 subtypes, respectively, and reached a maximum in response to 5–10  $\mu$ g/ml DEPe for both subtypes (Figs. 1B and D). DEPe treatment at a higher 20  $\mu$ g/ml concentration significantly still increases PDGF-B mRNA expression in M1 M $\Phi$  but not in M2 M $\Phi$  (Figs. 1B and D). The secretion of the homodimer PDGF-BB in the supernatants of the M1 subtype was enhanced by 5  $\mu$ g/ml of DEPe, a concentration corresponding to the maximum level of secretion (Fig. 1C). Homodimer PDGF-BB secretion in DEPe-exposed M2 M $\Phi$  was also significantly increased when compared to untreated M $\Phi$ , starting from 1  $\mu$ g/ml of DEPe and reaching a maximum at 1–5  $\mu$ g/ml (Fig. 1E). The secretion levels of PDGF-BB after a 5  $\mu$ g/ml exposure of DEPe were found to be slightly higher in M1 M $\Phi$  (156.4  $\pm$  53.9 pg/ml) than those in M2 M $\Phi$  (58.2  $\pm$  6.7 pg/ml) but not statistically different (Figs. 1C and E). For the following experiments, we have retained a concentration of 5  $\mu$ g/ml DEPe to study its effects on PDGF-B expression during the polarization of M $\Phi$ .

Finally, we determined if PDGF-BB protein expression was also regulated by DEPe exposure in already human polarized M $\Phi$  (Fig. 2A). We showed that PDGF-BB secretion is significantly increased by DEPe in polarized M1 M $\Phi$  but not in polarized M2 M $\Phi$  (Fig. 2B). We also observed that PDGF-BB levels in untreated cells were higher in M2 than those in M1 polarized M $\Phi$ , supporting the pro-fibrotic phenotype of the M2 M $\Phi$ .

### AhR involvement in DEPe-induced PDGF-B expression

Insofar as DEPe constitutes a mixture of several organic compounds such as PAHs, which are known to act as potent ligands of AhR (Nebert et al., 2004), and knowing that primary human M $\Phi$  expressed AhR (van Grevenynghe et al., 2003), the involvement of this transcription factor in DEPe-mediated induction of PDGF-B mRNA was investigated during M $\Phi$  polarization. To first determine whether DEPe-mediated up-regulation of PDGF-B gene expression is dependent of a direct transcription mechanism as classically reported for AhR target genes (Nebert et al., 2004), we analyzed the effect of the transcription inhibitor actinomycin D (ACT D) on TCDD- (a prototypical AhR ligand) and on DEPe-regulation of PDGF-B mRNA expression by RT-qPCR. ACT D fully suppressed the PDGF-B mRNA increase occurring in DEPe or TCDD-exposed M1 M $\Phi$  (Fig. 3A). Since AhR-mediated genomic responses are thought to be independent of *de novo* protein synthesis (Sinal and Bend, 1997), we then investigated the effects of the translational inhibitor CHX on DEPe mediated up-regulation of PDGF-B mRNA. CHX did not modify the DEPe- and TCDD-induced PDGF-B mRNA levels (Fig. 3B), indicating that PDGF-B mRNA up-regulation by these chemicals does not require *de novo* protein synthesis.



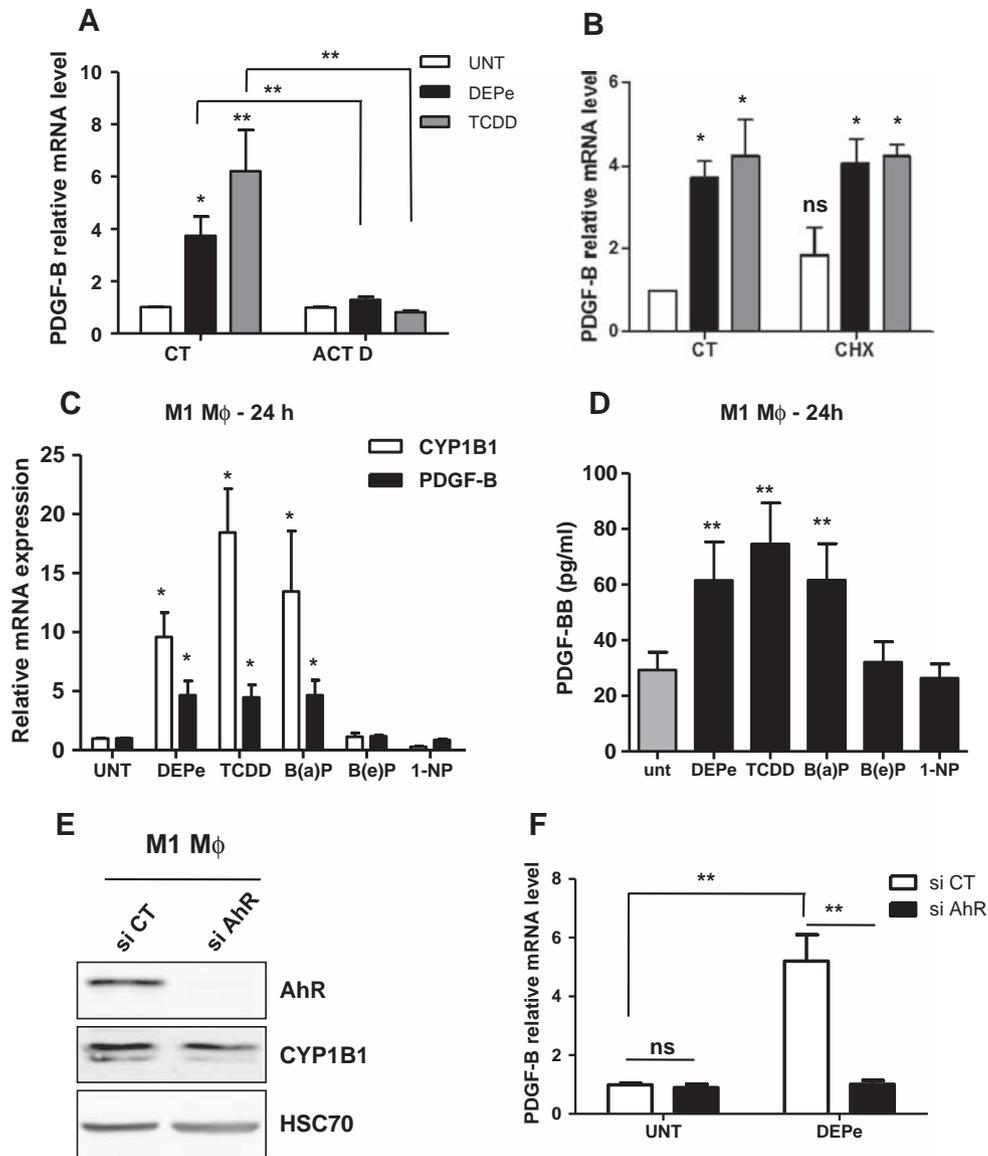
**Fig. 2.** Effect of DEPe on PDGF-BB secretion from human M $\Phi$  already polarized in the M1 and M2 subtypes. (A) Six-day cultured M-CSF human primary unactivated M $\Phi$  (M0) were activated with IFN- $\gamma$  or with IL-4 to obtain classically activated M $\Phi$  (M1) or alternative activated M $\Phi$  (M2), respectively. These M $\Phi$  were then exposed to 5  $\mu$ g/ml DEPe for an additional 24 h. (B) PDGF-BB secretion levels in DEPe-exposed M1 or M2 M $\Phi$  conditioned media were determined by ELISA; data expressed in pg/ml are the mean  $\pm$  SEM of 8 independent experiments. \**p* < 0.05 and \*\**p* < 0.01 when compared to their respective untreated cells (ANOVA followed by Dunnett's post-hoc test).

To determine whether AhR may be implicated in DEPe-mediated up-regulation of PDGF-B mRNA, we first analyzed the effects of several AhR ligands with different affinities for the AhR; in parallel, the mRNA expression of CYP1B1 was used as a positive control of AhR activation. As shown in Fig. 3C, potent AhR agonists such as TCDD and B(a)P significantly increased PDGF-B and CYP1B1 mRNA expression in a manner similar to that of DEPe; they concomitantly significantly enhanced PDGF-BB secretion (Fig. 3D). By contrast, B(e)P and 1-NP, known to poorly activate AhR, failed to induce PDGF-B and CYP1B1 mRNA expression (Fig. 3C) and homodimer PDGF-BB secretion (Fig. 3D).

To further investigate the role of AhR, we next knocked-down its expression using specific AhR targeting siRNA (si AhR). Western blot analysis indicated a strong down-regulation of AhR and a concomitant decrease of CYP1B1 expression in si AhR-transfected M1 M $\Phi$  by comparison to untargeted siRNA (si CT)-transfected counterparts whereas, by contrast, HSC70 expression, used here as a loading control, was not affected (Fig. 3E). In parallel, DEPe-mediated PDGF-B mRNA up-regulation found in si CT-transfected M1 M $\Phi$  was fully abolished in si AhR-transfected M1 M $\Phi$  (Fig. 3F); such effects were also found in si AhR-transfected M2 M $\Phi$  both after DEPe and TCDD exposure (Fig. 4). Altogether, these data demonstrated that DEPe-induced PDGF-B expression is at least in part under AhR control in M1 and M2 human M $\Phi$ .

### DEPe-induced PDGF-BB secretion enhances the proliferation of the MRC-5 lung fibroblasts

Members of the PDGF family such as PDGF-BB are potent mitogen for cells of mesenchymal origin, including pulmonary myofibroblasts

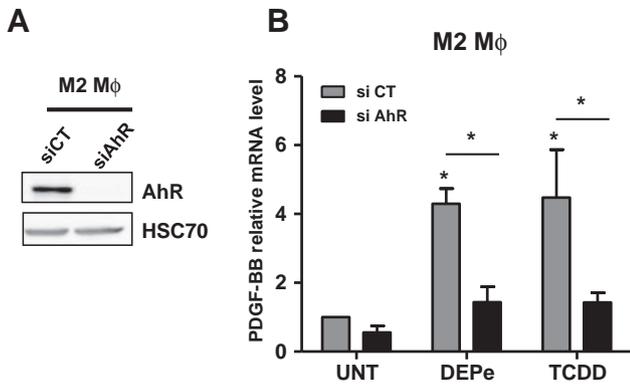


**Fig. 3.** AhR involvement in DEPe-induced PDGF-B up-regulation in human M1 M $\Phi$ . (A and B) Six-day cultured M-CSF M $\Phi$  were pre-exposed for 1 h with 5  $\mu$ g/ml ACT D (A) or CHX (B) and then activated with IFN $\gamma$  to obtain M1 M $\Phi$  in the presence of 5  $\mu$ g/ml DEPe or 10 nM TCDD for 6 h. (A) Data are the mean  $\pm$  SEM of at least 3 independent experiments; \* $p$  < 0.05 and \*\* $p$  < 0.01 (ANOVA followed by the Newman–Keuls post-hoc test). (B) \* $p$  < 0.05 when compared to their respective untreated cells (ANOVA followed by Dunnett’s post-hoc test). (C and D) M1 M $\Phi$  were exposed to 5  $\mu$ g/ml DEPe or several aryl hydrocarbons (2  $\mu$ M B(a)P, 2  $\mu$ M B(e)P, 2  $\mu$ M 1-NP or 10 nM TCDD) for 24 h. (C) CYP1B1 and PDGF-B mRNA levels were estimated by RT-qPCR; data were expressed relative to mRNA levels found in the untreated cells (UNT), arbitrarily set at a value of 1 and are the mean  $\pm$  SEM of at least 4 independent experiments; \* $p$  < 0.05 when compared to their respective untreated cells (ANOVA followed by Dunnett’s post-hoc test). (D) PDGF-BB secretion levels, expressed in pg/ml, were measured in supernatants of M1 M $\Phi$  and are the mean  $\pm$  SEM of 6 independent experiments; \*\* $p$  < 0.01 when compared to their respective untreated cells (ANOVA followed by Dunnett’s post-hoc test). (E and F) M $\Phi$  were transfected with si AhR or si CT and cultured for 40 h; they were then activated with IFN $\gamma$  to obtain M1 M $\Phi$  in the presence of 5  $\mu$ g/ml DEPe or DMSO (UNT) for an additional 6 h. (E) western blot analysis of AhR and CYP1B1 protein expressions were performed with whole-cell lysates. Equal gel loading and transfer efficiency were checked by protein hybridization with HSC70. Experiments were repeated, three times, with similar results. (F) PDGF-B mRNA expression in M1 M $\Phi$  was determined by RT-PCR and data are the mean  $\pm$  SEM of 4 independent experiments; \*\* $p$  < 0.01 and ns: not significant (ANOVA followed by the Newman–Keuls post-hoc test).

(Andrae et al., 2008). This property led us to examine whether the levels of PDGF-BB secreted by DEPe-exposed M $\Phi$  during their polarization were sufficient to stimulate *in vitro* proliferation of MRC-5 lung fibroblasts. First, we showed that 30 ng/ml rPDGF-BB increases the phosphorylation of ERK1/2, p38 and AKT<sup>(ser473)</sup>, three down-stream targets of the PDGF-R $\beta$  pathway (Fig. S2), from a 30 min-exposure. The rPDGF-BB-increased phosphorylations of PDGF-R $\beta$ <sup>(Tyr451)</sup>, ERK1/2 and AKT<sup>(ser473)</sup> were found to be repressed in the presence of AG-1295, a PDGF-R kinase inhibitor (Fig. 5A). Moreover, we demonstrated that the proliferative effects of rPDGF-BB on MRC-5 cells, determined by cell counting and by using the MTT proliferative assay (Fig. 5B), were fully abolished in the presence of the non-toxic concentration of 5  $\mu$ M

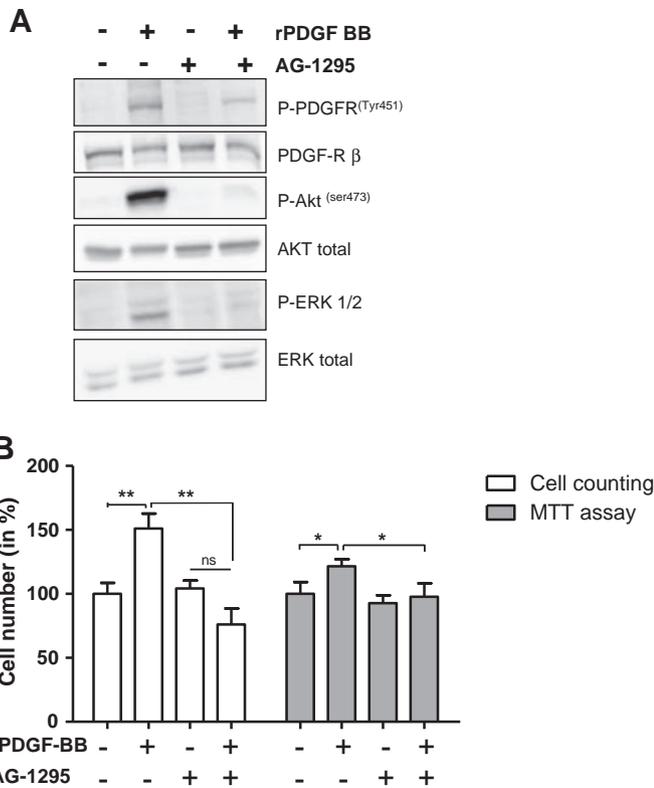
AG-1295. Altogether, these data demonstrate that the PDGF-R $\beta$  pathway is fully functional in the human lung fibroblast MRC-5 cells.

Therefore, we tested the effects of the CM from M1 or M2 M $\Phi$  exposed or not to 5  $\mu$ g/ml of DEPe on lung fibroblast proliferation by using the MTT assay (Fig. 6A). CM from M1 M $\Phi$  exposed to DEPe significantly increased the proliferation of MRC-5 cells and that such an effect was abolished in the presence of AG-1295. By contrast, the fibroblast proliferation was almost similar between CM from untreated and DEP-treated M2 M $\Phi$ , and the presence of AG-1295 had no inhibitory effect on MRC-5 proliferation (Fig. 6A). We also showed that fibroblast proliferation was significantly higher in the presence of CM obtained from the untreated M2 M $\Phi$  culture than those obtained from the

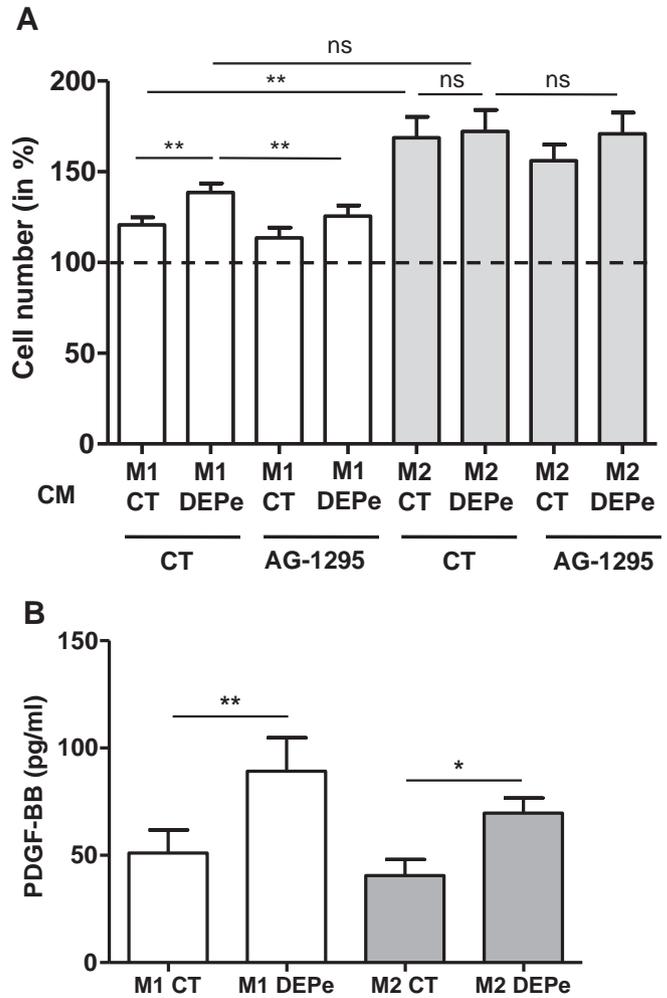


**Fig. 4.** AhR involvement in DEPe-induced PDGF-B up-regulation in human M2 MΦ. Six-day cultured macrophages were transfected with si AhR or with non-targeting siRNAs (si CT) and cultured for 40 h; they were then activated with IL-4 to obtain M2 MΦ in the presence of 5 μg/ml DEPe, 10 nM TCDD or DMSO (UNT) for an additional 24 h. (A) western blot analysis of AhR and CYP1B1 protein expressions were performed with whole-cell lysates. Equal gel loading and transfer efficiency were checked by protein hybridization with HSC70. Experiments were repeated, three times, with similar results. (B) PDGF-B mRNA expression in M2 MΦ were determined by RT-PCR and data are the mean ± SEM of 3 independent experiments; \*p < 0.05 (ANOVA followed by the Newman-Keuls post-hoc test).

untreated M1 MΦ culture, whereas the basal PDGF-BB secretion levels, measured in the CM used for proliferation assay, were almost similar (Fig. 6B), supporting the pro-fibrotic phenotype of the M2 MΦ. So, the



**Fig. 5.** Impact of rPDGF-BB and the antagonist of PDGF-R on human lung fibroblast cell MRC-5 proliferation. MRC5 cells were pretreated or not for 1 h with 10 μM of AG-1295, an antagonist of PDGF-R, and then treated or not with 30 ng/ml rPDGF-BB for an additional 30 min. (A) Protein and phospho-protein expressions were analyzed by western-blot, performed with whole-cell lysates. Equal gel loading and transfer efficiency were checked by total protein hybridization of respective phospho-protein. Experiments were repeated, three times, with similar results. (B) MRC-5 cell proliferation was evaluated by cell counting and the MTT assay. Data are the mean ± SEM of at least 5 independent experiments; \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 and ns: not significant (ANOVA followed by the Newman-Keuls post-hoc test).



**Fig. 6.** Impact of MΦ-derived CM on human lung fibroblast cell MRC-5 proliferation. Six-day cultured M-CSF MΦ were activated with IFN-γ or with IL-4 to obtain M1 and M2 MΦ, respectively, in the presence or absence of DEPe (5 μg/ml) for 24 h. (A) MRC-5 cells were cultured with CM of DEPe-exposed M1 or M2 MΦ or with the culture medium without FCS (100%) for 72 h. MRC-5 cell proliferation was evaluated by the MTT assay. Data are the mean ± SEM of 10 independent experiments; \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 and ns: not significant (paired-t-test). (B) PDGF-BB secretion levels, expressed in pg/ml, were measured in supernatants of M1 and M2 MΦ exposed or not to 5 μg/ml of DEPe and are the mean ± SEM of 10 independent experiments; \*p < 0.05, and \*\*p < 0.01 (ANOVA followed by the Newman-Keuls post-hoc test).

proliferations of MRC-5 cells exposed to CM from DEPe-exposed M1 MΦ or from DEPe-exposed M2 MΦ were not significant, suggesting that the proliferative potential of M1 MΦ exposed to DEPe moves towards those of M2 MΦ. The fact that DEPe exposure has no effect on PDGF-B and on PDGF-Rβ mRNA levels in MRC-5 cells discards the hypothesis of a direct effect of DEPe, potentially remaining in the CM (Fig. S3). Altogether, our data demonstrate that lung fibroblast proliferation induced by CM from DEPe-exposed M1 MΦ is PDGF-Rβ-dependent and tends to reach those observed with CM from M2 MΦ.

**Discussion**

In this report, we demonstrated that DEPe and ligands of AhR increase, in both types of polarized human MΦ, the expression of PDGF-BB, a potent mitogen for fibroblasts and that the secretion of this growth factor in response to DEPe by M1 MΦ is sufficient to stimulate the proliferation of human lung fibroblasts via the activation of the PDGF-BB/PDGFR-β pathway (Fig. 7).

PDGF-B up-regulation by DEPe in human M1 MΦ most likely requires active gene transcription because co-treatment by actinomycin

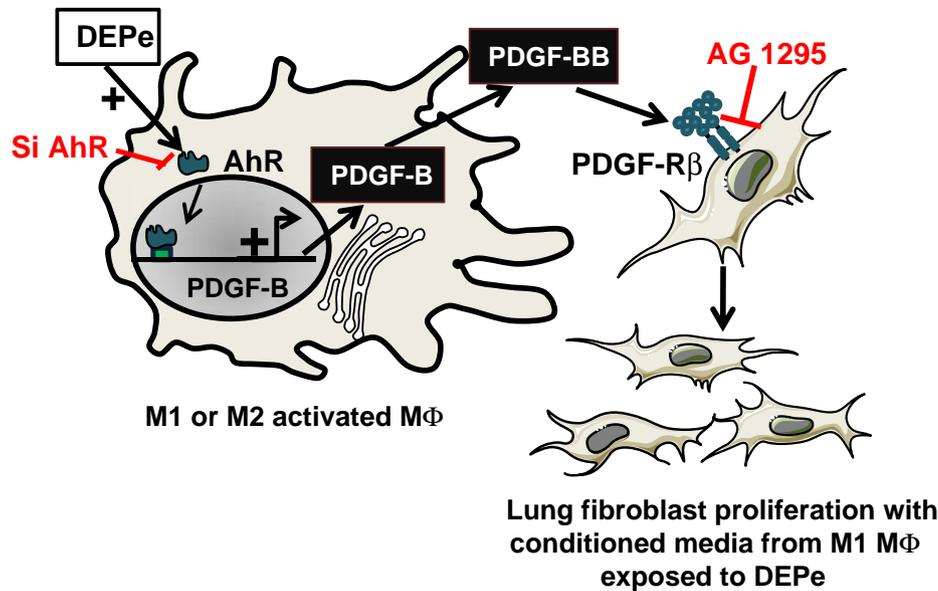


Fig. 7. AhR-dependent secretion of PDGF-BB by human polarizing M $\Phi$  stimulates lung fibroblast proliferation.

D markedly prevented PDGF-B mRNA increase triggered by DEPe. In contrast, the protein synthesis inhibitor failed to counteract PDGF-B mRNA induction, thus indicating that *de novo* protein synthesis was not required, which may suggest a direct regulation of PDGF-B gene expression by DEPe. PDGF-BB up-regulation in human M $\Phi$  was observed when cells were exposed to TCDD and B(a)P, two potent ligands of AhR, well known to contribute to a major way of regulating aromatic hydrocarbon-responsive genes, such as CYP1B1, found up-regulated after exposure to DEPe, TCDD and B(a)P in human M $\Phi$ . By contrast, B(e)P and 1-NP, considered as weak ligands of AhR (Machala et al., 2001), have effects neither on mRNA nor on secretion levels of PDGF-B, suggesting that we can rule out the possible implication of nitro-PAHs and benzo(e)pyrene contained in the DEPe (SRM 1675) in such effects. By contrast, other PAHs such as benzo(b)fluoranthene and chrysene found in DEPe (SRM 1675), and known as AhR ligands, could be involved in DEPe-effects on PDGF-B expression. Taken together, these data suggest the direct implication of the AhR signaling way in DEPe-mediated PDGF-B up-regulation. Such a conclusion is moreover fully supported by the fact that AhR silencing by RNA interference reduced the effects of DEPe on PDGF-B expression.

The fact that PDGF-B mRNA expression was previously observed in unpolarized B(a)P-exposed M $\Phi$  from a GM-CSF origin (Sparfel et al., 2010) suggests that the effect of this pollutant on PDGF-B overexpression is not specific to the growth factors used to differentiate M $\Phi$  (GM-CSF or M-CSF). Furthermore, DEPe increases the PDGF-BB secretion levels at any stage of macrophage activation (*i.e.*, during their polarization or in M $\Phi$  already polarized). Similarly, the PDGF-B mRNA overexpression by DEPe found in both types of M $\Phi$  reveals that such AhR-dependent regulation is independent of polarizing processes. Such conclusion was also supported by the fact that the levels of secretion of the homodimer PDGF-BB are not significantly different in the supernatants of the M $\Phi$  M1- and M2-exposed to DEPe (Fig. 6B). Therefore, our data reveal that DEPe and AhR ligands upregulate PDGF-B secretion in classical and alternative M $\Phi$ , independently of the cellular microenvironment of M $\Phi$ .

Exposure to the pollutant DEP plays a recognized role in the pathogenesis of respiratory diseases owing to its inflammatory and carcinogenic effects. As the major cellular targets of PDGF-BB are smooth muscle cells and fibroblasts, we have considered the contribution of DEPe-induced PDGF-BB secretion to increase lung fibroblast proliferation. Our results showed that rPDGF-BB increased the proliferative activity *in vitro* of the lung fibroblasts MRC-5, from a mesenchymal origin, *via* its ability to stimulate the kinase activity of PDGF-R $\beta$  and its

downstream signaling, *i.e.*, ERK and AKT demonstrating the efficiency of this pathway axis in MRC-5 cells. Similarly, the role of the homodimer PDGF-BB, found in the CM of DEPe-exposed M1 M $\Phi$ , on the increase of lung fibroblast proliferation, was supported by the capacity of the tyrphostin AG-1295 to fully inhibit the cell growth. Surprisingly, the overexpression of the PDGF-B mRNA and of the PDGF-BB secretion by DEPe in M2 M $\Phi$  is not sufficient to increase the MRC-5 cell proliferation when compared to the untreated counterpart, whereas, in contrast to Spiller et al. (2014), no significant difference in PDGF-BB secretion levels was found between basal M1 and M2 M $\Phi$  (Fig. 6B). Such effects may be related to the fact that the proliferative capacity of fibroblasts exposed to the CM from the untreated M2 macrophages is already high (Fig. 6A). Indeed, M2 M $\Phi$  are well known to produce pro-fibrotic growth factors such as TGF $\beta$  (Gordon, 2003). Similarly, the chemokine CCL18, which is highly secreted by the human M2 M $\Phi$ , even by those exposed to DEPe (Jaguin et al., 2015), could participate, at least in part, to the lung fibroblast proliferation (Atamas et al., 2003). In this context, we have also observed the highest mRNA expression of the connective tissue growth factor, a peptide that exhibits PDGF-like biological activity, in the untreated M2 M $\Phi$  than the M1 M $\Phi$  (data not shown).

PDGFs are involved in several diseases such as vascular diseases, fibrosis and tumors. Fibrosis progression has been found associated with PDGF-BB secretion levels (Andrae et al., 2008), and PDGF-BB can stimulate fibroblasts and then facilitate their epithelial–mesenchymal-transition into myofibroblasts, which secrete several extracellular components such as collagen or fibronectin (Yi et al., 1996). Interestingly, the fibro-proliferative response observed in the lung of overexpressing PDGF-BB transgenic rats was associated with collagen deposition (Antoniades et al., 1990; Yoshida et al., 1995). The major source of PDGF-BB during lung fibrosis or after *in vivo* DEP exposure is alveolar M $\Phi$  (Bonner, 2004; Yamashita et al., 2001); in this context, it is noteworthy that M $\Phi$  from idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), a progressive parenchymal lung disease, in which acute exacerbation may be triggered by ambient air pollution (Johansson and Collard, 2013), express PDGF-BB (Antoniades et al., 1990; Vignaud et al., 1991). Moreover, PDGF-BB is a strong chemoattractant for fibrocytes, found in the lung of patients with IPF (Andersson-Sjöland et al., 2008) and which highly express the PDGF-R $\beta$  when compared to those of normal subjects (Aono et al., 2014). Interestingly, with respect to IPF, PDGF-pathway targeting was proposed as a therapeutic approach (Nishioka et al., 2013) and nintedanib, an intracellular inhibitor that targets multiple tyrosine kinases, including PDGF, VEGF and FGF receptors (Hilberg

et al., 2008), has been shown to reduce the decline in lung function (Richeldi et al., 2011, 2014). The overexpression of PDGF-BB in the lung of rat exposed to asbestos (Liu et al., 1997), also supports the impact of exposure to environmental pollutants on the PDGF-BB expression by M $\Phi$ .

Whether PDGF-B secretion may be up-regulated in response to usual exposure to DEP and at a sufficient concentration is however a crucial point to determine, in order to incriminate PDGF-B in deleterious effects of DEP. In this context, it is noteworthy that the DEPe concentration used in the present study, i.e., 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , is in the range of DEPe concentrations retained in *in vitro* toxicity studies with the absence of M $\Phi$  toxicity (Koike et al., 2002; Mundandhara et al., 2006; Jaguin et al., 2015) and that 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  DEPe seems to be equivalent to a particle deposition of 1  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  *in vitro* and corresponds to a 24 h exposure to a polluted urban environment (Chan et al., 2006).

Moreover, although the effects of DEPe do not accurately reflect those of the whole particulates but those of their organic fraction, it seems that the PDGF-B secretion by M $\Phi$  could appear at doses of DEP commonly reached in urban areas or during peak pollution, highlighting the putative relevance of our *in vitro* data to environmental exposure. Thus, the impact of full automobile diesel or urban particles on PDGF-BB secretion should be evaluated. In this context, we observed that lung of rats exposed for 3 h to diesel motor emission showed an increase of PDGF-BB mRNA levels (personal data). Even if the up-regulation of PDGF-BB in response to DEPe is rather moderate, the concentration of PDGF-BB secreted by M1 M $\Phi$  is likely sufficient to stimulate lung fibroblast proliferation. Moreover, PDGF-BB, which is secreted, can be attached to matrix proteoglycans and can increase the cell proliferation *via* collagen or fibronectin (Nguyen et al., 2005), suggesting that the PDGF-BB-dependent cell proliferation could be under-estimated *in situ*.

In summary, the growth factor PDGF-BB was identified as a target of pollutant DEPs in both types of human M $\Phi$ , through activation of the AhR-signaling pathway. Owing to the well-established contribution of PDGF-B to fibrosis, angiogenesis and cancer, up-regulation of PDGF-B in human M1 and M2 M $\Phi$  may contribute to lung deleterious effects caused by DEP exposure.

## Funding

This work was supported by “Fondation Coeur et Artères” (FCA 09T3), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and the University of Rennes 1.

## Conflict of interest

The authors declare they have no competing financial interests.

## Transparency document

The Transparency document associated with this article can be found in the online version.

## Acknowledgments

M. Jaguin is a recipient of a fellowship from the French Ministry of Research. We would like to thank Dr. L. Vernhet and Dr. S. Jouneau for their helpful comments and a critical reading of the manuscript, and C. Morzadec for the technical experiment.

## Appendix A. Supplementary data

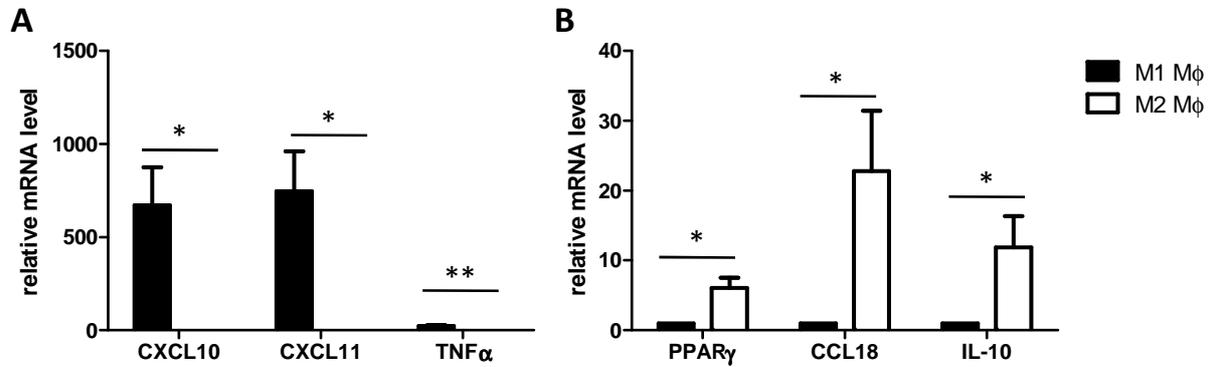
Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2015.04.007>.

## References

- Andersson-Sjöland, A., de Alba, C.G., Nihlberg, K., Becerril, C., Ramírez, R., Pardo, A., et al., 2008. Fibrocytes are a potential source of lung fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 2129–2140.
- Andrae, J., Gallini, R., Betsholtz, C., 2008. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev.* 22, 1276–1312.
- Antoniades, H.N., Bravo, M.A., Avila, R.E., Galanopoulos, T., Neville-Golden, J., Maxwell, M., et al., 1990. Platelet-derived growth factor in idiopathic pulmonary fibrosis. *J. Clin. Invest.* 86, 1055–1064.
- Aono, Y., Kishi, M., Yokota, Y., Azuma, M., Kinoshita, K., Takezaki, A., et al., 2014. Role of PDGF/PDGFR axis in the trafficking of circulating fibrocytes in pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 51, 793–801.
- Atamas, S.P., Luzina, I.G., Choi, J., Tsybalyuk, N., Carbonetti, N.H., Singh, I.S., et al., 2003. Pulmonary and activation-regulated chemokine stimulates collagen production in lung fibroblasts. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 29, 743–749.
- Becker, S., Mundandhara, S., Devlin, R.B., Madden, M., 2005. Regulation of cytokine production in human alveolar macrophages and airway epithelial cells in response to ambient air pollution particles: further mechanistic studies. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 207, 269–275.
- Bonner, J.C., 2004. Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* 15, 255–273.
- Bonner, J.C., Rice, A.B., Lindroos, P.M., O'Brien, P.O., Dreher, K.L., Rosas, I., et al., 1998. Induction of the lung myofibroblast PDGF receptor system by urban ambient particles from Mexico City. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 19, 672–680.
- Campen, M.J., Lund, A.K., Knuckles, T.L., Conklyn, D.J., Bishop, B., Young, D., et al., 2010. Inhaled diesel emissions alter atherosclerotic plaque composition in ApoE(−/−) mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 242, 310–317.
- Chan, R.C.-F., Wang, M., Li, N., Yanagawa, Y., Onoé, K., Lee, J.J., et al., 2006. Pro-oxidative diesel exhaust particle chemicals inhibit LPS-induced dendritic cell responses involved in T-helper differentiation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 118, 455–465.
- Fardel, O., Lecureur, V., Daval, S., Corlu, A., Guillozo, A., 1997. Up-regulation of P-glycoprotein expression in rat liver cells by acute doxorubicin treatment. *Eur. J. Biochem.* 246, 186–192.
- Gordon, S., 2003. Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 23–35.
- Hankinson, O., 2005. Role of coactivators in transcriptional activation by the aryl hydrocarbon receptor. *Arch. Biochem. Biophys.* 433, 379–386.
- Hilberg, F., Roth, G.J., Krssak, M., Kautschitsch, S., Sommergruber, W., Tontsch-Grunt, U., et al., 2008. BIBF 1120: triple angiokinase inhibitor with sustained receptor blockade and good antitumor efficacy. *Cancer Res.* 68, 4774–4782.
- Jaguin, M., Houlbert, N., Fardel, O., Lecureur, V., 2013. Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. *Cell. Immunol.* 281, 51–61.
- Jaguin, M., Fardel, O., Lecureur, V., 2015. Exposure to diesel exhaust particle extracts (DEPe) impairs some polarization markers and functions of human macrophages through activation of AhR and Nr1f2. *PLoS ONE* 10, e0116560.
- Johansson, K., Collard, H.R., 2013. Acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis: a proposal. *Curr. Respir. Care Rep.* 2.
- Koike, E., Hirano, S., Shimojo, N., Kobayashi, T., 2002. cDNA microarray analysis of gene expression in rat alveolar macrophages in response to organic extract of diesel exhaust particles. *Toxicol. Sci.* 67, 241–246.
- Lecureur, V., Ferrec, E.L., N'diaye, M., Vee, M.L., Gardyn, C., Gilot, D., et al., 2005. ERK-dependent induction of TNF $\alpha$  expression by the environmental contaminant benzo(a)pyrene in primary human macrophages. *FEBS Lett.* 579, 1904–1910.
- Lindroos, P.M., Coin, P.G., Badgett, A., Morgan, D.L., Bonner, J.C., 1997. Alveolar macrophages stimulated with titanium dioxide, chrysotile asbestos, and residual oil fly ash upregulate the PDGF receptor- $\alpha$  on lung fibroblasts through an IL-1 $\beta$ -dependent mechanism. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 16, 283–292.
- Liu, J.Y., Morris, G.F., Lei, W.H., Hart, C.E., Lasky, J.A., Brody, A.R., 1997. Rapid activation of PDGF-A and -B expression at sites of lung injury in asbestos-exposed rats. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 17, 129–140.
- Machala, M., Vondráček, J., Bláha, L., Ciganek, M., Neca, J.V., 2001. Aryl hydrocarbon receptor-mediated activity of mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbons determined using *in vitro* reporter gene assay. *Mutat. Res.* 497, 49–62.
- Martinez, F.O., Gordon, S., Locati, M., Mantovani, A., 2006. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J. Immunol.* 177, 7303–7311.
- Mosser, D.M., Edwards, J.P., 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 958–969.
- Mundandhara, S.D., Becker, S., Madden, M.C., 2006. Effects of diesel exhaust particles on human alveolar macrophage ability to secrete inflammatory mediators in response to lipopolysaccharide. *Toxicol. In Vitro* 20, 614–624.
- N'Diaye, M., Le Ferrec, E., Lagadic-Gossman, D., Corre, S., Gilot, D., Lecureur, V., et al., 2006. Aryl hydrocarbon receptor- and calcium-dependent induction of the chemokine CCL1 by the environmental contaminant benzo(a)pyrene. *J. Biol. Chem.* 281, 19906–19915.
- Nebert, D.W., Dalton, T.P., Okey, A.B., Gonzalez, F.J., 2004. Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. *J. Biol. Chem.* 279, 23847–23850.
- Nguyen, T.T.-B., Ward, J.P.T., Hirst, S.J., 2005. beta1-Integrins mediate enhancement of airway smooth muscle proliferation by collagen and fibronectin. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 171, 217–223.
- Nishioka, Y., Azuma, M., Kishi, M., Aono, Y., 2013. Targeting platelet-derived growth factor as a therapeutic approach in pulmonary fibrosis. *J. Med. Invest.* 60, 175–183.
- Noskovičová, N., Petřek, M., Eickelberg, O., Heinzlmann, K., 2015. PDGF signaling in the lung – from lung development and disease to clinical studies. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 52, 263–284.

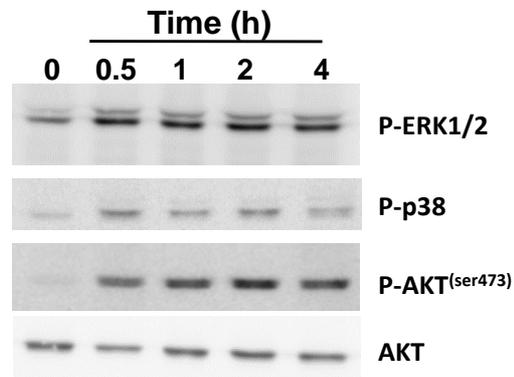
- Pinel-Marie, M.-L., Sparfel, L., Desmots, S., Fardel, O., 2009. Aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of the NADPH oxidase subunit NCF1/p47 phox expression leading to priming of human macrophage oxidative burst. *Free Radic. Biol. Med.* 47, 825–834.
- Podechard, N., Lecureur, V., Le Ferrec, E., Guenon, I., Sparfel, L., Gilot, D., et al., 2008. Interleukin-8 induction by the environmental contaminant benzo(a)pyrene is aryl hydrocarbon receptor-dependent and leads to lung inflammation. *Toxicol. Lett.* 177, 130–137.
- Podechard, N., Le Ferrec, E., Rebillard, A., Fardel, O., Lecureur, V., 2009. NPC1 repression contributes to lipid accumulation in human macrophages exposed to environmental aryl hydrocarbons. *Cardiovasc. Res.* 82, 361–370.
- Pope, C.A., Burnett, R.T., Thun, M.J., Calle, E.E., Krewski, D., Ito, K., et al., 2002. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA* 287, 1132–1141.
- Richeldi, L., Costabel, U., Selman, M., Kim, D.S., Hansell, D.M., Nicholson, A.G., et al., 2011. Efficacy of a tyrosine kinase inhibitor in idiopathic pulmonary fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 365, 1079–1087.
- Richeldi, L., du Bois, R.M., Raghu, G., Azuma, A., Brown, K.K., Costabel, U., et al., 2014. Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 370, 2071–2082.
- Sinal, C.J., Bend, J.R., 1997. Aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of cyp1a1 by bilirubin in mouse hepatoma hepa 1c1c7 cells. *Mol. Pharmacol.* 52, 590–599.
- Sparfel, L., Pinel-Marie, M.-L., Boize, M., Koscielny, S., Desmots, S., Pery, A., et al., 2010. Transcriptional signature of human macrophages exposed to the environmental contaminant benzo(a)pyrene. *Toxicol. Sci.* 114, 247–259.
- Spiller, K.L., Anfang, R.R., Spiller, K.J., Ng, J., Nakazawa, K.R., Daulton, J.W., et al., 2014. The role of macrophage phenotype in vascularization of tissue engineering scaffolds. *Biomaterials* 35, 4477–4488.
- Srivastava, A., Yadav, S., Sharma, A., Dwivedi, U.N., Flora, S.J.S., Parmar, D., 2012. Similarities in diesel exhaust particles induced alterations in expression of cytochrome P-450 and glutathione S-transferases in rat lymphocytes and lungs. *Xenobiotica* 42, 624–632.
- Takano, H., Yoshikawa, T., Ichinose, T., Miyabara, Y., Imaoka, K., Sagai, M., 1997. Diesel exhaust particles enhance antigen-induced airway inflammation and local cytokine expression in mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 156, 36–42.
- van Grevenynghe, J., Rion, S., Le Ferrec, E., Le Vee, M., Amiot, L., Fauchet, R., et al., 2003. Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit differentiation of human monocytes into macrophages. *J. Immunol.* 170, 2374–2381.
- Vignaud, J.M., Allam, M., Martinet, N., Pech, M., Plenat, F., Martinet, Y., 1991. Presence of platelet-derived growth factor in normal and fibrotic lung is specifically associated with interstitial macrophages, while both interstitial macrophages and alveolar epithelial cells express the c-sis proto-oncogene. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 5, 531–538.
- World Medical Association, 2013. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA* 310, 2191–2194.
- Yamashita, N., Sekine, K., Miyasaka, T., Kawashima, R., Nakajima, Y., Nakano, J., et al., 2001. Platelet-derived growth factor is involved in the augmentation of airway responsiveness through remodeling of airways in diesel exhaust particulate-treated mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* 107, 135–142.
- Yi, E.S., Lee, H., Yin, S., Piguat, P., Sarosi, I., Kaufmann, S., et al., 1996. Platelet-derived growth factor causes pulmonary cell proliferation and collagen deposition in vivo. *Am. J. Pathol.* 149, 539–548.
- Yoshida, M., Sakuma, J., Hayashi, S., Abe, K., Saito, I., Harada, S., et al., 1995. A histologically distinctive interstitial pneumonia induced by overexpression of the interleukin 6, transforming growth factor beta 1, or platelet-derived growth factor B gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 9570–9574.

## Figure S1



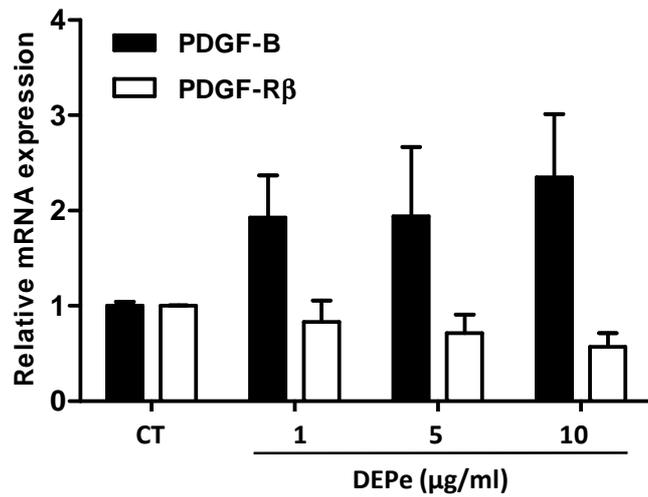
**Figure S1:** Gene expression profiles of human polarized M1 and M2 M $\phi$ . Six-day cultured M-CSF human primary macrophages were activated with IFN-K or with IL-4 for 24 h to obtain classically activated M $\phi$  (M1) or alternative activated M $\phi$  (M2), respectively. mRNA expression of M1 markers (A) and M2 markers (B) in M1 and M2 M $\phi$  was evaluated by RT-qPCR. Data were expressed relatively to mRNA levels found in M2 M $\phi$ , arbitrarily set at the value of 1 (A) or to mRNA levels found in M1 M $\phi$ , arbitrarily set at the value of 1 (B) and are the mean  $\pm$  SEM of at least six independent experiments \*p<0.05 and \*\*p<0.01.

## Figure S2



**Figure S2:** Kinetic of rPDGF-BB on signalling pathways in human lung fibroblast MRC-5. MRC-5 cells were treated or not with 30 ng/ml rPDGF-BB for 0.5, 1, 2 and 4 h. Protein and phospho-protein expressions were analyzed by Western blot and performed with whole-cell lysates. Equal gel loading and transfer efficiency were checked by total protein hybridization of respective phospho-protein. Experiments were repeated twice, with similar results.

**Figure S3**



**Figure S3:** Effect of DEPe on PDGF-B and PDGF-R $\gamma$  mRNA expression in human lung fibroblast cells. MRC-5 cells were treated or not with indicated dose of DEPe ( $\mu\text{g/ml}$ ) during 24 h. PDGF-B and PDGF-R $\gamma$  mRNA expression in MRC-5 cells were next determined by RT-qPCR. Data were expressed relatively to mRNA levels found in control (CT) and are the mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments.

### *III.3.5. Discussion et perspectives*

#### *III.3.5.1. Apport du travail*

Bien que certaines études aient montrées une augmentation de l'expression de PDGF ou de ses récepteurs lors d'exposition aux particules d'amiante ou diesel (449–451), nous montrons pour la première fois par ce travail, que les DEPe et les ligands de AhR augmentent l'expression et la sécrétion de PDGF-BB dans les deux types de M $\phi$  humains activés M1 et M2. Nous montrons également qu'une telle régulation est dépendante de l'activation d'AhR. De plus, PDGF-BB est sécrété par les M $\phi$  activés classiquement exposés aux DEPe en quantité suffisante pour avoir un impact fonctionnel et favoriser la prolifération de fibroblastes pulmonaires.

#### *III.3.5.2. Questionnements à approfondir...*

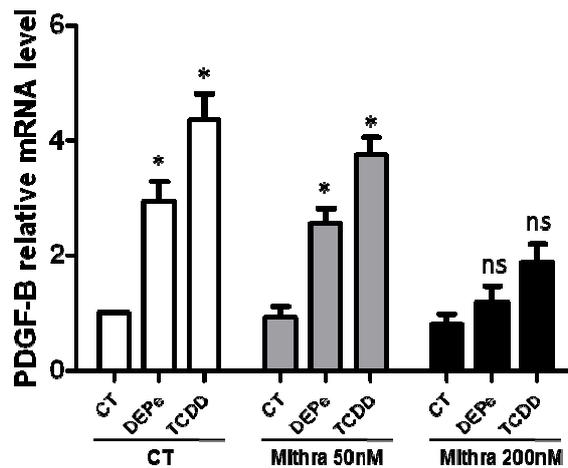
##### *III.3.5.2.1. Quels composants des DEP peuvent induire la production de PDGF par les M $\phi$ ?*

Nous mettons en évidence dans ce travail, une induction de l'expression de PDGF-B dans les M $\phi$  humains M1 et M2 exposés aux DEPe. Il est alors légitime de se demander quel composant de ce mélange est susceptible d'engendrer ces effets. Nos résultats montrent que l'expression et la sécrétion de PDGF-BB sont augmentées dans les M $\phi$  humains après un traitement à la TCDD ou au B(a)P, deux composés ayant une forte affinité pour AhR tandis que le 1-NP et le B(e)P, deux agonistes de faible affinité pour AhR, n'ont d'effet ni sur l'expression ni sur la sécrétion de PDGF-B. Forts de ce constat, nous pouvons raisonnablement écarter une implication des nitro-HAP et du B(e)P présents dans le mélange dans cette induction. Par contre, la présence d'autres HAP capables d'activer AhR comme benzo(b)fluoranthène et le chrysène dans les DEPe peuvent expliquer cette augmentation d'expression de PDGF-B dans les M $\phi$  exposés (499). L'augmentation de l'expression de PDGF-B dans les M $\phi$  M1 et M2 exposés aux DEPe n'est pas abolie par l'extinction de l'expression du facteur de transcription Nrf2 par des ARN interférents (données non présentées) suggérant que les composés activateurs de Nrf2 présents dans le mélange comme les quinones ne contribuent pas à l'induction de PDGF-B. Par ailleurs, le LPS potentialise l'induction de PDGF-B par les DEPe dans les M $\phi$  M1. Ce résultat suggère que, lors d'une exposition réelle, les endotoxines présentes sur les particules urbaines pourraient renforcer la production par les M $\phi$  alvéolaires, de PDGF-B induite par les HAP absorbés sur les DEP. En définitive, identifier dans le mélange le composé responsable de la surproduction de PDGF-B est une question intéressante mais le point principal reste l'effet résultant de l'exposition au mélange global au niveau de la santé humaine. Il est en effet très probable que de nombreux composés présents dans ce mélange induisent à différents degrés l'expression de PDGF-B.

### III.3.5.2.2. Par quels mécanismes AhR pourrait-il réguler l'expression induite de PDGF-B ?

Nos résultats semblent montrer que la régulation de l'expression de PDGF-B par les DEPe dans les M $\phi$  activés dépend de mécanismes directs impliquant le facteur AhR. En effet, le traitement par l'actinomycine D, un inhibiteur de la transcription, abolit l'augmentation de l'expression des transcrits PDGF-B par les DEPe. En revanche, la cycloheximide utilisée comme inhibiteur de la synthèse protéique ne contrecarre pas cette augmentation indiquant qu'une néosynthèse de protéine n'est pas nécessaire à une telle régulation. De plus, les ligands très affins pour AhR induisent également une augmentation d'expression et de sécrétion de PDGF-B par les M $\phi$  humains tandis que ceux de faible affinité comme le B(e)P et le 1-Nitropyrene (1-NP) n'y parviennent pas. Nous avons donc émis l'hypothèse d'une implication d'AhR dans cette régulation. Cette hypothèse a été appuyée par le fait que l'inactivation moléculaire d'AhR par des ARN interférences abolit complètement les effets des DEPe sur l'expression des ARNm de PDGF-B dans les deux types de M $\phi$  M1 et M2. L'analyse *in silico* du promoteur de PDGF-B à l'aide du logiciel MatInspector a révélé un site XRE putatif localisé en position -144/-168. AhR pourrait ainsi exercer une action directe en se fixant au niveau de l'élément de réponse XRE et activer la transcription des ARNm de PDGF-B. Pour tester cette théorie, nous nous sommes procuré un plasmide contenant un gène rapporteur codant pour la luciférase sous le contrôle du promoteur du gène PDGF (-583 pb à +80 pb), gracieusement obtenu auprès du Dr David Engelmann. Nous avons tenté de transfecter les M $\phi$  humains primaires avec ce plasmide sans succès. Notre choix s'est ensuite porté sur la lignée cellulaire épithéliale bronchique humaine BEAS-2B où nous avons évalué l'activité luciférase du promoteur de PDGF-B en présence de DEPe ou de TCDD. L'activité du promoteur du gène PDGF étant trop faible par rapport au plasmide de référence, nous n'avons pas poursuivi mais il serait à l'avenir intéressant d'utiliser un autre modèle cellulaire pour réitérer ces expériences. Nos données pourraient également être confirmées en utilisant une autre approche, le ChIP qui permettrait d'évaluer directement dans les M $\phi$  humains activés l'enrichissement d'AhR au niveau du XRE situé sur le promoteur de PDGF-B lors d'une exposition aux DEPe ou à la TCDD.

L'analyse *in silico* du promoteur de PDGF-B montre également la présence de plusieurs sites putatifs de liaison du facteur de transcription Sp1. La mithramycine, un inhibiteur chimique de Sp1, diminue de manière dose-dépendante l'expression de PDGF-B induite par les DEPe (**Figure 36**). Il est donc à ce stade envisageable que Sp1 agisse de concert avec AhR pour réguler l'induction de PDGF-B par les DEPe. Il faudrait alors approfondir ces résultats en inactivant Sp1 dans les M $\phi$  humains à l'aide de petits ARN interférents et en immunoprécipitant AhR et Sp1 pour identifier une possible interaction.



**Figure 36: Inhibition de l'induction de PDGF-B par les DEPe et la TCDD dans les macrophages M1 par la mithramycine, un inhibiteur de Sp1.** Les macrophages différenciés pendant 6 jours en présence de M-CSF sont pré-exposés 1 h aux doses indiquées de mithramycine (Mithra) et ensuite activés pendant 6 h avec de l'IFN $\gamma$  (20ng/ml) en présence ou non de DEPe (5 $\mu$ g/ml) ou de TCDD (10nM) pour obtenir des macrophages M1. Les niveaux d'expression des ARNm de PDGF-B sont déterminés par RT-qPCR; les données sont exprimées relativement par rapport au niveau d'ARN retrouvé dans les cellules non traitées (CT), arbitrairement fixé à la valeur de 1 et représentent la moyenne  $\pm$  SEM d'au moins 4 expériences indépendantes.\*p<0.05.

### III.3.5.2.3. L'effet prolifératif du PDGF-BB produit par les M $\phi$ exposés aux DEPe sur les fibroblastes pulmonaire est-il spécifique ?

Nous montrons que la quantité de PDGF-BB produite par les M $\phi$  activés de type M1 notamment est suffisante pour stimuler la prolifération *in vitro* des fibroblastes pulmonaires MRC-5. L'implication du dimère PDGF-BB retrouvé dans les milieux conditionnés des M $\phi$  exposés aux DEPe sur la prolifération des fibroblastes pulmonaires est appuyée par le fait que l'inhibition chimique du récepteur PDGFR $\beta$  par l'AG1295 dans les cellules MRC5 abolit complètement cette croissance cellulaire. Afin de renforcer ces données, nous pourrions combiner cette approche d'inhibition chimique à une inhibition moléculaire de PDGF-B dans les M $\phi$  et/ou de PDGF-R $\beta$  dans les fibroblastes pulmonaires MRC5 par des petits ARN interférences et évaluer la prolifération des MRC5 cultivées en présence de ces milieux conditionnés. Nous aurions également pu utiliser un autre inhibiteur chimique de PDGFR $\beta$ . Cependant, il apparaît que la tyrphostine (ou AG1295) soit l'inhibiteur disponible le plus spécifique de l'isoforme  $\beta$  du récepteur au PDGF.

*III.3.5.2.4. Les fibroblastes pulmonaires cultivés en présence de milieux conditionnés de Mφ exposés aux DEPe acquièrent-ils un phénotype de myofibroblastes ?*

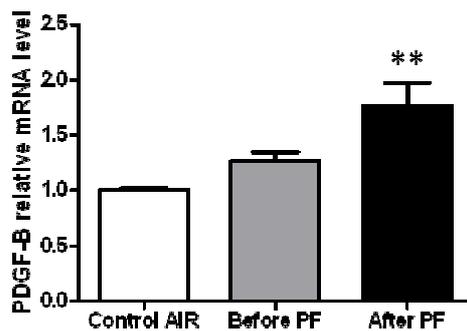
Comme nous l'avons rappelé dans le chapitre précédent, le développement de la majorité des fibres tissulaires est associé à une sécrétion de PDGF-BB (443). En effet, ce facteur de croissance est capable de stimuler les fibroblastes et de favoriser des processus complexes conduisant ces cellules à se transdifférencier en cellules prolifératives dont le phénotype s'apparente à celui des myofibroblastes. Les changements cellulaires accompagnant cette transition incluent la sécrétion et le dépôt excessif de composant de la MEC comme le collagène de type 1 ou la fibronectine et l'expression de protéines du cytosquelette telle que  $\alpha$ -SMA (smooth muscle-  $\alpha$ -actin) (500, 501). Si nos résultats montrent un effet prolifératif du PDGF-BB sécrété par les Mφ exposés aux DEPe sur les fibroblastes pulmonaires MRC5, d'autres expériences complémentaires sont nécessaires afin d'évaluer si cette sécrétion est aussi capable de favoriser l'acquisition de marqueurs myofibroblastiques comme l'expression de l' $\alpha$ -SMA et du collagène de type 1 $\alpha$ 1 (col1 $\alpha$ 1) dans ces cellules.

*III.3.5.2.5. L'induction de PDGF-B après une exposition aux DEP est-elle retrouvée in vivo et dépend-t-elle également de AhR ?*

Il est indéniable que les résultats obtenus avec les extraits organiques ne reflètent pas complètement la réalité d'une exposition aux particules diesel entières et que des données sur des modèles *in vivo* étayeraient nos conclusions. Ainsi, dans le cadre d'un consortium regroupant plusieurs équipes, nous avons exposés des rats Wistar à 1 mg/m<sup>3</sup> d'émissions de moteur diesel standard pendant 3 heures afin de mimer une exposition aiguë à un environnement urbain pollué. Les rats étaient séparés en groupes de 6 individus placés avant ou après un filtre à particule. Le but étant d'évaluer les effets de la présence d'un filtre à particules sur la réponse pulmonaire. Les animaux étaient ensuite sacrifiés et le tissu pulmonaire était récupéré, les ARN totaux ont été extraits et rétrotranscrits en ADN complémentaires pour réaliser une étude transcriptomique. La validation par RT-qPCR des résultats obtenus par transcriptomique révèle une augmentation de l'expression de PDGF-B dans les tissus pulmonaires des rats exposés de façon aiguë aux émissions de moteur diesel en présence d'un filtre à particules (**Figure 37**). Il pourrait être envisagé à l'avenir de réaliser des coupes histologiques des poumons de ces rats exposés à ces émissions diesel pour analyser par immunohistochimie l'expression de PDGF-B et de ces récepteurs en combinaison avec des marqueurs phénotypiques de macrophages et d'autres types cellulaires afin d'identifier plus précisément les cellules productrices de ce facteur de croissance. De plus, il apparaît clairement que la biodisponibilité de PDGF-B est régulée par les composants de la MEC, où il peut être retenu après sa sécrétion. Les quantités de PDGF-BB sécrétées peuvent alors être sous-estimées. Par ailleurs, les résultats obtenus suite au criblage génique que nous

avons réalisé en préambule de cette étude ont montré une induction de l'expression de la métalloprotéase MMP2 dans les 2 types de M $\phi$  exposés aux DEPe (données non présentées). L'augmentation de protéases par une exposition aux particules diesel pourrait alors contribuer à favoriser la biodisponibilité de PDGF-BB qui agirait sur ses cellules cibles de façon paracrine.

Enfin, pour affirmer que la régulation de l'expression de PDGF-B par les DEP est dépendante de AhR, l'utilisation de souris AhR<sup>-/-</sup> exposées aux DEP ou de M $\phi$  péritonéaux de souris AhR<sup>-/-</sup> exposés aux DEPe pourrait aussi apporter des réponses.



**Figure 37: Les DEP stimulent l'expression de PDGF-B *in vivo*.** Des rats Wistar sont exposés par inhalation pendant 3 h à de l'air (Control Air) ou à 1 mg/m<sup>3</sup> d'émissions de moteur diesel standard (DEP) avant et après un filtre à particule (PF). Les poumons sont collectés après l'exposition; les ARNm totaux des poumons sont isolés et le niveau d'expression des ARNm de PDGF-B est estimé par RT-qPCR; les données sont exprimées relativement par rapport au niveau d'ARN retrouvé dans le groupe contrôle (Control AIR), arbitrairement fixé à la valeur de 1. Les résultats correspondent à la moyenne  $\pm$  SEM de 5 rats par groupe. \*\*p<0.01.

### III.3.5.3 Conclusion et perspectives

Nous avons donc identifié le facteur de croissance PDGF-BB comme une cible des DEP régulée par AhR dans les M $\phi$  humains activés de type M1 et M2. De plus, cette augmentation bien que modérée engendre des conséquences fonctionnelles car la quantité de PDGF-BB sécrétée est suffisante pour stimuler la prolifération des fibroblastes pulmonaires. Ces données requièrent de plus amples investigations notamment lors d'études *in vivo*, mais nous pouvons d'ores et déjà considérer PDGF-B comme cible pertinente de l'exposition aux particules diesel car son induction est retrouvée aussi bien *in vitro* chez l'homme qu'*in vivo* chez le rat. Si l'on considère le rôle bien établi de PDGF-B dans le développement de nombreuses pathologies comme la fibrose, l'athérosclérose ou le cancer, sa régulation dans les M $\phi$  humains activés peut contribuer aux effets délétères causés par une exposition à cette pollution particulaire urbaine.



### III. CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

---

Un air propre est considéré par l’OMS « comme une condition fondamentale de la santé et du bien-être humains ». Toutefois, la pollution atmosphérique et plus particulièrement celle associée aux particules de type diesel continue de représenter un risque sanitaire majeur si l’on considère le très grand nombre de personnes exposées continuellement partout dans le monde. Même si les politiques publiques visent à réduire ces émissions, la pollution aux particules fines incluant les particules diesel dans les pays industrialisés mais aussi dans les pays en développement est difficilement limitable et dépasse régulièrement, dans de nombreuses villes du monde, les seuils d’exposition fixé par l’OMS. De nombreuses études épidémiologiques ont démontré une corrélation entre l’exposition à cette pollution particulaire et le développement de nombreuses pathologies telles que les maladies cardiovasculaires, respiratoires ou encore le cancer (140). Cependant, le CIRC n’a classé que très récemment (en juin 2012) cette pollution comme cancérogène avéré pour l’Homme et les mécanismes qui contrôlent la toxicité de ces composants ne sont pas entièrement élucidés.

Notre travail s’est limité à l’étude des effets des extraits organiques de particule diesel sans tenir compte des effets des particules entières. Nous utilisons dans nos études toxicologiques un mélange standard (NIST SRM 1975) d’extraits organiques de particules diesel à une concentration de 5 ou 10 µg/ml. Ce mélange est obtenu après lavage au dichlorométhane des particules diesel générées par des charriots élévateurs (NIST SRM 2975). Les concentrations d’exposition ici n’engendrent pas de toxicité sur 48 h et ont été utilisées dans des études toxicologiques antérieures (228, 502). Toutefois, cette fraction organique ne reflète pas exactement l’exposition aux particules entières. La question importante est de savoir si les concentrations que nous utilisons miment les doses d’exposition en condition réelle. Des études dosimétriques ont montré qu’il était possible de corréler la quantité de PM<sub>2,5</sub> déposées dans l’arbre trachéo-bronchique avec les quantités de DEPe utilisées dans les systèmes *in vitro* (29). D’après ces calculs, les doses de 5 et 10 µg/ml de DEPe sont équivalentes *in vitro* à des doses de dépôt de 1 et 2 µg/cm<sup>2</sup> respectivement. Ce qui correspond à une exposition de 24 h à un environnement urbain pollué (205).

L’ensemble des travaux réalisés au cours de cette thèse a permis d’approfondir nos connaissances sur les propriétés immunotoxiques des particules diesel. Nous avons établi des modèles de macrophages humains polarisés *in vitro* destinés à l’étude de la toxicité de ces polluants. Ces modèles cellulaires peuvent également constituer un bon modèle d’étude pour évaluer la toxicité d’autres polluants environnementaux comme l’arsenic ou les extraits de fumée de cigarette que ce soit au cours d’exposition aiguë ou chronique. Au-delà de ces applications toxicologiques, les données résultant de ce travail de thèse ont élargi les connaissances sur la caractérisation des macrophages

humains *in vitro*. L'étude réalisée démontre l'intérêt d'une activation réelle des macrophages par l'IFN $\gamma$  ou l'IL-4 en plus d'une différenciation préalable par des facteurs de croissance comme le M-CSF pour l'acquisition de phénotypes M1 et M2 clairement distincts. Ces modèles constituent en outre un très bon outil pour la caractérisation de populations de macrophages humains comme l'atteste sa deuxième position sur la liste des articles les plus consultés dans le journal *Cellular Immunology*.

Sur le plan toxicologique, nous avons démontré que les DEPe perturbent de nombreux marqueurs associés à la polarisation aussi bien M1 que M2 dans les macrophages, sans toutefois perturber globalement leur programme de polarisation, ni engendrer de transition d'un phénotype anti-inflammatoire vers un phénotype pro-inflammatoire et réciproquement. Nous avons démontré l'implication d'AhR et Nrf2 dans la diminution de l'expression de certaines cytokines et chimiokines comme l'IL-12p40, l'IL-6 et CCL18. Nous constatons cependant qu'AhR et Nrf2 ne sont pas les seuls mécanismes responsables des effets des particules diesel dans notre modèle puisque leur inhibition moléculaire à l'aide de siRNA ne contrecarre pas l'ensemble des effets observés sur l'expression des marqueurs de polarisation. A ce stade, ATF3 un répresseur transcriptionnel de cytokines inflammatoires dont l'expression est induite par les DEP *in vitro* chez l'Homme et *in vivo* chez le rat semble être une cible intéressante pour expliquer globalement les effets immunosupresseurs des DEPe sur les macrophages. Dans cette perspective, il serait utile d'approfondir nos recherches sur la régulation d'ATF3 par les DEP et ses conséquences fonctionnelles.

Le fait que le PDGF-B ou ses récepteurs soient induits par les DEP ou d'autres toxiques environnementaux n'est pas complètement nouveau (449–451). Toutefois, nous montrons de manière originale au cours de notre dernière étude que le PDGF-B est une cible induite par les DEPe dans les macrophages humains aussi bien de type M1 que M2, suggérant que même les macrophages de type M1, exposés au DEP, pourraient eux aussi favoriser le développement d'une fibrose (habituellement caractéristique des macrophages de type M2). Nous avons pu montrer que cette induction par les DEPe est due à un mécanisme transcriptionnel direct et qu'elle dépend de l'activation d'AhR même si d'autres facteurs, dont Sp1 pourraient intervenir. Quelques soient les mécanismes d'induction de PDGF-B par les DEPe et la TCDD, nous montrons que ce facteur de croissance est sécrété par les macrophages M1 en quantité suffisante pour stimuler de manière dépendante du PDGFR la prolifération de cellules fibroblastiques pulmonaires. Ce phénomène pourrait en partie expliquer comment les polluants de l'air urbains participent au développement de pathologies respiratoires comme la fibrose pulmonaire.

Pour aller plus loin dans ces études tout en restant dans un cadre *in vitro*, nous pourrions étudier les mécanismes qui initient ou soutiennent le développement de tumeurs lors d'une exposition aux DEP, contaminants cancérigènes pour l'Homme. Nous envisageons d'évaluer le potentiel de transformation cellulaire de ces mélanges lors d'une exposition chronique par exemple sur une lignée

épithéliale pulmonaire.

Il pourrait également être intéressant d'étudier l'impact aigu et chronique de ces polluants sur l'acquisition des phénotypes de macrophages en y incluant d'autres types d'activation comme les macrophages associés aux tumeurs (TAM). En effet, des modifications de l'expression du sécrétome de ces macrophages par ces particules de type diesel (comme nous l'avons montré pour PDGF-B) pourraient concourir à modifier le stroma de tumeurs solides et soutenir activement leur croissance. Il est possible d'établir des modèles *in vitro* de TAM à l'aide de macrophages humains cultivés en présence de lignées cellulaires cancéreuses ou même de se procurer des TAM issus de tumeurs solides.

Au niveau physiopathologique, il serait utile de déterminer si l'exposition chronique aux DEP peut exacerber une fibrose pulmonaire chimio-induite par la bléomycine ou dans un contexte de silicose dans la mesure où les macrophages et la sécrétion de facteurs de croissance comme le PDGF-B favorisent de telles pathologies. Nous pourrions également envisager de phénotyper les macrophages présents au niveau des lésions tissulaires. Par ailleurs, nous évaluons en ce moment dans le cadre d'un consortium, l'impact cardio-pulmonaire d'une exposition chronique au diesel et au biodiesel par inhalation chez le rat.

**Au-delà de nos études, des alternatives au diesel standard comme le biodiesel entrent sur le marché depuis quelques années. Ce biocarburant se forme par trans-estérification d'huile végétale avec un alcool aboutissant à la formation d'ester méthylique d'huiles végétales (EMHV). Cependant, dans le cadre de mélange, ces composés pourraient avoir un potentiel toxique plus important que le diesel standard. En effet, l'action combinée des HAP et des EMHV qui ont la propriété de fusionner avec les membranes cellulaires pourrait faciliter la pénétration des HAP dans les cellules et ainsi potentialiser leurs effets cancérogènes par exemple. Il paraît donc primordial à l'heure actuelle d'entreprendre des études afin d'évaluer l'impact de ces nouveaux composants sur la santé humaine.**



## IV. BIBLIOGRAPHIE

---

1. Choi J-H, Kim J-S, Kim Y-C, Kim Y-S, Chung N-H, Cho M-H. Comparative study of PM2.5 - and PM10 - induced oxidative stress in rat lung epithelial cells. *J Vet Sci.* 2004 Mar;5(1):11–8.
2. Rodríguez S, Querol X, Alastuey A, Viana M-M, Alarcón M, Mantilla E, et al. Comparative PM10-PM2.5 source contribution study at rural, urban and industrial sites during PM episodes in Eastern Spain. *Sci Total Environ.* 2004 Jul 26;328(1-3):95–113.
3. Vassilakos C, Saraga D, Maggos T, Michopoulos J, Pateraki S, Helmis CG. Temporal variations of PM2.5 in the ambient air of a suburban site in Athens, Greece. *Sci Total Environ.* 2005 Oct 15;349(1-3):223–31.
4. Borm PJA, Robbins D, Haubold S, Kuhlbusch T, Fissan H, Donaldson K, et al. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. Part *Fibre Toxicol.* 2006;3:11.
5. Ambrogio M, Saracco G, Specchia V, van Gulijk C, Makkee M, Moulijn JA. On the generation of aerosol for diesel particulate filtration studies. *Sep Purif Technol.* 2002 Jun 1;27(3):195–209.
6. Monn C, Becker S. Cytotoxicity and induction of proinflammatory cytokines from human monocytes exposed to fine (PM2.5) and coarse particles (PM10-2.5) in outdoor and indoor air. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1999 Mar 15;155(3):245–52.
7. Donaldson K, Stone V. Current hypotheses on the mechanisms of toxicity of ultrafine particles. *Ann Dell'Istituto Super Sanità.* 2003;39(3):405–10.
8. Geiser M, Rothen-Rutishauser B, Kapp N, Schürch S, Kreyling W, Schulz H, et al. Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environ Health Perspect.* 2005 Nov;113(11):1555–60.
9. MacNee W, Donaldson K. Mechanism of lung injury caused by PM10 and ultrafine particles with special reference to COPD. *Eur Respir J Suppl.* 2003 May;40:47s – 51s.
10. Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect.* 2005 Jul;113(7):823–39.
11. Anderson M, Svartengren M, Philipson K, Camner P. Regional human lung deposition studied by repeated investigations. *J Aerosol Sci.* 1988;19(7):1121–4.
12. Löndahl J, Swietlicki E, Rissler J, Bengtsson A, Boman C, Blomberg A, et al. Experimental determination of the respiratory tract deposition of diesel combustion particles in patients with chronic obstructive pulmonary disease. Part *Fibre Toxicol.* 2012;9:30.
13. Riedl M, Diaz-Sanchez D. Biology of diesel exhaust effects on respiratory function. *J Allergy Clin Immunol.* 2005 Feb;115(2):221–8; quiz 229.
14. Kittelson DB. Engines and nanoparticles: a review. *J Aerosol Sci.* 1998 Jun 1;29(5–6):575–88.

15. Imrich A, Ning Y, Kobzik L. Insoluble components of concentrated air particles mediate alveolar macrophage responses in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2000 Sep 1;167(2):140–50.
16. Ormstad H, Johansen BV, Gaarder PI. Airborne house dust particles and diesel exhaust particles as allergen carriers. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. 1998 Jun;28(6):702–8.
17. James W, Jia C, Kedia S. Uneven magnitude of disparities in cancer risks from air toxics. *Int J Environ Res Public Health*. 2012 Dec;9(12):4365–85.
18. Fajersztajn L, Veras M, Barrozo LV, Saldiva P. Air pollution: a potentially modifiable risk factor for lung cancer. *Nat Rev Cancer*. 2013 Sep;13(9):674–8.
19. Stewart PA, Coble JB, Vermeulen R, Schleiff P, Blair A, Lubin J, et al. The diesel exhaust in miners study: I. Overview of the exposure assessment process. *Ann Occup Hyg*. 2010 Oct;54(7):728–46.
20. Garshick E, Laden F, Hart JE, Rosner B, Smith TJ, Dockery DW, et al. Lung cancer in railroad workers exposed to diesel exhaust. *Environ Health Perspect*. 2004 Nov;112(15):1539–43.
21. OMS | Lignes directrices OMS relatives à la qualité de l'air – mise à jour mondiale 2005
22. Kim D, Gautam M, Gera D. Parametric studies on the formation of diesel particulate matter via nucleation and coagulation modes. *J Aerosol Sci*. 2002 Dec;33(12):1609–21.
23. Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med*. 1991 Sep 30;91(3C):31S – 38S.
24. Davies KJ. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life*. 2000 Nov;50(4-5):279–89.
25. Favier A. Stress oxydant et pathologies humaines. [Httpwwwem-Premiumcomdatarevues0003450900640006390](http://www.em-premium.com/revues/0003450900640006390) [Internet]. 2008 Feb 20 [cited 2015 Jan 8]; Available from: <http://www.em-premium.com/article/87978/>
26. Liao JK. Endothelium and acute coronary syndromes. *Clin Chem*. 1998 Aug 1;44(8):1799–808.
27. Gupta SC, Hevia D, Patchva S, Park B, Koh W, Aggarwal BB. Upsides and downsides of reactive oxygen species for cancer: the roles of reactive oxygen species in tumorigenesis, prevention, and therapy. *Antioxid Redox Signal*. 2012 Jun 1;16(11):1295–322.
28. Park JY, Shigenaga MK, Ames BN. Induction of cytochrome P4501A1 by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin or indolo(3,2-b)carbazole is associated with oxidative DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Mar 19;93(6):2322–7.
29. Li N, Sioutas C, Cho A, Schmitz D, Misra C, Sempf J, et al. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ Health Perspect*. 2003 Apr;111(4):455–60.
30. Enou M, Herber R, Wennig R, Marson C, Bodaud H, Leroy P, et al. gamma-Glutamyltranspeptidase-dependent metabolism of 4-hydroxynonenal-glutathione conjugate. *Arch Biochem Biophys*. 2002 Jan 1;397(1):18–27.

31. Gurgueira SA, Lawrence J, Coull B, Murthy GKG, González-Flecha B. Rapid increases in the steady-state concentration of reactive oxygen species in the lungs and heart after particulate air pollution inhalation. *Environ Health Perspect*. 2002 Aug;110(8):749–55.
32. Hiura TS, Kaszubowski MP, Li N, Nel AE. Chemicals in diesel exhaust particles generate reactive oxygen radicals and induce apoptosis in macrophages. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1999 Nov 15;163(10):5582–91.
33. Knuckles TL, Dreher KL. Fine oil combustion particle bioavailable constituents induce molecular profiles of oxidative stress, altered function, and cellular injury in cardiomyocytes. *J Toxicol Environ Health A*. 2007 Nov;70(21):1824–37.
34. Kumagai Y, Arimoto T, Shinyashiki M, Shimojo N, Nakai Y, Yoshikawa T, et al. Generation of reactive oxygen species during interaction of diesel exhaust particle components with NADPH-cytochrome P450 reductase and involvement of the bioactivation in the DNA damage. *Free Radic Biol Med*. 1997;22(3):479–87.
35. Nel AE, Diaz-Sanchez D, Ng D, Hiura T, Saxon A. Enhancement of allergic inflammation by the interaction between diesel exhaust particles and the immune system. *J Allergy Clin Immunol*. 1998 Oct;102(4 Pt 1):539–54.
36. Xia T, Korge P, Weiss JN, Li N, Venkatesen MI, Sioutas C, et al. Quinones and aromatic chemical compounds in particulate matter induce mitochondrial dysfunction: implications for ultrafine particle toxicity. *Environ Health Perspect*. 2004 Oct;112(14):1347–58.
37. Li N, Xia T, Nel AE. The role of oxidative stress in ambient particulate matter-induced lung diseases and its implications in the toxicity of engineered nanoparticles. *Free Radic Biol Med*. 2008 May 1;44(9):1689–99.
38. Penning TM, Burczynski ME, Hung CF, McCoull KD, Palackal NT, Tsuruda LS. Dihydrodiol dehydrogenases and polycyclic aromatic hydrocarbon activation: generation of reactive and redox active o-quinones. *Chem Res Toxicol*. 1999 Jan;12(1):1–18.
39. Imrich A, Ning Y, Lawrence J, Coull B, Gitin E, Knutson M, et al. Alveolar macrophage cytokine response to air pollution particles: oxidant mechanisms. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007 Feb 1;218(3):256–64.
40. Prahalad AK, Soukup JM, Inmon J, Willis R, Ghio AJ, Becker S, et al. Ambient air particles: effects on cellular oxidant radical generation in relation to particulate elemental chemistry. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1999 Jul 15;158(2):81–91.
41. Li Y-J, Kawada T, Azuma A. Nrf2 is a protective factor against oxidative stresses induced by diesel exhaust particle in allergic asthma. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:323607.
42. Manzo ND, LaGier AJ, Slade R, Ledbetter AD, Richards JH, Dye JA. Nitric oxide and superoxide mediate diesel particle effects in cytokine-treated mice and murine lung epithelial cells--implications for susceptibility to traffic-related air pollution. *Part Fibre Toxicol*. 2012;9:43.
43. Xiao GG, Wang M, Li N, Loo JA, Nel AE. Use of proteomics to demonstrate a hierarchical oxidative stress response to diesel exhaust particle chemicals in a macrophage cell line. *J Biol Chem*. 2003 Dec 12;278(50):50781–90.
44. Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med*. 2009 Apr;30(1-2):42–59.

45. Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med*. 2001 Jun 1;30(11):1191–212.
46. Gilmour MI, Jaakkola MS, London SJ, Nel AE, Rogers CA. How exposure to environmental tobacco smoke, outdoor air pollutants, and increased pollen burdens influences the incidence of asthma. *Environ Health Perspect*. 2006 Apr;114(4):627–33.
47. Choi AM, Alam J. Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1996 Jul;15(1):9–19.
48. Kikuchi G, Yoshida T, Noguchi M. Heme oxygenase and heme degradation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Dec 9;338(1):558–67.
49. Tal TL, Bromberg PA, Kim Y, Samet JM. Epidermal growth factor receptor activation by diesel particles is mediated by tyrosine phosphatase inhibition. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008 Dec 15;233(3):382–8.
50. Raman M, Chen W, Cobb MH. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*. 2007 May 14;26(22):3100–12.
51. Silbajoris R, Ghio AJ, Samet JM, Jaskot R, Dreher KL, Brighton LE. In vivo and in vitro correlation of pulmonary MAP kinase activation following metallic exposure. *Inhal Toxicol*. 2000 Jun;12(6):453–68.
52. Wang M, Xiao GG, Li N, Xie Y, Loo JA, Nel AE. Use of a fluorescent phosphoprotein dye to characterize oxidative stress-induced signaling pathway components in macrophage and epithelial cultures exposed to diesel exhaust particle chemicals. *Electrophoresis*. 2005 Jun;26(11):2092–108.
53. Li N, Wang M, Oberley TD, Sempf JM, Nel AE. Comparison of the pro-oxidative and proinflammatory effects of organic diesel exhaust particle chemicals in bronchial epithelial cells and macrophages. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2002 Oct 15;169(8):4531–41.
54. Seriani R, Junqueira M de S, de Toledo AC, Martins MA, Seckler M, Alencar AM, et al. Diesel exhaust particulates affect cell signaling, mucin profiles, and apoptosis in trachea explants of Balb/C mice. *Environ Toxicol*. 2014 Apr 29;
55. Brown DM, Donaldson K, Borm PJ, Schins RP, Dehnhardt M, Gilmour P, et al. Calcium and ROS-mediated activation of transcription factors and TNF-alpha cytokine gene expression in macrophages exposed to ultrafine particles. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004 Feb;286(2):L344–53.
56. Tal TL, Simmons SO, Silbajoris R, Dailey L, Cho S-H, Ramabhadran R, et al. Differential transcriptional regulation of IL-8 expression by human airway epithelial cells exposed to diesel exhaust particles. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010 Feb 15;243(1):46–54.
57. Takizawa H, Ohtoshi T, Kawasaki S, Kohyama T, Desaki M, Kasama T, et al. Diesel exhaust particles induce NF-kappa B activation in human bronchial epithelial cells in vitro: importance in cytokine transcription. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1999 Apr 15;162(8):4705–11.

58. Shukla A, Timblin C, BeruBe K, Gordon T, McKinney W, Driscoll K, et al. Inhaled particulate matter causes expression of nuclear factor (NF)-kappaB-related genes and oxidant-dependent NF-kappaB activation in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000 Aug;23(2):182–7.
59. Pourazar J, Mudway IS, Samet JM, Helleday R, Blomberg A, Wilson SJ, et al. Diesel exhaust activates redox-sensitive transcription factors and kinases in human airways. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005 Nov;289(5):L724–30.
60. Takano H, Yanagisawa R, Ichinose T, Sadakane K, Yoshino S, Yoshikawa T, et al. Diesel exhaust particles enhance lung injury related to bacterial endotoxin through expression of proinflammatory cytokines, chemokines, and intercellular adhesion molecule-1. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 May 1;165(9):1329–35.
61. Mondal K, Stephen Haskill J, Becker S. Adhesion and pollution particle-induced oxidant generation is neither necessary nor sufficient for cytokine induction in human alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000 Feb;22(2):200–8.
62. Churg A, Xie C, Wang X, Vincent R, Wang RD. Air pollution particles activate NF-kappaB on contact with airway epithelial cell surfaces. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005 Oct 1;208(1):37–45.
63. Poland A, Glover E, Kende AS. Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase. *J Biol Chem*. 1976 Aug 25;251(16):4936–46.
64. Kawajiri K, Fujii-Kuriyama Y. Cytochrome P450 gene regulation and physiological functions mediated by the aryl hydrocarbon receptor. *Arch Biochem Biophys*. 2007 Aug 15;464(2):207–12.
65. Nebert DW, Dalton TP. The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2006 Dec;6(12):947–60.
66. Ebert B, Seidel A, Lampen A. Identification of BCRP as transporter of benzo[a]pyrene conjugates metabolically formed in Caco-2 cells and its induction by Ah-receptor agonists. *Carcinogenesis*. 2005 Oct;26(10):1754–63.
67. Barouki R, Coumoul X, Fernandez-Salguero PM. The aryl hydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein. *FEBS Lett*. 2007 Jul 31;581(19):3608–15.
68. Puga A, Ma C, Marlowe JL. The aryl hydrocarbon receptor cross-talks with multiple signal transduction pathways. *Biochem Pharmacol*. 2009 Feb 15;77(4):713–22.
69. Fernandez-Salguero P, Pineau T, Hilbert DM, McPhail T, Lee SS, Kimura S, et al. Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science*. 1995 May 5;268(5211):722–6.
70. Gonzalez FJ, Fernandez-Salguero P. The aryl hydrocarbon receptor: studies using the AHR-null mice. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem*. 1998 Dec;26(12):1194–8.
71. Marlowe JL, Puga A. Aryl hydrocarbon receptor, cell cycle regulation, toxicity, and tumorigenesis. *J Cell Biochem*. 2005 Dec 15;96(6):1174–84.
72. Barnett KR, Tomic D, Gupta RK, Babus JK, Roby KF, Terranova PF, et al. The aryl hydrocarbon receptor is required for normal gonadotropin responsiveness in the mouse ovary. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007 Aug 15;223(1):66–72.

73. Zaher H, Fernandez-Salguero PM, Letterio J, Sheikh MS, Fornace AJ, Roberts AB, et al. The involvement of aryl hydrocarbon receptor in the activation of transforming growth factor-beta and apoptosis. *Mol Pharmacol*. 1998 Aug;54(2):313–21.
74. Andreola F, Fernandez-Salguero PM, Chiantore MV, Petkovich MP, Gonzalez FJ, De Luca LM. Aryl hydrocarbon receptor knockout mice (AHR<sup>-/-</sup>) exhibit liver retinoid accumulation and reduced retinoic acid metabolism. *Cancer Res*. 1997 Jul 15;57(14):2835–8.
75. Schmidt JV, Su GH, Reddy JK, Simon MC, Bradfield CA. Characterization of a murine Ah<sup>r</sup> null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Jun 25;93(13):6731–6.
76. Stejskalova L, Dvorak Z, Pavek P. Endogenous and exogenous ligands of aryl hydrocarbon receptor: current state of art. *Curr Drug Metab*. 2011 Feb;12(2):198–212.
77. Kafafi SA, Afeefy HY, Ali AH, Said HK, Kafafi AG. Binding of polychlorinated biphenyls to the aryl hydrocarbon receptor. *Environ Health Perspect*. 1993 Oct;101(5):422–8.
78. DiNatale BC, Schroeder JC, Francey LJ, Kusnadi A, Perdew GH. Mechanistic Insights into the Events That Lead to Synergistic Induction of Interleukin 6 Transcription upon Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor and Inflammatory Signaling. *J Biol Chem*. 2010 Aug 6;285(32):24388–97.
79. Davarinos NA, Pollenz RS. Aryl hydrocarbon receptor imported into the nucleus following ligand binding is rapidly degraded via the cytoplasmic proteasome following nuclear export. *J Biol Chem*. 1999 Oct 1;274(40):28708–15.
80. Ma Q, Baldwin KT. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced degradation of aryl hydrocarbon receptor (AhR) by the ubiquitin-proteasome pathway. Role of the transcription activation and DNA binding of AhR. *J Biol Chem*. 2000 Mar 24;275(12):8432–8.
81. Pollenz RS. The mechanism of AH receptor protein down-regulation (degradation) and its impact on AH receptor-mediated gene regulation. *Chem Biol Interact*. 2002 Sep 20;141(1-2):41–61.
82. Mimura J, Ema M, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y. Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes Dev*. 1999 Jan 1;13(1):20–5.
83. Evans BR, Karchner SI, Allan LL, Pollenz RS, Tanguay RL, Jenny MJ, et al. Repression of aryl hydrocarbon receptor (AHR) signaling by AHR repressor: role of DNA binding and competition for AHR nuclear translocator. *Mol Pharmacol*. 2008 Feb;73(2):387–98.
84. Berghard A, Gradin K, Pongratz I, Whitelaw M, Poellinger L. Cross-coupling of signal transduction pathways: the dioxin receptor mediates induction of cytochrome P-450IA1 expression via a protein kinase C-dependent mechanism. *Mol Cell Biol*. 1993 Jan;13(1):677–89.
85. Pongratz I, Strömstedt PE, Mason GG, Poellinger L. Inhibition of the specific DNA binding activity of the dioxin receptor by phosphatase treatment. *J Biol Chem*. 1991 Sep 5;266(25):16813–7.
86. Blankenship A, Matsumura F. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced activation of a protein tyrosine kinase, pp60src, in murine hepatic cytosol using a cell-free system. *Mol Pharmacol*. 1997 Oct;52(4):667–75.

87. Chen S, Operaña T, Bonzo J, Nguyen N, Tukey RH. ERK kinase inhibition stabilizes the aryl hydrocarbon receptor: implications for transcriptional activation and protein degradation. *J Biol Chem*. 2005 Feb 11;280(6):4350–9.
88. Ikuta T, Kobayashi Y, Kawajiri K. Phosphorylation of nuclear localization signal inhibits the ligand-dependent nuclear import of aryl hydrocarbon receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Apr 30;317(2):545–50.
89. Lecureur V, Ferrec EL, N'diaye M, Vee ML, Gardyn C, Gilot D, et al. ERK-dependent induction of TNF $\alpha$  expression by the environmental contaminant benzo(a)pyrene in primary human macrophages. *FEBS Lett*. 2005 Mar 28;579(9):1904–10.
90. Monteiro P, Gilot D, Le Ferrec E, Rauch C, Lagadic-Gossman D, Fardel O. Dioxin-mediated up-regulation of aryl hydrocarbon receptor target genes is dependent on the calcium/calmodulin/CaMKI $\alpha$  pathway. *Mol Pharmacol*. 2008 Mar;73(3):769–77.
91. Nishiumi S, Yoshida M, Azuma T, Yoshida K-I, Ashida H. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin impairs an insulin signaling pathway through the induction of tumor necrosis factor- $\alpha$  in adipocytes. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol*. 2010 Jun;115(2):482–91.
92. Tan Z, Huang M, Puga A, Xia Y. A critical role for MAP kinases in the control of Ah receptor complex activity. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol*. 2004 Nov;82(1):80–7.
93. Moi P, Chan K, Asunis I, Cao A, Kan YW. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Oct 11;91(21):9926–30.
94. Osburn WO, Kensler TW. Nrf2 signaling: an adaptive response pathway for protection against environmental toxic insuLT. *Mutat Res*. 2008 Aug;659(1-2):31–9.
95. Brigelius-Flohé R, Flohé L. Basic principles and emerging concepts in the redox control of transcription factors. *Antioxid Redox Signal*. 2011 Oct 15;15(8):2335–81.
96. Chan K, Lu R, Chang JC, Kan YW. NRF2, a member of the NFE2 family of transcription factors, is not essential for murine erythropoiesis, growth, and development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Nov 26;93(24):13943–8.
97. Singh A, Ling G, Suhasini AN, Zhang P, Yamamoto M, Navas-Acien A, et al. Nrf2-dependent sulfiredoxin-1 expression protects against cigarette smoke-induced oxidative stress in lungs. *Free Radic Biol Med*. 2009 Feb 1;46(3):376–86.
98. Khor TO, Huang M-T, Kwon KH, Chan JY, Reddy BS, Kong A-N. Nrf2-deficient mice have an increased susceptibility to dextran sulfate sodium-induced colitis. *Cancer Res*. 2006 Dec 15;66(24):11580–4.
99. Chan K, Kan YW. Nrf2 is essential for protection against acute pulmonary injury in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Oct 26;96(22):12731–6.
100. Goldring CEP, Kitteringham NR, Elsbey R, Randle LE, Clement YN, Williams DP, et al. Activation of hepatic Nrf2 in vivo by acetaminophen in CD-1 mice. *Hepatology Baltim Md*. 2004 May;39(5):1267–76.

101. Kong X, Thimmulappa R, Craciun F, Harvey C, Singh A, Kombairaju P, et al. Enhancing Nrf2 pathway by disruption of Keap1 in myeloid leukocytes protects against sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011 Oct 15;184(8):928–38.
102. Thimmulappa RK, Lee H, Rangasamy T, Reddy SP, Yamamoto M, Kensler TW, et al. Nrf2 is a critical regulator of the innate immune response and survival during experimental sepsis. *J Clin Invest.* 2006 Apr;116(4):984–95.
103. Brüne B, Dehne N, Grossmann N, Jung M, Namgaladze D, Schmid T, et al. Redox Control of Inflammation in Macrophages. *Antioxid Redox Signal.* 2013 Aug 20;19(6):595–637.
104. Kwak M-K, Itoh K, Yamamoto M, Kensler TW. Enhanced expression of the transcription factor Nrf2 by cancer chemopreventive agents: role of antioxidant response element-like sequences in the nrf2 promoter. *Mol Cell Biol.* 2002 May;22(9):2883–92.
105. Rushworth SA, Zaitseva L, Murray MY, Shah NM, Bowles KM, MacEwan DJ. The high Nrf2 expression in human acute myeloid leukemia is driven by NF- $\kappa$ B and underlies its chemoresistance. *Blood.* 2012 Dec 20;120(26):5188–98.
106. Li N, Alam J, Venkatesan MI, Eiguren-Fernandez A, Schmitz D, Di Stefano E, et al. Nrf2 is a key transcription factor that regulates antioxidant defense in macrophages and epithelial cells: protecting against the proinflammatory and oxidizing effects of diesel exhaust chemicals. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2004 Sep 1;173(5):3467–81.
107. Jacob A, Hartz AM, Potin S, Coumoul X, Yousif S, Scherrmann J-M, et al. Aryl hydrocarbon receptor-dependent upregulation of Cyp1b1 by TCDD and diesel exhaust particles in rat brain microvessels. *Fluids Barriers CNS.* 2011;8:23.
108. Líbalová H, Krčková S, Uhlířová K, Milcová A, Schmuczerová J, Ciganek M, et al. Genotoxicity but not the AhR-mediated activity of PAHs is inhibited by other components of complex mixtures of ambient air pollutants. *Toxicol Lett.* 2014 Mar 21;225(3):350–7.
109. Pinkus R, Weiner LM, Daniel V. Role of quinone-mediated generation of hydroxyl radicals in the induction of glutathione S-transferase gene expression. *Biochemistry (Mosc).* 1995 Jan 10;34(1):81–8.
110. Rushmore TH, Morton MR, Pickett CB. The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *J Biol Chem.* 1991 Jun 25;266(18):11632–9.
111. Prochaska HJ, Talalay P. Regulatory mechanisms of monofunctional and bifunctional anticarcinogenic enzyme inducers in murine liver. *Cancer Res.* 1988 Sep 1;48(17):4776–82.
112. Cullinan SB, Diehl JA. Coordination of ER and oxidative stress signaling: the PERK/Nrf2 signaling pathway. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006 Mar;38(3):317–32.
113. Kelsen SG, Duan X, Ji R, Perez O, Liu C, Merali S. Cigarette smoke induces an unfolded protein response in the human lung: a proteomic approach. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2008 May;38(5):541–50.
114. Laing S, Wang G, Briazova T, Zhang C, Wang A, Zheng Z, et al. Airborne particulate matter selectively activates endoplasmic reticulum stress response in the lung and liver tissues. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2010 Oct;299(4):C736–49.

115. Digaleh H, Kiaei M, Khodaghali F. Nrf2 and Nrf1 signaling and ER stress crosstalk: implication for proteasomal degradation and autophagy. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2013 Dec;70(24):4681–94.
116. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Jul;8(7):519–29.
117. Lim SS, Vos T, Flaxman AD, Danaei G, Shibuya K, Adair-Rohani H, et al. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012 Dec 15;380(9859):2224–60.
118. Iwai K, Higuchi K, Udagawa T, Ohtomo K, Kawabata Y. Lung tumor induced by long-term inhalation or intratracheal instillation of diesel exhaust particles. *Exp Toxicol Pathol Off J Ges Für Toxikol Pathol*. 1997 Dec;49(5):393–401.
119. Mauderly JL, Jones RK, Griffith WC, Henderson RF, McClellan RO. Diesel Exhaust Is a Pulmonary Carcinogen in Rats Exposed Chronically by Inhalation. *Toxicol Sci*. 1987 Aug 1;9(2):208–21.
120. Laden F, Hart JE, Eschenroeder A, Smith TJ, Garshick E. Historical estimation of diesel exhaust exposure in a cohort study of U.S. railroad workers and lung cancer. *Cancer Causes Control CCC*. 2006 Sep;17(7):911–9.
121. Silverman DT, Samanic CM, Lubin JH, Blair AE, Stewart PA, Vermeulen R, et al. The Diesel Exhaust in Miners study: a nested case-control study of lung cancer and diesel exhaust. *J Natl Cancer Inst*. 2012 Jun 6;104(11):855–68.
122. Garshick E, Laden F, Hart JE, Davis ME, Eisen EA, Smith TJ. Lung cancer and elemental carbon exposure in trucking industry workers. *Environ Health Perspect*. 2012 Sep;120(9):1301–6.
123. Olsson AC, Gustavsson P, Kromhout H, Peters S, Vermeulen R, Brüske I, et al. Exposure to diesel motor exhaust and lung cancer risk in a pooled analysis from case-control studies in Europe and Canada. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Apr 1;183(7):941–8.
124. Arlt VM, Bieler CA, Mier W, Wiessler M, Schmeiser HH. DNA adduct formation by the ubiquitous environmental contaminant 3-nitrobenzanthrone in rats determined by (32)P-postlabeling. *Int J Cancer J Int Cancer*. 2001 Aug 1;93(3):450–4.
125. Godschalk RW, Moonen EJ, Schilderman PA, Broekmans WM, Kleinjans JC, Van Schooten FJ. Exposure-route-dependent DNA adduct formation by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Carcinogenesis*. 2000 Jan;21(1):87–92.
126. Dipple A, Peltonen K, Cheng SC, Ross H, Bigger CA. Chemical and mutagenic specificities of polycyclic aromatic hydrocarbon carcinogens. *Adv Exp Med Biol*. 1994;354:101–12.
127. Pfeifer GP, Denissenko MF, Olivier M, Tretyakova N, Hecht SS, Hainaut P. Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene*. 2002 Oct 21;21(48):7435–51.
128. Pfeifer GP, Hainaut P. On the origin of G --> T transversions in lung cancer. *Mutat Res*. 2003 May 15;526(1-2):39–43.

129. Bond JA, Mauderly JL, Wolff RK. Concentration- and time-dependent formation of DNA adducts in lungs of rats exposed to diesel exhaust. *Toxicology*. 1990 Jan;60(1-2):127-35.
130. Ichinose T, Yajima Y, Nagashima M, Takenoshita S, Nagamachi Y, Sagai M. Lung carcinogenesis and formation of 8-hydroxy-deoxyguanosine in mice by diesel exhaust particles. *Carcinogenesis*. 1997 Jan;18(1):185-92.
131. Iwai K, Adachi S, Takahashi M, Möller L, Udagawa T, Mizuno S, et al. Early oxidative DNA damages and late development of lung cancer in diesel exhaust-exposed rats. *Environ Res*. 2000 Nov;84(3):255-64.
132. Sato H, Sone H, Sagai M, Suzuki KT, Aoki Y. Increase in mutation frequency in lung of Big Blue rat by exposure to diesel exhaust. *Carcinogenesis*. 2000 Apr;21(4):653-61.
133. Vattanasit U, Navasumrit P, Khadka MB, Kanitwithayanun J, Promvijit J, Autrup H, et al. Oxidative DNA damage and inflammatory responses in cultured human cells and in humans exposed to traffic-related particles. *Int J Hyg Environ Health*. 2014 Jan;217(1):23-33.
134. Sørensen M, Autrup H, Hertel O, Wallin H, Knudsen LE, Loft S. Personal exposure to PM2.5 and biomarkers of DNA damage. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. 2003 Mar;12(3):191-6.
135. Donaldson K, Stone V, Clouter A, Renwick L, MacNee W. Ultrafine particles. *Occup Environ Med*. 2001 Mar;58(3):211-6, 199.
136. Knaapen AM, Borm PJA, Albrecht C, Schins RPF. Inhaled particles and lung cancer. Part A: Mechanisms. *Int J Cancer J Int Cancer*. 2004 May 10;109(6):799-809.
137. Driscoll KE, Carter JM, Howard BW, Hassenbein DG, Pepelko W, Baggs RB, et al. Pulmonary inflammatory, chemokine, and mutagenic responses in rats after subchronic inhalation of carbon black. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1996 Feb;136(2):372-80.
138. Driscoll KE, Deyo LC, Carter JM, Howard BW, Hassenbein DG, Bertram TA. Effects of particle exposure and particle-elicited inflammatory cells on mutation in rat alveolar epithelial cells. *Carcinogenesis*. 1997 Feb;18(2):423-30.
139. Künzli N, Tager IB. Air pollution: from lung to heart. *Swiss Med Wkly*. 2005 Dec 10;135(47-48):697-702.
140. Pope CA, Dockery DW. Health effects of fine particulate air pollution: lines that connect. *J Air Waste Manag Assoc* 1995. 2006 Jun;56(6):709-42.
141. Schwartz J, Zanobetti A. Using meta-smoothing to estimate dose-response trends across multiple studies, with application to air pollution and daily death. *Epidemiol Camb Mass*. 2000 Nov;11(6):666-72.
142. Inoue K, Takano H. Biology of diesel exhaust effects on allergic pulmonary inflammation. *Yakugaku Zasshi*. 2011 Mar;131(3):367-71.
143. Björkstén B. Environment and infant immunity. *Proc Nutr Soc*. 1999 Aug;58(3):729-32.
144. Dong CC, Yin XJ, Ma JYC, Millecchia L, Wu Z-X, Barger MW, et al. Effect of diesel exhaust particles on allergic reactions and airway responsiveness in ovalbumin-sensitized brown Norway rats. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol*. 2005 Nov;88(1):202-12.

145. Hao M, Comier S, Wang M, Lee JJ, Nel A. Diesel exhaust particles exert acute effects on airway inflammation and function in murine allergen provocation models. *J Allergy Clin Immunol*. 2003 Nov;112(5):905–14.
146. Boland S, Baeza-Squiban A, Fournier T, Houcine O, Gendron MC, Chévrier M, et al. Diesel exhaust particles are taken up by human airway epithelial cells in vitro and alter cytokine production. *Am J Physiol*. 1999 Apr;276(4 Pt 1):L604–13.
147. Samet JM, Dominici F, Curriero FC, Coursac I, Zeger SL. Fine particulate air pollution and mortality in 20 U.S. cities, 1987-1994. *N Engl J Med*. 2000 Dec 14;343(24):1742–9.
148. Lambrecht BN, Hammad H. Asthma: the importance of dysregulated barrier immunity. *Eur J Immunol*. 2013 Dec;43(12):3125–37.
149. WHO | The global burden of disease: 2004 update [Internet]. WHO. [cited 2014 Dec 30]. Available from: [http://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/2004\\_report\\_update/en/](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/2004_report_update/en/)
150. Hart JE, Laden F, Eisen EA, Smith TJ, Garshick E. Chronic obstructive pulmonary disease mortality in railroad workers. *Occup Environ Med*. 2009 Apr;66(4):221–6.
151. Hnizdo E, Sullivan PA, Bang KM, Wagner G. Association between chronic obstructive pulmonary disease and employment by industry and occupation in the US population: a study of data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Epidemiol*. 2002 Oct 15;156(8):738–46.
152. Weinmann S, Vollmer WM, Breen V, Heumann M, Hnizdo E, Villnave J, et al. COPD and occupational exposures: a case-control study. *J Occup Environ Med Am Coll Occup Environ Med*. 2008 May;50(5):561–9.
153. Rückerl R, Ibald-Mulli A, Koenig W, Schneider A, Woelke G, Cyrys J, et al. Air pollution and markers of inflammation and coagulation in patients with coronary heart disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 Feb 15;173(4):432–41.
154. Pekkanen J, Peters A, Hoek G, Tiittanen P, Brunekreef B, de Hartog J, et al. Particulate air pollution and risk of ST-segment depression during repeated submaximal exercise tests among subjects with coronary heart disease: the Exposure and Risk Assessment for Fine and Ultrafine Particles in Ambient Air (ULTRA) study. *Circulation*. 2002 Aug 20;106(8):933–8.
155. Peters A. Particulate matter and heart disease: evidence from epidemiological studies. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005 Sep 1;207(2 Suppl):477–82.
156. Peters A, Dockery DW, Muller JE, Mittleman MA. Increased particulate air pollution and the triggering of myocardial infarction. *Circulation*. 2001 Jun 12;103(23):2810–5.
157. Von Klot S, Peters A, Aalto P, Bellander T, Berglind N, D'Ippoliti D, et al. Ambient air pollution is associated with increased risk of hospital cardiac readmissions of myocardial infarction survivors in five European cities. *Circulation*. 2005 Nov 15;112(20):3073–9.
158. Zanobetti A, Schwartz J. The effect of particulate air pollution on emergency admissions for myocardial infarction: a multicity case-crossover analysis. *Environ Health Perspect*. 2005 Aug;113(8):978–82.

159. Bouthillier L, Vincent R, Goegan P, Adamson IY, Bjarnason S, Stewart M, et al. Acute effects of inhaled urban particles and ozone: lung morphology, macrophage activity, and plasma endothelin-1. *Am J Pathol.* 1998 Dec;153(6):1873–84.
160. Vincent R, Kumarathasan P, Goegan P, Bjarnason SG, Guénette J, Bérubé D, et al. Inhalation toxicology of urban ambient particulate matter: acute cardiovascular effects in rats. *Res Rep Health Eff Inst.* 2001 Oct;(104):5–54; discussion 55–62.
161. Adar SD, Sheppard L, Vedal S, Polak JF, Sampson PD, Diez Roux AV, et al. Fine particulate air pollution and the progression of carotid intima-medial thickness: a prospective cohort study from the multi-ethnic study of atherosclerosis and air pollution. *PLoS Med.* 2013;10(4):e1001430.
162. Hoffmann B, Moebus S, Möhlenkamp S, Stang A, Lehmann N, Dragano N, et al. Residential exposure to traffic is associated with coronary atherosclerosis. *Circulation.* 2007 Jul 31;116(5):489–96.
163. Künzli N, Jerrett M, Garcia-Esteban R, Basagaña X, Beckermann B, Gilliland F, et al. Ambient air pollution and the progression of atherosclerosis in adult. *PLoS One.* 2010;5(2):e9096.
164. Rivera M, Basagaña X, Aguilera I, Foraster M, Agis D, de Groot E, et al. Association between long-term exposure to traffic-related air pollution and subclinical atherosclerosis: the REGICOR study. *Environ Health Perspect.* 2013 Feb;121(2):223–30.
165. Araujo JA, Barajas B, Kleinman M, Wang X, Bennett BJ, Gong KW, et al. Ambient particulate pollutants in the ultrafine range promote early atherosclerosis and systemic oxidative stress. *Circ Res.* 2008 Mar 14;102(5):589–96.
166. Bai N, van Eeden SF. Systemic and vascular effects of circulating diesel exhaust particulate matter. *Inhal Toxicol.* 2013 Nov;25(13):725–34.
167. Bai N, Kido T, Suzuki H, Yang G, Kavanagh TJ, Kaufman JD, et al. Changes in atherosclerotic plaques induced by inhalation of diesel exhaust. *Atherosclerosis.* 2011 Jun;216(2):299–306.
168. Campen MJ, Lund AK, Knuckles TL, Conklin DJ, Bishop B, Young D, et al. Inhaled diesel emissions alter atherosclerotic plaque composition in ApoE(-/-) mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2010 Feb 1;242(3):310–7.
169. Nemmar A, Dhanasekaran S, Yasin J, Ba-Omar H, Fahim MA, Kazzam EE, et al. Evaluation of the direct systemic and cardiopulmonary effects of diesel particles in spontaneously hypertensive rats. *Toxicology.* 2009 Jul 28;262(1):50–6.
170. Shimada A, Kawamura N, Okajima M, Kaewamatawong T, Inoue H, Morita T. Translocation pathway of the intratracheally instilled ultrafine particles from the lung into the blood circulation in the mouse. *Toxicol Pathol.* 2006;34(7):949–57.
171. Brook RD. Cardiovascular effects of air pollution. *Clin Sci Lond Engl* 1979. 2008 Sep;115(6):175–87.
172. Seaton A, MacNee W, Donaldson K, Godden D. Particulate air pollution and acute health effects. *Lancet.* 1995 Jan 21;345(8943):176–8.
173. Vermeylen J, Nemmar A, Nemery B, Hoylaerts MF. Ambient air pollution and acute myocardial infarction. *J Thromb Haemost JTH.* 2005 Sep;3(9):1955–61.

174. Ciencewicki J, Gowdy K, Krantz QT, Linak WP, Brighton L, Gilmour MI, et al. Diesel exhaust enhanced susceptibility to influenza infection is associated with decreased surfactant protein expression. *Inhal Toxicol*. 2007 Nov;19(14):1121–33.
175. Hiramatsu K, Saito Y, Sakakibara K, Azuma A, Takizawa H, Sugawara I. The effects of inhalation of diesel exhaust on murine mycobacterial infection. *Exp Lung Res*. 2005 May;31(4):405–15.
176. Jaspers I, Ciencewicki JM, Zhang W, Brighton LE, Carson JL, Beck MA, et al. Diesel Exhaust Enhances Influenza Virus Infections in Respiratory Epithelial Cells. *Toxicol Sci*. 2005 Jun 1;85(2):990–1002.
177. Pope CA. Respiratory disease associated with community air pollution and a steel mill, Utah Valley. *Am J Public Health*. 1989 May;79(5):623–8.
178. Sarkar S, Song Y, Sarkar S, Kipen HM, Laumbach RJ, Zhang J, et al. Suppression of the NF- $\kappa$ B pathway by diesel exhaust particles impairs human antimycobacterial immunity. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2012 Mar 15;188(6):2778–93.
179. Castranova V, Ma JY, Yang HM, Antonini JM, Butterworth L, Barger MW, et al. Effect of exposure to diesel exhaust particles on the susceptibility of the lung to infection. *Environ Health Perspect*. 2001 Aug;109 Suppl 4:609–12.
180. Ghio AJ. Particle exposures and infections. *Infection*. 2014 Jun;42(3):459–67.
181. Brandt EB, Kovacic MB, Lee GB, Gibson AM, Acciani TH, Le Cras TD, et al. Diesel exhaust particle induction of IL-17A contributes to severe asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 Nov;132(5):1194–204.e2.
182. Liu J, Ballaney M, Al-alem Umaima, Quan C, Jin X, Perera F, et al. Combined inhaled diesel exhaust particles and allergen exposure alter methylation of T helper genes and IgE production in vivo. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol*. 2008 Mar;102(1):76–81.
183. Mamessier E, Nieves A, Vervloet D, Magnan A. Diesel exhaust particles enhance T-cell activation in severe asthmatics. *Allergy*. 2006 May;61(5):581–8.
184. Ohtani T, Nakagawa S, Kurosawa M, Mizuashi M, Ozawa M, Aiba S. Cellular basis of the role of diesel exhaust particles in inducing Th2-dominant response. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2005 Feb 15;174(4):2412–9.
185. Diaz-Sanchez D, Dotson AR, Takenaka H, Saxon A. Diesel exhaust particles induce local IgE production in vivo and alter the pattern of IgE messenger RNA isoforms. *J Clin Invest*. 1994 Oct;94(4):1417–25.
186. Fujimaki H, Nohara O, Ichinose T, Watanabe N, Saito S. IL-4 production in mediastinal lymph node cells in mice intratracheally instilled with diesel exhaust particulates and antigen. *Toxicology*. 1994 Sep 6;92(1-3):261–8.
187. Muranaka M, Suzuki S, Koizumi K, Takafuji S, Miyamoto T, Ikemori R, et al. Adjuvant activity of diesel-exhaust particulates for the production of IgE antibody in mice. *J Allergy Clin Immunol*. 1986 Apr;77(4):616–23.
188. Sasaki Y, Ohtani T, Ito Y, Mizuashi M, Nakagawa S, Furukawa T, et al. Molecular events in human T cells treated with diesel exhaust particles or formaldehyde that underlie their

- diminished interferon-gamma and interleukin-10 production. *Int Arch Allergy Immunol*. 2009;148(3):239–50.
189. Cosmi L, Liotta F, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. Th17 cells: new players in asthma pathogenesis. *Allergy*. 2011 Aug;66(8):989–98.
  190. Iwakura Y, Ishigame H, Saijo S, Nakae S. Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity*. 2011 Feb 25;34(2):149–62.
  191. Li N, Harkema JR, Lewandowski RP, Wang M, Bramble LA, Gookin GR, et al. Ambient ultrafine particles provide a strong adjuvant effect in the secondary immune response: implication for traffic-related asthma flares. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2010 Sep;299(3):L374–83.
  192. Saunders V, Breyse P, Clark J, Sproles A, Davila M, Wills-Karp M. Particulate matter-induced airway hyperresponsiveness is lymphocyte dependent. *Environ Health Perspect*. 2010 May;118(5):640–6.
  193. Van Voorhis M, Knopp S, Julliard W, Fechner JH, Zhang X, Schauer JJ, et al. Exposure to atmospheric particulate matter enhances Th17 polarization through the aryl hydrocarbon receptor. *PloS One*. 2013;8(12):e82545.
  194. Fujimaki H, Ui N, Ushio H, Nohara K, Endo T. Roles of CD4+ and CD8+ T cells in adjuvant activity of diesel exhaust particles in mice. *Int Arch Allergy Immunol*. 2001 Apr;124(4):485–96.
  195. Holt PG, Schon-Hegrad MA, Oliver J, Holt BJ, McMenemy PG. A contiguous network of dendritic antigen-presenting cells within the respiratory epithelium. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1990;91(2):155–9.
  196. Pulendran B, Banchereau J, Maraskovsky E, Maliszewski C. Modulating the immune response with dendritic cells and their growth factors. *Trends Immunol*. 2001 Jan;22(1):41–7.
  197. Diaz-Sanchez D, Garcia MP, Wang M, Jyrala M, Saxon A. Nasal challenge with diesel exhaust particles can induce sensitization to a neoallergen in the human mucosa. *J Allergy Clin Immunol*. 1999 Dec;104(6):1183–8.
  198. Hammad H, Lambrecht BN. Recent progress in the biology of airway dendritic cells and implications for understanding the regulation of asthmatic inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2006 Aug;118(2):331–6.
  199. Provoost S, Maes T, Willart MAM, Joos GF, Lambrecht BN, Tournoy KG. Diesel exhaust particles stimulate adaptive immunity by acting on pulmonary dendritic cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2010 Jan 1;184(1):426–32.
  200. Provoost S, Maes T, Joos GF, Tournoy KG. Monocyte-derived dendritic cell recruitment and allergic T(H)2 responses after exposure to diesel particles are CCR2 dependent. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 Feb;129(2):483–91.
  201. Bleck B, Tse DB, Jaspers I, Curotto de Lafaille MA, Reibman J. Diesel exhaust particle-exposed human bronchial epithelial cells induce dendritic cell maturation. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2006 Jun 15;176(12):7431–7.

202. Verstraelen S, Van Den Heuvel R, Nelissen I, Witters H, Verheyen G, Schoeters G. Flow cytometric characterisation of antigen presenting dendritic cells after in vitro exposure to diesel exhaust particles. *Toxicol Vitro* 2005 Oct;19(7):903–7.
203. Porter M, Karp M, Killedar S, Bauer SM, Guo J, Williams D, et al. Diesel-enriched particulate matter functionally activates human dendritic cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007 Dec;37(6):706–19.
204. Williams MA, Porter M, Horton M, Guo J, Roman J, Williams D, et al. Ambient particulate matter directs nonclassical dendritic cell activation and a mixed TH1/TH2-like cytokine response by naive CD4+ T cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 Feb;119(2):488–97.
205. Chan RC-F, Wang M, Li N, Yanagawa Y, Onoé K, Lee JJ, et al. Pro-oxidative diesel exhaust particle chemicals inhibit LPS-induced dendritic cell responses involved in T-helper differentiation. *J Allergy Clin Immunol*. 2006 Aug;118(2):455–65.
206. Taront S, Dieudonné A, Blanchard S, Jeannin P, Lassalle P, Delneste Y, et al. Implication of scavenger receptors in the interactions between diesel exhaust particles and immature or mature dendritic cells. *Part Fibre Toxicol*. 2009;6:9.
207. Bleck B, Tse DB, Curotto de Lafaille MA, Zhang F, Reibman J. Diesel exhaust particle-exposed human bronchial epithelial cells induce dendritic cell maturation and polarization via thymic stromal lymphopoietin. *J Clin Immunol*. 2008 Mar;28(2):147–56.
208. Diaz-Sanchez D, Penichet-Garcia M, Saxon A. Diesel exhaust particles directly induce activated mast cells to degranulate and increase histamine levels and symptom severity. *J Allergy Clin Immunol*. 2000 Dec;106(6):1140–6.
209. Devouassoux G, Saxon A, Metcalfe DD, Prussin C, Colomb MG, Brambilla C, et al. Chemical constituents of diesel exhaust particles induce IL-4 production and histamine release by human basophils. *J Allergy Clin Immunol*. 2002 May;109(5):847–53.
210. Hahon N, Castranova V. Interferon production in rat type II pneumocytes and alveolar macrophages. *Exp Lung Res*. 1989 May;15(3):429–45.
211. Johnston RB, Godzik CA, Cohn ZA. Increased superoxide anion production by immunologically activated and chemically elicited macrophages. *J Exp Med*. 1978 Jul 1;148(1):115–27.
212. Williams DM, Magee DM, Bonewald LF, Smith JG, Bleicker CA, Byrne GI, et al. A role in vivo for tumor necrosis factor alpha in host defense against *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun*. 1990 Jun;58(6):1572–6.
213. Pope CA, Dockery DW, Spengler JD, Raizenne ME. Respiratory health and PM10 pollution. A daily time series analysis. *Am Rev Respir Dis*. 1991 Sep;144(3 Pt 1):668–74.
214. Lundborg M, Dahlén S-E, Johard U, Gerde P, Jarstrand C, Camner P, et al. Aggregates of ultrafine particles impair phagocytosis of microorganisms by human alveolar macrophages. *Environ Res*. 2006 Feb;100(2):197–204.
215. Yin XJ, Dong CC, Ma JYC, Roberts JR, Antonini JM, Ma JKH. Suppression of phagocytic and bactericidal functions of rat alveolar macrophages by the organic component of diesel exhaust particles. *J Toxicol Environ Health A*. 2007 May 15;70(10):820–8.

216. Zhou H, Kobzik L. Effect of concentrated ambient particles on macrophage phagocytosis and killing of *Streptococcus pneumoniae*. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007 Apr;36(4):460–5.
217. Möller W, Hofer T, Ziesenis A, Karg E, Heyder J. Ultrafine particles cause cytoskeletal dysfunctions in macrophages. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2002 Aug 1;182(3):197–207.
218. Becker S, Soukup JM. Decreased CD11b expression, phagocytosis, and oxidative burst in urban particulate pollution-exposed human monocytes and alveolar macrophages. *J Toxicol Environ Health A*. 1998 Dec 11;55(7):455–77.
219. Chaudhuri N, Jary H, Lea S, Khan N, Piddock KC, Dockrell DH, et al. Diesel exhaust particle exposure in vitro alters monocyte differentiation and function. *PLoS One*. 2012;7(12):e51107.
220. Van Eeden SF, Tan WC, Suwa T, Mukae H, Terashima T, Fujii T, et al. Cytokines involved in the systemic inflammatory response induced by exposure to particulate matter air pollutants (PM<sub>10</sub>). *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Sep 1;164(5):826–30.
221. Ishii H, Fujii T, Hogg JC, Hayashi S, Mukae H, Vincent R, et al. Contribution of IL-1 beta and TNF-alpha to the initiation of the peripheral lung response to atmospheric particulates (PM<sub>10</sub>). *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004 Jul;287(1):L176–83.
222. Shoenfelt J, Mitkus RJ, Zeisler R, Spatz RO, Powell J, Fenton MJ, et al. Involvement of TLR2 and TLR4 in inflammatory immune responses induced by fine and coarse ambient air particulate matter. *J Leukoc Biol*. 2009 Aug;86(2):303–12.
223. Becker S, Soukup JM, Sioutas C, Cassee FR. Response of human alveolar macrophages to ultrafine, fine, and coarse urban air pollution particles. *Exp Lung Res*. 2003 Feb;29(1):29–44.
224. Becker S, Dailey L, Soukup JM, Silbajoris R, Devlin RB. TLR-2 is involved in airway epithelial cell response to air pollution particles. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005 Feb 15;203(1):45–52.
225. Becher R, Bucht A, Øvrevik J, Hongslo JK, Dahlman HJ, Samuelson JT, et al. Involvement of NADPH oxidase and iNOS in rodent pulmonary cytokine responses to urban air and mineral particles. *Inhal Toxicol*. 2007 Jun;19(8):645–55.
226. Amakawa K, Terashima T, Matsuzaki T, Matsumaru A, Sagai M, Yamaguchi K. Suppressing effects of diesel exhaust particles on cytokine release from human and murine alveolar macrophages. *Exp Lung Res*. 2003 May;29(3):149–64.
227. Becker S, Mundandhara S, Devlin RB, Madden M. Regulation of cytokine production in human alveolar macrophages and airway epithelial cells in response to ambient air pollution particles: further mechanistic studies. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005 Sep 1;207(2 Suppl):269–75.
228. Mundandhara SD, Becker S, Madden MC. Effects of diesel exhaust particles on human alveolar macrophage ability to secrete inflammatory mediators in response to lipopolysaccharide. *Toxicol Vitro* 2006 Aug;20(5):614–24.
229. Fujii T, Hayashi S, Hogg JC, Mukae H, Suwa T, Goto Y, et al. Interaction of alveolar macrophages and airway epithelial cells following exposure to particulate matter produces mediators that stimulate the bone marrow. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002 Jul;27(1):34–41.

230. Goto Y, Ishii H, Hogg JC, Shih C-H, Yatera K, Vincent R, et al. Particulate matter air pollution stimulates monocyte release from the bone marrow. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004 Oct 15;170(8):891–7.
231. Goto Y, Hogg JC, Shih C-H, Ishii H, Vincent R, van Eeden SF. Exposure to ambient particles accelerates monocyte release from bone marrow in atherosclerotic rabbits. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004 Jul;287(1):L79–85.
232. Ishii H, Hayashi S, Hogg JC, Fujii T, Goto Y, Sakamoto N, et al. Alveolar macrophage-epithelial cell interaction following exposure to atmospheric particles induces the release of mediators involved in monocyte mobilization and recruitment. *Respir Res*. 2005;6:87.
233. Van Grevenynghe J, Rion S, Le Ferrec E, Le Vee M, Amiot L, Fauchet R, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit differentiation of human monocytes into macrophages. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2003 Mar 1;170(5):2374–81.
234. Podechard N, Lecureur V, Le Ferrec E, Guenon I, Sparfel L, Gilot D, et al. Interleukin-8 induction by the environmental contaminant benzo(a)pyrene is aryl hydrocarbon receptor-dependent and leads to lung inflammation. *Toxicol Lett*. 2008 Mar 15;177(2):130–7.
235. Podechard N, Le Ferrec E, Rebillard A, Fardel O, Lecureur V. NPC1 repression contributes to lipid accumulation in human macrophages exposed to environmental aryl hydrocarbons. *Cardiovasc Res*. 2009 May 1;82(2):361–70.
236. Rao X, Zhong J, Maiseyeu A, Gopalakrishnan B, Villamena FA, Chen L-C, et al. CD36-dependent 7-ketocholesterol accumulation in macrophages mediates progression of atherosclerosis in response to chronic air pollution exposure. *Circ Res*. 2014 Oct 10;115(9):770–80.
237. Mechnikov II. Immunity in infective diseases. By Il'ia Il'ich Mechnikov, 1905. *Rev Infect Dis*. 1988 Feb;10(1):223–7.
238. Herbolmel P, Thisse B, Thisse C. Ontogeny and behaviour of early macrophages in the zebrafish embryo. *Dev Camb Engl*. 1999 Sep;126(17):3735–45.
239. Williams MJ. Drosophila hemopoiesis and cellular immunity. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2007 Apr 15;178(8):4711–6.
240. Cecchini MG, Dominguez MG, Mocchi S, Wetterwald A, Felix R, Fleisch H, et al. Role of colony stimulating factor-1 in the establishment and regulation of tissue macrophages during postnatal development of the mouse. *Dev Camb Engl*. 1994 Jun;120(6):1357–72.
241. Dai X-M, Ryan GR, Hapel AJ, Dominguez MG, Russell RG, Kapp S, et al. Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. *Blood*. 2002 Jan 1;99(1):111–20.
242. Wiktor-Jedrzejczak W, Gordon S. Cytokine regulation of the macrophage (M phi) system studied using the colony stimulating factor-1-deficient op/op mouse. *Physiol Rev*. 1996 Oct;76(4):927–47.
243. Combadière C, Potteaux S, Rodero M, Simon T, Pezard A, Esposito B, et al. Combined inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 abrogates Ly6C(hi) and Ly6C(lo) monocytosis and

- almost abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Circulation*. 2008 Apr 1;117(13):1649–57.
244. Saederup N, Chan L, Lira SA, Charo IF. Fractalkine deficiency markedly reduces macrophage accumulation and atherosclerotic lesion formation in CCR2<sup>-/-</sup> mice: evidence for independent chemokine functions in atherogenesis. *Circulation*. 2008 Apr 1;117(13):1642–8.
245. Ebert RH, Florey HW. The Extravascular Development of the Monocyte Observed In vivo. *Br J Exp Pathol*. 1939 Aug;20(4):342–56.
246. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*. 2003 Jan;3(1):23–35.
247. Akiyama Y, Miller PJ, Thurman GB, Neubauer RH, Oliver C, Favilla T, et al. Characterization of a human blood monocyte subset with low peroxidase activity. *J Clin Invest*. 1983 Sep;72(3):1093–105.
248. Elias JA, Chien P, Gustilo KM, Schreiber AD. Differential interleukin-1 elaboration by density-defined human monocyte subpopulations. *Blood*. 1985 Aug;66(2):298–301.
249. Figdor CG, Bont WS, Touw I, de Roos J, Roosnek EE, de Vries JE. Isolation of functionally different human monocytes by counterflow centrifugation elutriation. *Blood*. 1982 Jul;60(1):46–53.
250. Yasaka T, Mantich NM, Boxer LA, Baehner RL. Functions of human monocyte and lymphocyte subsets obtained by countercurrent centrifugal elutriation: differing functional capacities of human monocyte subsets. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1981 Oct;127(4):1515–8.
251. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*. 2003 Jul;19(1):71–82.
252. Weber C, Belge KU, von Hundelshausen P, Draude G, Steppich B, Mack M, et al. Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations. *J Leukoc Biol*. 2000 May;67(5):699–704.
253. Ziegler-Heitbrock HW, Ströbel M, Kieper D, Fingerle G, Schlunck T, Petersmann I, et al. Differential expression of cytokines in human blood monocyte subpopulations. *Blood*. 1992 Jan 15;79(2):503–11.
254. Hoeve MA, Nash AA, Jackson D, Randall RE, Dransfield I. Influenza virus A infection of human monocyte and macrophage subpopulations reveals increased susceptibility associated with cell differentiation. *PloS One*. 2012;7(1):e29443.
255. Belge K-U, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B, et al. The proinflammatory CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>DR<sup>++</sup> monocytes are a major source of TNF. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2002 Apr 1;168(7):3536–42.
256. Mizuno K, Toma T, Tsukiji H, Okamoto H, Yamazaki H, Ohta K, et al. Selective expansion of CD16<sup>high</sup>CCR2<sup>-</sup> subpopulation of circulating monocytes with preferential production of haem oxygenase (HO)-1 in response to acute inflammation. *Clin Exp Immunol*. 2005 Dec;142(3):461–70.
257. Horelt A, Belge K-U, Steppich B, Prinz J, Ziegler-Heitbrock L. The CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes in erysipelas are expanded and show reduced cytokine production. *Eur J Immunol*. 2002 May;32(5):1319–27.

258. Grage-Griebenow E, Flad HD, Ernst M, Bzowska M, Skrzeczyńska J, Pryjma J. Human MO subsets as defined by expression of CD64 and CD16 differ in phagocytic activity and generation of oxygen intermediates. *Immunobiology*. 2000 May;202(1):42–50.
259. Fingerle-Rowson G, Auers J, Kreuzer E, Fraunberger P, Blumenstein M, Ziegler-Heitbrock LH. Expansion of CD14+CD16+ monocytes in critically ill cardiac surgery patients. *Inflammation*. 1998 Aug;22(4):367–79.
260. Hume DA, Ross IL, Himes SR, Sasmono RT, Wells CA, Ravasi T. The mononuclear phagocyte system revisited. *J Leukoc Biol*. 2002 Oct;72(4):621–7.
261. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:669–92.
262. Nguyen KD, Qiu Y, Cui X, Goh YPS, Mwangi J, David T, et al. Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. *Nature*. 2011 Dec 1;480(7375):104–8.
263. Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Goforth MH, Morel CR, Subramanian V, Mukundan L, et al. Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature*. 2007 Jun 28;447(7148):1116–20.
264. Pollard JW. Trophic macrophages in development and disease. *Nat Rev Immunol*. 2009 Apr;9(4):259–70.
265. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*. 2010 Nov 5;330(6005):841–5.
266. Hoeffel G, Wang Y, Greter M, See P, Teo P, Malleret B, et al. Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. *J Exp Med*. 2012 Jun 4;209(6):1167–81.
267. Kennedy DW, Abkowitz JL. Kinetics of central nervous system microglial and macrophage engraftment: analysis using a transgenic bone marrow transplantation model. *Blood*. 1997 Aug 1;90(3):986–93.
268. Kennedy DW, Abkowitz JL. Mature monocytic cells enter tissues and engraft. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Dec 8;95(25):14944–9.
269. Jenkins SJ, Ruckerl D, Cook PC, Jones LH, Finkelman FD, van Rooijen N, et al. Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. *Science*. 2011 Jun 10;332(6035):1284–8.
270. Burgess AW, Metcalf D. The nature and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factors. *Blood*. 1980 Dec;56(6):947–58.
271. Fleetwood AJ, Lawrence T, Hamilton JA, Cook AD. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2007 Apr 15;178(8):5245–52.

272. Lacey DC, Achuthan A, Fleetwood AJ, Dinh H, Roiniotis J, Scholz GM, et al. Defining GM-CSF- and macrophage-CSF-dependent macrophage responses by in vitro models. *J Immunol Baltim Md* 1950. 2012 Jun 1;188(11):5752–65.
273. Hamilton JA. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol*. 2008 Jul;8(7):533–44.
274. Akagawa KS. Functional heterogeneity of colony-stimulating factor-induced human monocyte-derived macrophages. *Int J Hematol*. 2002 Jul;76(1):27–34.
275. Wiktor-Jedrzejczak W, Urbanowska E, Aukerman SL, Pollard JW, Stanley ER, Ralph P, et al. Correction by CSF-1 of defects in the osteopetrotic op/op mouse suggests local, developmental, and humoral requirements for this growth factor. *Exp Hematol*. 1991 Nov;19(10):1049–54.
276. Paine R, Morris SB, Jin H, Wilcoxon SE, Phare SM, Moore BB, et al. Impaired functional activity of alveolar macrophages from GM-CSF-deficient mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001 Nov;281(5):L1210–8.
277. Stanley E, Lieschke GJ, Grail D, Metcalf D, Hodgson G, Gall JA, et al. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-deficient mice show no major perturbation of hematopoiesis but develop a characteristic pulmonary pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Jun 7;91(12):5592–6.
278. Phillips WA, Hamilton JA. Colony stimulating factor-1 is a negative regulator of the macrophage respiratory burst. *J Cell Physiol*. 1990 Aug;144(2):190–6.
279. Willman CL, Stewart CC, Miller V, Yi TL, Tomasi TB. Regulation of MHC class II gene expression in macrophages by hematopoietic colony-stimulating factors (CSF). Induction by granulocyte/macrophage CSF and inhibition by CSF-1. *J Exp Med*. 1989 Nov 1;170(5):1559–67.
280. Verreck FAW, de Boer T, Langenberg DML, Hoeve MA, Kramer M, Vaisberg E, et al. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar 30;101(13):4560–5.
281. Crozat K, Guiton R, Guilliams M, Henri S, Baranek T, Schwartz-Cornil I, et al. Comparative genomics as a tool to reveal functional equivalences between human and mouse dendritic cell subsets. *Immunol Rev*. 2010 Mar;234(1):177–98.
282. Robbins SH, Walzer T, Dembélé D, Thibault C, Defays A, Bessou G, et al. Novel insights into the relationships between dendritic cell subsets in human and mouse revealed by genome-wide expression profiling. *Genome Biol*. 2008;9(1):R17.
283. Masurier C, Pioche-Durieu C, Colombo BM, Lacave R, Lemoine FM, Klatzmann D, et al. Immunophenotypical and functional heterogeneity of dendritic cells generated from murine bone marrow cultured with different cytokine combinations: implications for anti-tumoral cell therapy. *Immunology*. 1999 Apr;96(4):569–77.
284. Mills KHG. TLR-dependent T cell activation in autoimmunity. *Nat Rev Immunol*. 2011 Dec;11(12):807–22.
285. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*. 2010 May;11(5):373–84.

286. Akashi-Takamura S, Miyake K. TLR accessory molecules. *Curr Opin Immunol*. 2008 Aug;20(4):420–5.
287. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006 Feb 24;124(4):783–801.
288. Kagan JC, Medzhitov R. Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. *Cell*. 2006 Jun 2;125(5):943–55.
289. Kagan JC, Su T, Horng T, Chow A, Akira S, Medzhitov R. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat Immunol*. 2008 Apr;9(4):361–8.
290. Rowe DC, McGettrick AF, Latz E, MoNK BG, Gay NJ, Yamamoto M, et al. The myristoylation of TRIF-related adaptor molecule is essential for Toll-like receptor 4 signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Apr 18;103(16):6299–304.
291. Matsushita K, Takeuchi O, Standley DM, Kumagai Y, Kawagoe T, Miyake T, et al. Zc3h12a is an RNase essential for controlling immune responses by regulating mRNA decay. *Nature*. 2009 Apr 30;458(7242):1185–90.
292. McGreal EP, Miller JL, Gordon S. Ligand recognition by antigen-presenting cell C-type lectin receptors. *Curr Opin Immunol*. 2005 Feb;17(1):18–24.
293. Martinez-Pomares L. The mannose receptor. *J Leukoc Biol*. 2012 Dec;92(6):1177–86.
294. McGreal EP, Martinez-Pomares L, Gordon S. Divergent roles for C-type lectins expressed by cells of the innate immune system. *Mol Immunol*. 2004 Nov;41(11):1109–21.
295. Prigozy TI, Sieling PA, Clemens D, Stewart PL, Behar SM, Porcelli SA, et al. The mannose receptor delivers lipoglycan antigens to endosomes for presentation to T cells by CD1b molecules. *Immunity*. 1997 Feb;6(2):187–97.
296. Canton J, Neculai D, Grinstein S. Scavenger receptors in homeostasis and immunity. *Nat Rev Immunol*. 2013 Sep;13(9):621–34.
297. Moore KJ, Freeman MW. Scavenger Receptors in Atherosclerosis Beyond Lipid Uptake. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006 Aug 1;26(8):1702–11.
298. Yu H, Ha T, Liu L, Wang X, Gao M, Kelley J, et al. Scavenger receptor A (SR-A) is required for LPS-induced TLR4 mediated NF- $\kappa$ B activation in macrophages. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Jul;1823(7):1192–8.
299. Todt JC, Hu B, Curtis JL. The scavenger receptor SR-A I/II (CD204) signals via the receptor tyrosine kinase MERTK during apoptotic cell uptake by murine macrophages. *J Leukoc Biol*. 2008 Aug;84(2):510–8.
300. Stewart CR, Stuart LM, Wilkinson K, van Gils JM, Deng J, Halle A, et al. CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat Immunol*. 2010 Feb;11(2):155–61.
301. Erdman LK, Cosio G, Helmers AJ, Gowda DC, Grinstein S, Kain KC. CD36 and TLR interactions in inflammation and phagocytosis: implications for malaria. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2009 Nov 15;183(10):6452–9.

302. Swanson JA, Baer SC. Phagocytosis by zippers and triggers. *Trends Cell Biol.* 1995 Mar;5(3):89–93.
303. Karavitis J, Kovacs EJ. Macrophage phagocytosis: effects of environmental pollutants, alcohol, cigarette smoke, and other external factors. *J Leukoc Biol.* 2011 Dec;90(6):1065–78.
304. Underhill DM, Goodridge HS. Information processing during phagocytosis. *Nat Rev Immunol.* 2012 Jul;12(7):492–502.
305. Niedergang F, Chavrier P. Signaling and membrane dynamics during phagocytosis: many roads lead to the phagos(R)ome. *Curr Opin Cell Biol.* 2004 Aug;16(4):422–8.
306. Jaumouillé V, Grinstein S. Receptor mobility, the cytoskeleton, and particle binding during phagocytosis. *Curr Opin Cell Biol.* 2011 Feb;23(1):22–9.
307. Johansson A, Dahlgren C. Differentiation of human peripheral blood monocytes to macrophages is associated with changes in the cellular respiratory burst activity. *Cell Biochem Funct.* 1992 Jun;10(2):87–93.
308. Moulian N, Truffault F, Gaudry-Talarmain YM, Serraf A, Berrih-Aknin S. In vivo and in vitro apoptosis of human thymocytes are associated with nitrotyrosine formation. *Blood.* 2001 Jun 1;97(11):3521–30.
309. Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 2003 Feb;3(2):133–46.
310. Hamza T, Barnett JB, Li B. Interleukin 12 a key immunoregulatory cytokine in infection applications. *Int J Mol Sci.* 2010;11(3):789–806.
311. Hayes MP, Murphy FJ, Burd PR. Interferon-gamma-dependent inducible expression of the human interleukin-12 p35 gene in monocytes initiates from a TATA-containing promoter distinct from the CpG-rich promoter active in Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cells. *Blood.* 1998 Jun 15;91(12):4645–51.
312. Ma X, Chow JM, Gri G, Carra G, Gerosa F, Wolf SF, et al. The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon gamma in monocytic cells. *J Exp Med.* 1996 Jan 1;183(1):147–57.
313. Striz I, Brabcova E, Kolesar L, Sekerkova A. Cytokine networking of innate immunity cells: a potential target of therapy. *Clin Sci Lond Engl 1979.* 2014 May;126(9):593–612.
314. Korn T, Bettelli E, Gao W, Awasthi A, Jäger A, Strom TB, et al. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature.* 2007 Jul 26;448(7152):484–7.
315. Kojima H, Inoue T, Kunimoto H, Nakajima K. IL-6-STAT3 signaling and premature senescence. *JAK-STAT.* 2013 Oct 1;2(4):e25763.
316. Savan R, Ravichandran S, Collins JR, Sakai M, Young HA. Structural conservation of interferon gamma among vertebrates. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009 Apr;20(2):115–24.
317. Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu Rev Immunol.* 2011;29:71–109.

318. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 2004 Dec;25(12):677–86.
319. Slight SR, Khader SA. Chemokines shape the immune responses to tuberculosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2013 Apr;24(2):105–13.
320. Gales D, Clark C, Manne U, Samuel T. The Chemokine CXCL8 in Carcinogenesis and Drug Response. *ISRN Oncol.* 2013;2013:859154.
321. Calatayud M, Gimeno-Alcañiz JV, Vélez D, Devesa V. Trivalent arsenic species induce changes in expression and levels of proinflammatory cytokines in intestinal epithelial cells. *Toxicol Lett.* 2014 Jan 3;224(1):40–6.
322. Mantovani A, Gray PA, Van Damme J, Sozzani S. Macrophage-derived chemokine (MDC). *J Leukoc Biol.* 2000 Sep;68(3):400–4.
323. Saeki H, Tamaki K. Thymus and activation regulated chemokine (TARC)/CCL17 and skin diseases. *J Dermatol Sci.* 2006 Aug;43(2):75–84.
324. Bonecchi R, Sozzani S, Stine JT, Luini W, D'Amico G, Allavena P, et al. Divergent effects of interleukin-4 and interferon-gamma on macrophage-derived chemokine production: an amplification circuit of polarized T helper 2 responses. *Blood.* 1998 Oct 15;92(8):2668–71.
325. Nomura T, Terada N, Kim WJ, Nakano K, Fukuda Y, Wakita A, et al. Interleukin-13 induces thymus and activation-regulated chemokine (CCL17) in human peripheral blood mononuclear cells. *Cytokine.* 2002 Oct 21;20(2):49–55.
326. Wirnsberger G, Hebenstreit D, Posselt G, Horejs-Hoeck J, Duschl A. IL-4 induces expression of TARC/CCL17 via two STAT6 binding sites. *Eur J Immunol.* 2006 Jul;36(7):1882–91.
327. Kakinuma T, Nakamura K, Wakugawa M, Mitsui H, Tada Y, Saeki H, et al. Thymus and activation-regulated chemokine in atopic dermatitis: Serum thymus and activation-regulated chemokine level is closely related with disease activity. *J Allergy Clin Immunol.* 2001 Mar;107(3):535–41.
328. Sekiya T, Yamada H, Yamaguchi M, Yamamoto K, Ishii A, Yoshie O, et al. Increased levels of a TH2-type CC chemokine thymus and activation-regulated chemokine (TARC) in serum and induced sputum of asthmatics. *Allergy.* 2002 Feb;57(2):173–7.
329. Tsiopoulos A, Chang Y, Ait Yahia S, de Nadai P, Chenivresse C. Role of CCL18 in asthma and lung immunity. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol.* 2013 Jul;43(7):716–22.
330. Joshi AD, Oak SR, Hartigan AJ, Finn WG, Kunkel SL, Duffy KE, et al. Interleukin-33 contributes to both M1 and M2 chemokine marker expression in human macrophages. *BMC Immunol.* 2010;11:52.
331. Mantovani A, Sica A, Locati M. New vistas on macrophage differentiation and activation. *Eur J Immunol.* 2007 Jan;37(1):14–6.
332. Mackaness GB. Cellular resistance to infection. *J Exp Med.* 1962 Sep 1;116:381–406.

333. Nathan CF, Murray HW, Wiebe ME, Rubin BY. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J Exp Med*. 1983 Sep 1;158(3):670–89.
334. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. 2008 Dec;8(12):958–69.
335. Dale DC, Boxer L, Liles WC. The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood*. 2008 Aug 15;112(4):935–45.
336. Hu X, Chen J, Wang L, Ivashkiv LB. Crosstalk among Jak-STAT, Toll-like receptor, and ITAM-dependent pathways in macrophage activation. *J Leukoc Biol*. 2007 Aug;82(2):237–43.
337. Schroder K, Sweet MJ, Hume DA. Signal integration between IFN $\gamma$  and TLR signalling pathways in macrophages. *Immunobiology*. 2006;211(6-8):511–24.
338. Held TK, Weihua X, Yuan L, Kalvakolanu DV, Cross AS. Gamma interferon augments macrophage activation by lipopolysaccharide by two distinct mechanisms, at the signal transduction level and via an autocrine mechanism involving tumor necrosis factor alpha and interleukin-1. *Infect Immun*. 1999 Jan;67(1):206–12.
339. De Wit H, Hoogstraten D, Halie RM, Vellenga E. Interferon-gamma modulates the lipopolysaccharide-induced expression of AP-1 and NF-kappa B at the mRNA and protein level in human monocytes. *Exp Hematol*. 1996 Feb;24(2):228–35.
340. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime Rep*. 2014;6:13.
341. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med*. 2005 Jan 17;201(2):233–40.
342. Kolls JK, Lindén A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity*. 2004 Oct;21(4):467–76.
343. Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2006 Nov 15;177(10):7303–11.
344. Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med*. 1992 Jul 1;176(1):287–92.
345. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol*. 2010 Oct;11(10):889–96.
346. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci J Virtual Libr*. 2008;13:453–61.
347. Varin A, Gordon S. Alternative activation of macrophages: immune function and cellular biology. *Immunobiology*. 2009;214(7):630–41.

348. Kurowska-Stolarska M, Stolarski B, Kewin P, Murphy G, Corrigan CJ, Ying S, et al. IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. *J Immunol Baltim Md* 1950. 2009 Nov 15;183(10):6469–77.
349. Heller NM, Qi X, Junttila IS, Shirey KA, Vogel SN, Paul WE, et al. Type I IL-4Rs selectively activate IRS-2 to induce target gene expression in macrophages. *Sci Signal*. 2008;1(51):ra17.
350. LaPorte SL, Juo ZS, Vaclavikova J, Colf LA, Qi X, Heller NM, et al. Molecular and structural basis of cytokine receptor pleiotropy in the interleukin-4/13 system. *Cell*. 2008 Jan 25;132(2):259–72.
351. Edwards JP, Zhang X, Frauwirth KA, Mosser DM. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J Leukoc Biol*. 2006 Dec;80(6):1298–307.
352. Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:451–83.
353. Kodelja V, Müller C, Politz O, Hakij N, Orfanos CE, Goerdts S. Alternative macrophage activation-associated CC-chemokine-1, a novel structural homologue of macrophage inflammatory protein-1 alpha with a Th2-associated expression pattern. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1998 Feb 1;160(3):1411–8.
354. Andrew DP, Chang MS, McNinch J, Wathen ST, Rihaneck M, Tseng J, et al. STCP-1 (MDC) CC chemokine acts specifically on chronically activated Th2 lymphocytes and is produced by monocytes on stimulation with Th2 cytokines IL-4 and IL-13. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1998 Nov 1;161(9):5027–38.
355. Cordeiro-da-Silva A, Tavares J, Araújo N, Cerqueira F, Tomás A, Kong Thoo Lin P, et al. Immunological alterations induced by polyamine derivatives on murine splenocytes and human mononuclear cells. *Int Immunopharmacol*. 2004 Apr;4(4):547–56.
356. Willment JA, Lin H-H, Reid DM, Taylor PR, Williams DL, Wong SYC, et al. Dectin-1 expression and function are enhanced on alternatively activated and GM-CSF-treated macrophages and are negatively regulated by IL-10, dexamethasone, and lipopolysaccharide. *J Immunol Baltim Md* 1950. 2003 Nov 1;171(9):4569–73.
357. Raes G, Brys L, Dahal BK, Brandt J, Grooten J, Brombacher F, et al. Macrophage galactose-type C-type lectins as novel markers for alternatively activated macrophages elicited by parasitic infections and allergic airway inflammation. *J Leukoc Biol*. 2005 Mar;77(3):321–7.
358. Ichii S, Imai Y, Irimura T. Initial steps in lymph node metastasis formation in an experimental system: possible involvement of recognition by macrophage C-type lectins. *Cancer Immunol Immunother CII*. 2000 Apr;49(1):1–9.
359. Gratchev A, Kzhyshkowska J, Utikal J, Goerdts S. Interleukin-4 and dexamethasone counterregulate extracellular matrix remodelling and phagocytosis in type-2 macrophages. *Scand J Immunol*. 2005 Jan;61(1):10–7.
360. Wirth JJ, Kierszenbaum F, Zlotnik A. Effects of IL-4 on macrophage functions: increased uptake and killing of a protozoan parasite (*Trypanosoma cruzi*). *Immunology*. 1989 Feb;66(2):296–301.

361. Varin A, Mukhopadhyay S, Herbein G, Gordon S. Alternative activation of macrophages by IL-4 impairs phagocytosis of pathogens but potentiates microbial-induced signalling and cytokine secretion. *Blood*. 2010 Jan 14;115(2):353–62.
362. Krausgruber T, Blazek K, Smallie T, Alzabin S, Lockstone H, Sahgal N, et al. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nat Immunol*. 2011 Mar;12(3):231–8.
363. Lawrence T, Natoli G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat Rev Immunol*. 2011 Nov;11(11):750–61.
364. Foster SL, Hargreaves DC, Medzhitov R. Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature*. 2007 Jun 21;447(7147):972–8.
365. Biswas SK, Lopez-Collazo E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol*. 2009 Oct;30(10):475–87.
366. Hagemann T, Lawrence T, McNeish I, Charles KA, Kulbe H, Thompson RG, et al. “Re-educating” tumor-associated macrophages by targeting NF-kappaB. *J Exp Med*. 2008 Jun 9;205(6):1261–8.
367. Kawanishi N, Yano H, Yokogawa Y, Suzuki K. Exercise training inhibits inflammation in adipose tissue via both suppression of macrophage infiltration and acceleration of phenotypic switching from M1 to M2 macrophages in high-fat-diet-induced obese mice. *Exerc Immunol Rev*. 2010;16:105–18.
368. Mylonas KJ, Nair MG, Prieto-Lafuente L, Paape D, Allen JE. Alternatively activated macrophages elicited by helminth infection can be reprogrammed to enable microbial killing. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2009 Mar 1;182(5):3084–94.
369. Rutschman R, Lang R, Hesse M, Ihle JN, Wynn TA, Murray PJ. Cutting edge: Stat6-dependent substrate depletion regulates nitric oxide production. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2001 Feb 15;166(4):2173–7.
370. Stout RD, Jiang C, Matta B, Tietzel I, Watkins SK, Suttles J. Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2005 Jul 1;175(1):342–9.
371. Gratchev A, Kzhyshkowska J, Köthe K, Muller-Molinet I, Kannookadan S, Utikal J, et al. Mphi1 and Mphi2 can be re-polarized by Th2 or Th1 cytokines, respectively, and respond to exogenous danger signals. *Immunobiology*. 2006;211(6-8):473–86.
372. Xu W, Zhao X, Daha MR, van Kooten C. Reversible differentiation of pro- and anti-inflammatory macrophages. *Mol Immunol*. 2013 Mar;53(3):179–86.
373. Wynn TA. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nat Rev Immunol*. 2004 Aug;4(8):583–94.
374. Galdiero MR, Bonavita E, Barajon I, Garlanda C, Mantovani A, Jaillon S. Tumor associated macrophages and neutrophils in cancer. *Immunobiology*. 2013 Nov;218(11):1402–10.
375. Kadl A, Meher AK, Sharma PR, Lee MY, Doran AC, Johnstone SR, et al. Identification of a novel macrophage phenotype that develops in response to atherogenic phospholipids via Nrf2. *Circ Res*. 2010 Sep 17;107(6):737–46.

376. Jaguin M, Houlbert N, Fardel O, Lecreur V. Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. *Cell Immunol.* 2013 Jan;281(1):51–61.
377. Kittan NA, Allen RM, Dhaliwal A, Cavassani KA, Schaller M, Gallagher KA, et al. Cytokine induced phenotypic and epigenetic signatures are key to establishing specific macrophage phenotypes. *PloS One.* 2013;8(10):e78045.
378. Vogel DYS, Glim JE, Stavenuiter AWD, Breur M, Heijnen P, Amor S, et al. Human macrophage polarization in vitro: maturation and activation methods compared. *Immunobiology.* 2014 Sep;219(9):695–703.
379. Ambarus CA, Krausz S, van Eijk M, Hamann J, Radstake TRDJ, Reedquist KA, et al. Systematic validation of specific phenotypic markers for in vitro polarized human macrophages. *J Immunol Methods.* 2012 Jan 31;375(1-2):196–206.
380. Edin S, Wikberg ML, Rutegård J, Oldenborg P-A, Palmqvist R. Phenotypic skewing of macrophages in vitro by secreted factors from colorectal cancer cells. *PloS One.* 2013;8(9):e74982.
381. Verreck FAW, de Boer T, Langenberg DML, van der Zanden L, Ottenhoff THM. Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN-gamma- and CD40L-mediated costimulation. *J Leukoc Biol.* 2006 Feb;79(2):285–93.
382. Fleetwood AJ, Dinh H, Cook AD, Hertzog PJ, Hamilton JA. GM-CSF- and M-CSF-dependent macrophage phenotypes display differential dependence on type I interferon signaling. *J Leukoc Biol.* 2009 Aug;86(2):411–21.
383. Kazawa T, Kawasaki T, Sakamoto A, Imamura M, Ohashi R, Jiang S, et al. Expression of liver X receptor alpha and lipid metabolism in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced human monocyte-derived macrophage. *Pathol Int.* 2009 Mar;59(3):152–60.
384. Hashimoto S, Suzuki T, Dong HY, Yamazaki N, Matsushima K. Serial analysis of gene expression in human monocytes and macrophages. *Blood.* 1999 Aug 1;94(3):837–44.
385. Laoui D, Van Overmeire E, De Baetselier P, Van Ginderachter JA, Raes G. Functional Relationship between Tumor-Associated Macrophages and Macrophage Colony-Stimulating Factor as Contributors to Cancer Progression. *Front Immunol.* 2014;5:489.
386. McDermott RS, Deneux L, Mosseri V, Védrenne J, Clough K, Fourquet A, et al. Circulating macrophage colony stimulating factor as a marker of tumour progression. *Eur Cytokine Netw.* 2002 Mar;13(1):121–7.
387. Mills CD. M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease. *Crit Rev Immunol.* 2012;32(6):463–88.
388. Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature.* 2013 Apr 25;496(7446):445–55.
389. Araujo-Pires AC, Vieira AE, Francisconi CF, Bigueti CC, Glowacki A, Yoshizawa S, et al. IL-4/CCL22/CCR4 Axis Controls Regulatory T Cell Migration That Suppress Inflammatory Bone Loss in Murine Experimental Periodontitis. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* 2014 Sep 28;

390. Chenivesse C, Chang Y, Azzaoui I, Ait Yahia S, Morales O, Plé C, et al. Pulmonary CCL18 recruits human regulatory T cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2012 Jul 1;189(1):128–37.
391. Satoh T, Takeuchi O, Vandenbon A, Yasuda K, Tanaka Y, Kumagai Y, et al. The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection. *Nat Immunol*. 2010 Oct;11(10):936–44.
392. De Santa F, Totaro MG, Prosperini E, Notarbartolo S, Testa G, Natoli G. The histone H3 lysine-27 demethylase Jmjd3 links inflammation to inhibition of polycomb-mediated gene silencing. *Cell*. 2007 Sep 21;130(6):1083–94.
393. Lehtonen A, Veckman V, Nikula T, Lahesmaa R, Kinnunen L, Matikainen S, et al. Differential expression of IFN regulatory factor 4 gene in human monocyte-derived dendritic cells and macrophages. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2005 Nov 15;175(10):6570–9.
394. Mullins DW, Martins RS, Elgert KD. Tumor-derived cytokines dysregulate macrophage interferon-gamma responsiveness and interferon regulatory factor-8 expression. *Exp Biol Med* Maywood NJ. 2003 Mar;228(3):270–7.
395. Wang IM, Contursi C, Masumi A, Ma X, Trinchieri G, Ozato K. An IFN-gamma-inducible transcription factor, IFN consensus sequence binding protein (ICSBP), stimulates IL-12 p40 expression in macrophages. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2000 Jul 1;165(1):271–9.
396. Date D, Das R, Narla G, Simon DI, Jain MK, Mahabeleshwar GH. Kruppel-like transcription factor 6 regulates inflammatory macrophage polarization. *J Biol Chem*. 2014 Apr 11;289(15):10318–29.
397. Bouhrel MA, Derudas B, Rigamonti E, Dièvert R, Brozek J, Haulon S, et al. PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metab*. 2007 Aug;6(2):137–43.
398. Chawla A. Control of macrophage activation and function by PPARs. *Circ Res*. 2010 May 28;106(10):1559–69.
399. Liao X, Sharma N, Kapadia F, Zhou G, Lu Y, Hong H, et al. Krüppel-like factor 4 regulates macrophage polarization. *J Clin Invest*. 2011 Jul;121(7):2736–49.
400. Ginhoux F, Jung S. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol*. 2014 Jun;14(6):392–404.
401. Sieweke MH, Allen JE. Beyond stem cells: self-renewal of differentiated macrophages. *Science*. 2013 Nov 22;342(6161):1242974.
402. Murray PJ, Wynn TA. Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. *J Leukoc Biol*. 2011 Apr;89(4):557–63.
403. Chroneos Z, Shepherd VL. Differential regulation of the mannose and SP-A receptors on macrophages. *Am J Physiol*. 1995 Dec;269(6 Pt 1):L721–6.
404. Fairbairn L, Kapetanovic R, Sester DP, Hume DA. The mononuclear phagocyte system of the pig as a model for understanding human innate immunity and disease. *J Leukoc Biol*. 2011 Jun;89(6):855–71.

405. Martinez FO, Helming L, Milde R, Varin A, Melgert BN, Draijer C, et al. Genetic programs expressed in resting and IL-4 alternatively activated mouse and human macrophages: similarities and differences. *Blood*. 2013 Feb 28;121(9):e57–69.
406. Schroder K, Irvine KM, Taylor MS, Bokil NJ, Le Cao K-A, Masterman K-A, et al. Conservation and divergence in Toll-like receptor 4-regulated gene expression in primary human versus mouse macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Apr 17;109(16):E944–53.
407. Xue J, Schmidt SV, Sander J, Draffehn A, Krebs W, Quester I, et al. Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. *Immunity*. 2014 Feb 20;40(2):274–88.
408. Ivashkiv LB. Epigenetic regulation of macrophage polarization and function. *Trends Immunol*. 2013 May;34(5):216–23.
409. Porta C, Rimoldi M, Raes G, Brys L, Ghezzi P, Di Liberto D, et al. Tolerance and M2 (alternative) macrophage polarization are related processes orchestrated by p50 nuclear factor kappaB. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Sep 1;106(35):14978–83.
410. Ghio AJ, Smith CB, Madden MC. Diesel exhaust particles and airway inflammation. *Curr Opin Pulm Med*. 2012 Mar;18(2):144–50.
411. Miller MR, Shaw CA, Langrish JP. From particles to patients: oxidative stress and the cardiovascular effects of air pollution. *Future Cardiol*. 2012 Jul;8(4):577–602.
412. N'Diaye M, Le Ferrec E, Lagadic-Gossmann D, Corre S, Gilot D, Lecureur V, et al. Aryl hydrocarbon receptor- and calcium-dependent induction of the chemokine CCL1 by the environmental contaminant benzo[a]pyrene. *J Biol Chem*. 2006 Jul 21;281(29):19906–15.
413. Pinel-Marie M-L, Sparfel L, Desmots S, Fardel O. Aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of the NADPH oxidase subunit NCF1/p47 phox expression leading to priming of human macrophage oxidative burst. *Free Radic Biol Med*. 2009 Sep 15;47(6):825–34.
414. Miyata R, van Eeden SF. The innate and adaptive immune response induced by alveolar macrophages exposed to ambient particulate matter. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2011 Dec 1;257(2):209–26.
415. Sawyer K, Mundandhara S, Ghio AJ, Madden MC. The effects of ambient particulate matter on human alveolar macrophage oxidative and inflammatory responses. *J Toxicol Environ Health A*. 2010;73(1):41–57.
416. Vogel CFA, Sciallo E, Wong P, Kuzmicky P, Kado N, Matsumura F. Induction of proinflammatory cytokines and C-reactive protein in human macrophage cell line U937 exposed to air pollution particulates. *Environ Health Perspect*. 2005 Nov;113(11):1536–41.
417. Fardel O. Cytokines as molecular targets for aryl hydrocarbon receptor ligands: implications for toxicity and xenobiotic detoxification. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2013 Feb;9(2):141–52.
418. Nguyen NT, Hanieh H, Nakahama T, Kishimoto T. The roles of aryl hydrocarbon receptor in immune responses. *Int Immunol*. 2013 Jun;25(6):335–43.

419. Li N, Nel AE. Role of the Nrf2-mediated signaling pathway as a negative regulator of inflammation: implications for the impact of particulate pollutants on asthma. *Antioxid Redox Signal*. 2006 Feb;8(1-2):88–98.
420. Braun A, Bewersdorff M, Lintelmann J, Matuschek G, Jakob T, Göttlicher M, et al. Differential impact of diesel particle composition on pro-allergic dendritic cell function. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol*. 2010 Jan;113(1):85–94.
421. Shaykhiev R, Krause A, Salit J, Strulovici-Barel Y, Harvey B-G, O'Connor TP, et al. Smoking-dependent reprogramming of alveolar macrophage polarization: implication for pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2009 Aug 15;183(4):2867–83.
422. 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. *PloS One*. 2014;9(9):e107063.
423. Sun YV, Boverhof DR, Burgoon LD, Fielden MR, Zacharewski TR. Comparative analysis of dioxin response elements in human, mouse and rat genomic sequences. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(15):4512–23.
424. Wruck CJ, Streetz K, Pavic G, Götz ME, Tohidnezhad M, Brandenburg L-O, et al. Nrf2 Induces Interleukin-6 (IL-6) Expression via an Antioxidant Response Element within the IL-6 Promoter. *J Biol Chem*. 2011 Feb 11;286(6):4493–9.
425. Vogel CFA, Sciallo E, Matsumura F. Involvement of RelB in aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of chemokines. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Nov 23;363(3):722–6.
426. Kimura A, Naka T, Nakahama T, Chinen I, Masuda K, Nohara K, et al. Aryl hydrocarbon receptor in combination with Stat1 regulates LPS-induced inflammatory responses. *J Exp Med*. 2009 Aug 31;206(9):2027–35.
427. Masuda K, Kimura A, Hanieh H, Nguyen NT, Nakahama T, Chinen I, et al. Aryl hydrocarbon receptor negatively regulates LPS-induced IL-6 production through suppression of histamine production in macrophages. *Int Immunol*. 2011 Oct;23(10):637–45.
428. Kollert F, Probst C, Müller-Quernheim J, Zissel G, Prasse A. CCL18 production is decreased in alveolar macrophages from cigarette smokers. *Inflammation*. 2009 Jun;32(3):163–8.
429. Sharabi AB, Aldrich M, Sasic D, Olson EN, Friedman AD, Lee S-H, et al. Twist-2 controls myeloid lineage development and function. *PLoS Biol*. 2008 Dec 16;6(12):e316.
430. Merindol N, Riquet A, Szablewski V, Eliaou J-F, Puisieux A, Bonnefoy N. The emerging role of Twist proteins in hematopoietic cells and hematological malignancies. *Blood Cancer J*. 2014;4:e206.
431. Kim K-H, Jeong J-Y, Surh Y-J, Kim K-W. Expression of stress-response ATF3 is mediated by Nrf2 in astrocytes. *Nucleic Acids Res*. 2010 Jan;38(1):48–59.
432. Gilchrist M, Thorsson V, Li B, Rust AG, Korb M, Roach JC, et al. Systems biology approaches identify ATF3 as a negative regulator of Toll-like receptor 4. *Nature*. 2006 May 11;441(7090):173–8.

433. Hoetzenecker W, Echtenacher B, Guenova E, Hoetzenecker K, Woelbing F, Brück J, et al. ROS-induced ATF3 causes susceptibility to secondary infections during sepsis-associated immunosuppression. *Nat Med*. 2012 Jan;18(1):128–34.
434. Verheyen GR, Nuijten J-M, Van Hummelen P, Schoeters GR. Microarray analysis of the effect of diesel exhaust particles on in vitro cultured macrophages. *Toxicol Vitro* 2004 Jun;18(3):377–91.
435. Hu J-P, Nishishita K, Sakai E, Yoshida H, Kato Y, Tsukuba T, et al. Berberine inhibits RANKL-induced osteoclast formation and survival through suppressing the NF-kappaB and Akt pathways. *Eur J Pharmacol*. 2008 Feb 2;580(1-2):70–9.
436. Kim K-W, Ha K-T, Park C-S, Jin U-H, Chang HW, Lee I-S, et al. Polygonum cuspidatum, compared with baicalin and berberine, inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 gene expressions in RAW 264.7 macrophages. *Vascul Pharmacol*. 2007 Sep;47(2-3):99–107.
437. Peairs A, Radjavi A, Davis S, Li L, Ahmed A, Giri S, et al. Activation of AMPK inhibits inflammation in MRL/lpr mouse mesangial cells. *Clin Exp Immunol*. 2009 Jun;156(3):542–51.
438. Mo C, Wang L, Zhang J, Numazawa S, Tang H, Tang X, et al. The crosstalk between Nrf2 and AMPK signal pathways is important for the anti-inflammatory effect of berberine in LPS-stimulated macrophages and endotoxin-shocked mice. *Antioxid Redox Signal*. 2014 Feb 1;20(4):574–88.
439. Podechard N, Tekpli X, Catheline D, Holme JA, Rioux V, Legrand P, et al. Mechanisms involved in lipid accumulation and apoptosis induced by 1-nitropyrene in Hepa1c1c7 cells. *Toxicol Lett*. 2011 Oct 30;206(3):289–99.
440. Turner N, Li J-Y, Gosby A, To SWC, Cheng Z, Miyoshi H, et al. Berberine and its more biologically available derivative, dihydroberberine, inhibit mitochondrial respiratory complex I: a mechanism for the action of berberine to activate AMP-activated protein kinase and improve insulin action. *Diabetes*. 2008 May;57(5):1414–8.
441. Brooks AC, Guo Y, Singh M, McCracken J, Xuan Y-T, Srivastava S, et al. Endoplasmic reticulum stress-dependent activation of ATF3 mediates the late phase of ischemic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol*. 2014 Nov;76:138–47.
442. Jang M-K, Jung MH. ATF3 represses PPAR $\gamma$  expression and inhibits adipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Oct 14;454(1):58–64.
443. Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev*. 2008 May 15;22(10):1276–312.
444. Noskovičová N, Petřek M, Eickelberg O, Heinzelmann K. PDGF Signaling in the Lung - From Lung Development and Disease to Clinical Studies. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2014 Oct 10;
445. Trojanowska M. Role of PDGF in fibrotic diseases and systemic sclerosis. *Rheumatol Oxf Engl*. 2008 Oct;47 Suppl 5:v2–4.
446. Sydbom A, Blomberg A, Parnia S, Stenfors N, Sandström T, Dahlén SE. Health effects of diesel exhaust emissions. *Eur Respir J*. 2001 Apr;17(4):733–46.

447. Demoulin J-B, Essaghir A. PDGF receptor signaling networks in normal and cancer cells. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2014 Jun;25(3):273–83.
448. Johansson KA, Vittinghoff E, Lee K, Balmes JR, Ji W, Kaplan GG, et al. Acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis associated with air pollution exposure. *Eur Respir J.* 2014 Apr 1;43(4):1124–31.
449. Bonner JC, Rice AB, Lindroos PM, O'Brien PO, Dreher KL, Rosas I, et al. Induction of the lung myofibroblast PDGF receptor system by urban ambient particles from Mexico City. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1998 Oct;19(4):672–80.
450. Lindroos PM, Coin PG, Badgett A, Morgan DL, Bonner JC. Alveolar macrophages stimulated with titanium dioxide, chrysotile asbestos, and residual oil fly ash upregulate the PDGF receptor- $\alpha$  on lung fibroblasts through an IL-1 $\beta$ -dependent mechanism. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1997 Mar;16(3):283–92.
451. Yamashita N, Sekine K, Miyasaka T, Kawashima R, Nakajima Y, Nakano J, et al. Platelet-derived growth factor is involved in the augmentation of airway responsiveness through remodeling of airways in diesel exhaust particulate-treated mice. *J Allergy Clin Immunol.* 2001 Jan;107(1):135–42.
452. Fredriksson L, Li H, Eriksson U. The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004 Aug;15(4):197–204.
453. Bonner JC. Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004 Aug;15(4):255–73.
454. Heeneman S, Haendeler J, Saito Y, Ishida M, Berk BC. Angiotensin II induces transactivation of two different populations of the platelet-derived growth factor beta receptor. Key role for the p66 adaptor protein Shc. *J Biol Chem.* 2000 May 26;275(21):15926–32.
455. Gill RS, Hsiung MS, Sum CS, Lavine N, Clark SD, Van Tol HHM. The dopamine D4 receptor activates intracellular platelet-derived growth factor receptor beta to stimulate ERK1/2. *Cell Signal.* 2010 Feb;22(2):285–90.
456. Siegbahn A, Johnell M, Nordin A, Aberg M, Velling T. TF/FVIIa transactivate PDGFRbeta to regulate PDGF-BB-induced chemotaxis in different cell types: involvement of Src and PLC. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008 Jan;28(1):135–41.
457. Ball SG, Shuttleworth CA, Kielty CM. Vascular endothelial growth factor can signal through platelet-derived growth factor receptors. *J Cell Biol.* 2007 May 7;177(3):489–500.
458. Pennock S, Kazlauskas A. Vascular endothelial growth factor A competitively inhibits platelet-derived growth factor (PDGF)-dependent activation of PDGF receptor and subsequent signaling events and cellular responses. *Mol Cell Biol.* 2012 May;32(10):1955–66.
459. Kaetzel DM. Transcription of the platelet-derived growth factor A-chain gene. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003 Oct;14(5):427–46.
460. Hamdan R, Zhou Z, Kleinerman ES. SDF-1 $\alpha$  induces PDGF-B expression and the differentiation of bone marrow cells into pericytes. *Mol Cancer Res MCR.* 2011 Nov;9(11):1462–70.

461. Betsholtz C. Insight into the physiological functions of PDGF through genetic studies in mice. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004 Aug;15(4):215–28.
462. Kelly JD, Haldeman BA, Grant FJ, Murray MJ, Seifert RA, Bowen-Pope DF, et al. Platelet-derived growth factor (PDGF) stimulates PDGF receptor subunit dimerization and intersubunit trans-phosphorylation. *J Biol Chem.* 1991 May 15;266(14):8987–92.
463. Hu Q, Klippel A, Muslin AJ, Fantl WJ, Williams LT. Ras-dependent induction of cellular responses by constitutively active phosphatidylinositol-3 kinase. *Science.* 1995 Apr 7;268(5207):100–2.
464. Kundra V, Escobedo JA, Kazlauskas A, Kim HK, Rhee SG, Williams LT, et al. Regulation of chemotaxis by the platelet-derived growth factor receptor-beta. *Nature.* 1994 Feb 3;367(6462):474–6.
465. Lechleider RJ, Sugimoto S, Bennett AM, Kashishian AS, Cooper JA, Shoelson SE, et al. Activation of the SH2-containing phosphotyrosine phosphatase SH-PTP2 by its binding site, phosphotyrosine 1009, on the human platelet-derived growth factor receptor. *J Biol Chem.* 1993 Oct 15;268(29):21478–81.
466. Fantl WJ, Escobedo JA, Martin GA, Turck CW, del Rosario M, McCormick F, et al. Distinct phosphotyrosines on a growth factor receptor bind to specific molecules that mediate different signaling pathways. *Cell.* 1992 May 1;69(3):413–23.
467. Heldin CH, Wasteson A, Westermark B. Interaction of platelet-derived growth factor with its fibroblast receptor. Demonstration of ligand degradation and receptor modulation. *J Biol Chem.* 1982 Apr 25;257(8):4216–21.
468. Papanas N, Maltezos E. Becaplermin gel in the treatment of diabetic neuropathic foot ulcers. *Clin Interv Aging.* 2008;3(2):233–40.
469. Heuchel R, Berg A, Tallquist M, Ahlén K, Reed RK, Rubin K, et al. Platelet-derived growth factor beta receptor regulates interstitial fluid homeostasis through phosphatidylinositol-3' kinase signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Sep 28;96(20):11410–5.
470. Hoyle GW, Li J, Finkelstein JB, Eisenberg T, Liu JY, Lasky JA, et al. Emphysematous lesions, inflammation, and fibrosis in the lungs of transgenic mice overexpressing platelet-derived growth factor. *Am J Pathol.* 1999 Jun;154(6):1763–75.
471. Hellström M, Kalén M, Lindahl P, Abramsson A, Betsholtz C. Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Dev Camb Engl.* 1999 Jun;126(14):3047–55.
472. Lindahl P, Johansson BR, Levéen P, Betsholtz C. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science.* 1997 Jul 11;277(5323):242–5.
473. Heldin C-H. Targeting the PDGF signaling pathway in tumor treatment. *Cell Commun Signal CCS.* 2013;11:97.
474. Simon MP, Pedeutour F, Sirvent N, Grosgeorge J, Minoletti F, Coindre JM, et al. Deregulation of the platelet-derived growth factor B-chain gene via fusion with collagen gene COL1A1 in dermatofibrosarcoma protuberans and giant-cell fibroblastoma. *Nat Genet.* 1997 Jan;15(1):95–8.

475. Sirvent N, Maire G, Pedeutour F. Genetics of dermatofibrosarcoma protuberans family of tumors: from ring chromosomes to tyrosine kinase inhibitor treatment. *Genes Chromosomes Cancer*. 2003 May;37(1):1–19.
476. Raines EW. PDGF and cardiovascular disease. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004 Aug;15(4):237–54.
477. Majesky MW, Daemen MJ, Schwartz SM. Alpha 1-adrenergic stimulation of platelet-derived growth factor A-chain gene expression in rat aorta. *J Biol Chem*. 1990 Jan 15;265(2):1082–8.
478. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999 Jan 14;340(2):115–26.
479. Billett MA, Adbeish IS, Alokayan SA, Bennett AJ, Marenah CB, White DA. Increased expression of genes for platelet-derived growth factor in circulating mononuclear cells of hypercholesterolemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996 Mar;16(3):399–406.
480. Mondy JS, Lindner V, Miyashiro JK, Berk BC, Dean RH, Geary RL. Platelet-derived growth factor ligand and receptor expression in response to altered blood flow in vivo. *Circ Res*. 1997 Sep;81(3):320–7.
481. Buetow BS, Tappan KA, Crosby JR, Seifert RA, Bowen-Pope DF. Chimera analysis supports a predominant role of PDGFRbeta in promoting smooth-muscle cell chemotaxis after arterial injury. *Am J Pathol*. 2003 Sep;163(3):979–84.
482. Sano H, Sudo T, Yokode M, Murayama T, Kataoka H, Takakura N, et al. Functional blockade of platelet-derived growth factor receptor-beta but not of receptor-alpha prevents vascular smooth muscle cell accumulation in fibrous cap lesions in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 2001 Jun 19;103(24):2955–60.
483. Jawien A, Bowen-Pope DF, Lindner V, Schwartz SM, Clowes AW. Platelet-derived growth factor promotes smooth muscle migration and intimal thickening in a rat model of balloon angioplasty. *J Clin Invest*. 1992 Feb;89(2):507–11.
484. Kozaki K, Kaminski WE, Tang J, Hollenbach S, Lindahl P, Sullivan C, et al. Blockade of platelet-derived growth factor or its receptors transiently delays but does not prevent fibrous cap formation in ApoE null mice. *Am J Pathol*. 2002 Oct;161(4):1395–407.
485. Tang J, Kozaki K, Farr AG, Martin PJ, Lindahl P, Betsholtz C, et al. The absence of platelet-derived growth factor-B in circulating cells promotes immune and inflammatory responses in atherosclerosis-prone ApoE<sup>-/-</sup> mice. *Am J Pathol*. 2005 Sep;167(3):901–12.
486. Nagaoka I, Trapnell BC, Crystal RG. Upregulation of platelet-derived growth factor-A and -B gene expression in alveolar macrophages of individuals with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest*. 1990 Jun;85(6):2023–7.
487. Martinet Y, Rom WN, Grotendorst GR, Martin GR, Crystal RG. Exaggerated spontaneous release of platelet-derived growth factor by alveolar macrophages from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*. 1987 Jul 23;317(4):202–9.
488. Liu JY, Morris GF, Lei WH, Hart CE, Lasky JA, Brody AR. Rapid activation of PDGF-A and -B expression at sites of lung injury in asbestos-exposed rats. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1997 Aug;17(2):129–40.

489. Osornio-Vargas AR, Goodell AL, Hernández-Rodríguez NA, Brody AR, Coin PG, Badgett A, et al. Platelet-derived growth factor (PDGF)-AA, -AB, and -BB induce differential chemotaxis of early-passage rat lung fibroblasts in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1995 Jan;12(1):33–40.
490. Shaw RJ, Benedict SH, Clark RA, King TE. Pathogenesis of pulmonary fibrosis in interstitial lung disease. Alveolar macrophage PDGF(B) gene activation and up-regulation by interferon gamma. *Am Rev Respir Dis*. 1991 Jan;143(1):167–73.
491. Raines EW, Dower SK, Ross R. Interleukin-1 mitogenic activity for fibroblasts and smooth muscle cells is due to PDGF-AA. *Science*. 1989 Jan 20;243(4889):393–6.
492. Ingram JL, Rice A, Geisenhoffer K, Madtes DK, Bonner JC. Interleukin-13 stimulates the proliferation of lung myofibroblasts via a signal transducer and activator of transcription-6-dependent mechanism: a possible mechanism for the development of airway fibrosis in asthma. *Chest*. 2003 Mar;123(3 Suppl):422S – 4S.
493. Bonner JC, Goodell AL, Coin PG, Brody AR. Chrysotile asbestos upregulates gene expression and production of alpha-receptors for platelet-derived growth factor (PDGF-AA) on rat lung fibroblasts. *J Clin Invest*. 1993 Jul;92(1):425–30.
494. Coin PG, Lindroos PM, Bird GS, Osornio-Vargas AR, Roggli VL, Bonner JC. Lipopolysaccharide up-regulates platelet-derived growth factor (PDGF) alpha-receptor expression in rat lung myofibroblasts and enhances response to all PDGF isoforms. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1996 Jun 15;156(12):4797–806.
495. Abdollahi A, Li M, Ping G, Plathow C, Domhan S, Kiessling F, et al. Inhibition of platelet-derived growth factor signaling attenuates pulmonary fibrosis. *J Exp Med*. 2005 Mar 21;201(6):925–35.
496. Rice AB, Moomaw CR, Morgan DL, Bonner JC. Specific inhibitors of platelet-derived growth factor or epidermal growth factor receptor tyrosine kinase reduce pulmonary fibrosis in rats. *Am J Pathol*. 1999 Jul;155(1):213–21.
497. Zymek P, Bujak M, Chatila K, Cieslak A, Thakker G, Entman ML, et al. The role of platelet-derived growth factor signaling in healing myocardial infarcts. *J Am Coll Cardiol*. 2006 Dec 5;48(11):2315–23.
498. Baroni SS, Santillo M, Bevilacqua F, Luchetti M, Spadoni T, Mancini M, et al. Stimulatory autoantibodies to the PDGF receptor in systemic sclerosis. *N Engl J Med*. 2006 Jun 22;354(25):2667–76.
499. Pálková L, Vondráček J, Trilecová L, Ciganek M, Pěňčíková K, Neča J, et al. The aryl hydrocarbon receptor-mediated and genotoxic effects of fractionated extract of standard reference diesel exhaust particle material in pulmonary, liver and prostate cells. *Toxicol Vitro*. 2014 Dec 10;29(3):438–48.
500. Yi ES, Lee H, Yin S, Pigué P, Sarosi I, Kaufmann S, et al. Platelet-derived growth factor causes pulmonary cell proliferation and collagen deposition in vivo. *Am J Pathol*. 1996 Aug;149(2):539–48.
501. Moreira RK. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Arch Pathol Lab Med*. 2007 Nov;131(11):1728–34.

502. Koike E, Hirano S, Shimojo N, Kobayashi T. cDNA microarray analysis of gene expression in rat alveolar macrophages in response to organic extract of diesel exhaust particles. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol.* 2002 Jun;67(2):241-6.