

AIX-MARSEILLE UNIVERSITE

FACULTE DE MEDECINE DE MARSEILLE

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

THESE

Présentée et publiquement soutenue devant

FACULTE DE MEDECINE DE MARSEILLE

Le 03 Mars 2016

Par Mme Rym BELHARETH

Née le 26 Avril 1988 à Tunis, TUNISIE

Titre de la thèse

TABAC ET GROSSESSE

En vue de l'obtention du grade de Docteur d'Aix-Marseille Université

Spécialité : Pathologie Humaine/ Maladies Infectieuses

JURY

Docteur	Christel Verollet Roulet	Rapporteur
Docteur	Olfa Masmoudi Kouki	Rapporteur
Professeur	Jean-Louis Mège	Directeur de thèse
Professeur	Mohamed Amri	Directeur de thèse

A ceux que j'aime, dont l'amour et le soutien me sont si indispensables:

A « *Sa3doun* » et « *Lawzi* », pour le modèle d'amour et d'humour qu'ils m'ont donné;

A toi « *Na7la* » chérie, l'unique sœur que j'ai au monde ;

A *Hamdi*, parce que tu as ajouté le beurre salé à ma vie.

Remerciements

Le travail de synthèse que nécessite la rédaction d'une thèse est difficile, mais à présent que je me retrouve face à mes remerciements, je me sens toute aussi impuissante.

Pour m'avoir permis de mener ce projet à bien et de vivre de tels moments, je tenais donc à remercier

Le Professeur Didier Raoult pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire.

Mon remerciement suivant revient à mon directeur de thèse, le Professeur Jean-Louis Mège. En ce moment même, les mots me manquent pour exprimer ma gratitude. Vous étiez la lumière d'espoir quand tout m'a semblé perdu. Merci d'avoir cru en moi et accepter que je fasse partie de votre équipe. Je vous suis également reconnaissante pour le temps que vous m'avez accordé et pour vos conseils avisés. D'un point de vue relationnel, j'ai trouvé une relation cordiale et une écoute à toute épreuve. Je n'oublierai pas votre soutien dans les moments de doute.

J'adresse aussi mes remerciements au Professeur Mohamed Amri, qui, en tant que Directeur de thèse, s'est toujours montré à l'écoute et très disponible tout au long de cette période. Je vous remercie pour l'aide et le temps que vous avez bien voulu me consacrer et pour vos précieux conseils et votre orientation.

Je tiens à remercier spécialement le Docteur Christian Capo pour toute l'aide et la patience qu'il a eue pour moi. Merci d'avoir permis à ce manuscrit de voir le jour et de m'avoir permis de profiter de vos compétences et de votre longue expérience, vous êtes devenu un maillon très important de mon travail et je profite de ces lignes pour vous adresser ma reconnaissance.

Je souhaiterais remercier mes rapporteurs pour le temps qu'ils ont accordé à la lecture de cette thèse et à l'élaboration de leur rapport dans une période de temps limitée.

Je tiens à remercier de tout cœur le Docteur Amira Ben Amara qui, de plus de m'avoir aidé à faire mes premiers pas dans ce laboratoire a été une véritable amie et bonne conseillère. Merci d'avoir pris parole pour moi quand j'en étais incapable. Tu fais maintenant partie de mon destin. Je n'oublierais pas tous nos rires et tout ce qu'on a partagé à commencer par les litres de café sur la terrasse! Avec Céline vous avez réussi à me soulager de mon mal et me faire oublier pendant un instant que j'étais loin de chez moi. Vous faites partie de mes plus beaux souvenirs. On a passé des moments formidables qui seront pour moi inoubliables. Merci pour le soutien vous m'avez apporté lorsque j'en avais le plus besoin. Que serai-je devenu sans vous et comment oublié des amies comme vous ?

Je remercie aussi tous les étudiants de notre équipe passés ou encore présents au laboratoire. Je pense particulièrement à Eya, Yassina et Soraya qui ont toujours été présentes en cas de besoin. Merci pour ces moments passés ensemble.

Enfin merci à tous les Reckettssiens comprenant les étudiants, les ingénieurs et les secrétaires.

Mes plus profonds remerciements vont à mes parents qui tiennent une place immense dans mon cœur. Tout au long de mon cursus, ils m'ont toujours soutenu, encouragé et aidé. Ils ont su me donner toutes les chances pour réussir. Ce mémoire leur est dédié à 1000%. Qu'ils trouvent, dans la réalisation de ce travail, l'aboutissement de leurs efforts ainsi que l'expression de ma plus affectueuse gratitude. Je remercie Dieu pour m'avoir donné des parents exceptionnels.

Papa, merci pour tout ce que tu as fait pour moi et je t'en serai toujours reconnaissante. Tu es une vraie école de la vie, je ne cesse d'apprendre tous les jours avec toi.... Aujourd'hui, ce que je suis, je ne le dois qu'à toi.

Maman, une femme aussi adorable que toi je n'en connais pas, tu as toujours été là pour moi, et à aucun moment tu n'as cessé de me couvrir de ta tendresse. Merci pour t'être sacrifiée pour moi. Merci de trimer sans relâche, malgré les péripéties de l'âge, de la santé et de la vie. Grâce à ton

appui aujourd'hui je peux réaliser mon rêve Merci tout simplement d'être... ma mère.

A une personne unique au monde, Olfa, ma sœur, ma psychologue et ma confidente. Mon amour pour toi est sans limite. Merci d'être toujours à mes côtés, par ta présence et ton amour, pour donner du goût et du sens à notre vie de famille. Je te souhaite d'être heureuse dans ta vie et un avenir brillant. Nos soirées et nos habitudes vont me manquer dans un futur proche, mais rien n'égale ton bonheur à mes yeux ...Il est temps de voler par tes propres ailes, mais je te serai toujours d'un soutien inégalé...

Je ne pourrais pas oublier de remercier l'homme que j'aime, pour son soutien, sa tendresse, sa force, son humour, sa joie, sa gentillesse, son originalité, son amour, sa patience... et la compréhension dont il a toujours fait preuve à mon égard. Hamdi, une pluie de "merci" s'échappe de mon cœur: mets-toi à l'abri ! Merci, merci, merci, merci, merci, merci, merci, merci...

Mes derniers remerciements vont à mon oncle Hassen et ma tante Raja, c'est grâce à eux si je suis ici maintenant. Merci pour tout ce que vous avez pour moi. Merci pour votre amour, merci d'avoir été à mes côtés depuis que je suis née et jusqu'à cet instant. Merci de m'avoir fait découvrir Marseille ! A toi Fofu, avoue que tu ne t'attendais pas à ce qu'après quinze ans je reviens pour t'embêter à nouveau comme quand on était petits !

Enfin un grand merci à tous ! J'espère avoir atteint le seuil de vos espérances, que ce travail soit l'expression de ma profonde affection, je vous remercie infiniment pour votre présence, votre soutien morale et tous les encouragements que vous avez porté à mon égard.

SOMMAIRE

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
CHAPITRE I.....	4
A. Le placenta :.....	5
Structure du placenta.....	5
Développement du placenta :.....	6
La circulation placentaire :.....	8
Fonctions placentaires :.....	10
B. La cigarette.....	18
Effets de la fumée de cigarette.....	19
La nicotine :	24
Répartition de la nicotine dans les tissus :	25
Métabolisme de la nicotine :	26
Structure des récepteurs nicotiniques :	27
Exposition prénatale à la nicotine	29
Effets de la nicotine sur le placenta	29
CHAPITRE II	31
A. Le Stress Oxydatif.....	32
B. Les radicaux libres	33
Substances oxygénées réactives et leurs modes de production	33
Les défenses antioxydantes.....	35
C. Les astrocytes.....	38
Présentation générale	38
Physiologie et fonctions générales des astrocytes	39
Fonctions des astrocytes chez l'adulte	41
Le calcium : élément clé de l'excitabilité astrocytaire.....	44
EXPOSE DES TRAVEAUX.....	46
A. Article 1	47
B. Article 2 :	Erreur ! Signet non défini.
CONCLUSIONS & PERSPECTIVES	124
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	Erreur ! Signet non défini.
ANNEXE	Erreur ! Signet non défini.

Le tabagisme actif par la mère expose le fœtus en développement à des agents qui peuvent traverser la barrière placentaire et interférer avec les fonctions placentaires. En plus des fonctions homéostatiques du placenta, un large éventail de fonctions immunologiques, pourrait être compromise. Dans cette étude, nous avons évalué l'effet de l'extrait de la fumée de cigarette (CSE) sur les macrophages isolés à partir de placentas humains (pMφs), qui sont les principaux partenaires de l'immunité de fœto-maternelle innée. J'ai pu montrer que le CSE inhibe significativement la formation des cellules géantes multinucléées (CMG). Cette propriété du CSE est spécifique aux macrophages car la fusion des macrophages dérivés des monocytes est inhibée lors de la formation de granulomes *in vitro*. J'ai également étudié l'absorption de particules et la production de cytokines par pMφs exposés au CSE. Le CSE a inhibé l'absorption des particules de zymosan, mais pas celle du zymosan opsonisé, ce qui suggère qu'il interfère avec les récepteurs phagocytaires et non phagocytaires. Le CSE augmente la libération de facteur de nécrose tumorale et l'interleukine-33, et une diminue celle de l'interleukine-10, ce qui montre que l'équilibre entre les cytokines inflammatoires et anti-inflammatoires est affecté par le CSE. En outre, l'expression des métalloprotéinases telles que les MMP-1, MMP-10 et MMP-12, connues pour être impliquées dans le remodelage des tissus et la fusion des macrophages est dérégulée. Enfin, j'ai montré que la nicotine, l'un des principaux composés de tabac, n'a pas affecté les propriétés fonctionnelles des pMφs. Le stress oxydatif est impliqué dans la pathogenèse des maladies liées au tabagisme. La protection des astrocytes du stress oxydatif semble essentielle pour maintenir le fonctionnement du cerveau. Nous avons étudié l'effet d'une exposition gestationnelle à la fumée de cigarettes sur la survie des astrocytes. L'incubation des astrocytes isolés à partir d'animaux exposés à la fumée de cigarette avec 300 µM de H₂O₂ pendant 1 heure induit une diminution significative de la proportion des cellules survivantes par rapport à des cellules isolées d'animaux de contrôle et qu'il y avait une réduction dans l'activité des enzymes antioxydantes .

Mots clés : fumée de cigarette, macrophages placentaires, nicotine, astrocytes, stress oxydatif.

Active smoking by the mother exposes the developing fetus to agents that can cross the placental barrier and interfere with placental functions. A wide range of immunological functions, including innate and adaptive immune responses, might be impaired. In this study, we assessed the effect of cigarette smoke extract (CSE) on macrophages isolated from human placentas (pMφs), which are major partners of innate feto-maternal immunity. I showed that CSE significantly inhibited the formation of multinucleated giant cells (MGCs). This property of CSE is specific to macrophages because the fusion of monocyte-derived macrophages is inhibited during the *in vitro* formation of granulomas. I also investigated particle uptake and cytokine production by pMφs exposed to CSE. CSE inhibited the uptake of zymosan, but not that of opsonized zymosan, suggesting that it interferes with phagocytic receptors, not with the phagocytic machinery of pMφs. CSE increased the release of Tumor Necrosis Factor and interleukin-33, and decreased that of interleukin-10, demonstrating that the balance between inflammatory and anti-inflammatory cytokines is affected by CSE. Furthermore, CSE enhanced the expression of metalloproteinase (MMPs) genes such as MMP-1, MMP-10 and MMP-12, known to be involved in tissue remodeling including macrophage fusion. Finally, I showed that nicotine, one of the major compounds of tobacco, did not affect the functional properties of pMφs. Oxidative stress is involved in the pathogenesis of smoking-related disease. Protection of astrocytes from oxidative insult appears essential to maintain brain function. We have investigated the effect of gestational cigarette exposure on astrocyte survival. Incubation of astrocytes isolated from animals exposed to cigarette smoke with 300 µM H₂O₂ for 1 h induces a significant decrease of the proportion of surviving cells and have a reduced superoxide dismutase and catalase activities.

Key words: cigarette smoke, placental macrophages, nicotine, astrocytes, oxidative stre

AVANT-PROPOS

Le tabac représente la seule drogue qui soit légale dans le monde entier. Il tue cependant une grande proportion de ses consommateurs. L'Organisation Mondiale de Santé (OMS) estime que l'abus du tabac est actuellement responsable de près de six millions de décès chaque année (un décès toutes les six secondes).

Le tabac existe sous plusieurs formes qui toutes provoquent de nombreux effets indésirables. Ce sont les divers types de cigarettes (fabriquées ou roulées à la main), les cigares, les pipes et les narguilés. Tandis que les cigarettes - notamment les fabriquées - représentent de loin la principale forme de tabac fumé à l'échelle mondiale, dans de nombreux pays d'autres formes de tabac, telles les bidis et les narguilés, sont dominantes. Le tabac sans fumée désigne le produit du tabac sans combustion au moment de l'utilisation. Une grande variété de produits sans fumée sont disponibles pour utilisation orale ou nasale. Les produits destinés à un usage oral sont aspirés, mâchés, tronqués ou appliqués sur les gencives ou les dents.

L'exposition à la fumée du tabac affecte en particulier la fécondité des hommes et des femmes. La grossesse est identifiée par de nombreuses fumeuses et leurs partenaires comme une expérience propice à des changements comportementaux et représente une occasion pour réévaluer leur mode de vie afin de mettre au monde un enfant en bonne santé. Au cours des vingt dernières années, de nombreux essais cliniques et études observationnelles ont montré l'efficacité du sevrage en début de grossesse. Cependant et en dépit des campagnes de lutte contre le tabagisme, certaines femmes en particulier de milieux défavorisés continuent de fumer alors même qu'elles sont conscientes des risques courus par le fœtus et le nouveau-né. Il est maintenant bien connu que le tabagisme et/ou l'exposition à la fumée pendant la

grossesse ont de graves conséquences pour la mère, le fœtus et le bébé tout au long de son développement. Les études s'entendent généralement pour affirmer que l'infertilité et les grossesses ectopiques sont plus fréquentes chez les fumeuses. Le tabagisme actif pendant cette période est associé à un taux élevé de fausses couches, de décollement placentaire et de placenta prævia, ce qui a pour conséquences la naissance de bébés morts-nés ou qui décèdent dans les premières semaines de leur vie. Il est clair également que le retard de croissance utérine a pour effet une diminution du poids de naissance des bébés.

Si les conséquences médicales du tabagisme au cours de la grossesse ne font guère de doutes, les mécanismes mis en jeu sont loin d'en être connus. Nous avons formulé l'hypothèse que l'activité biologique de certaines cellules jouant un rôle important dans l'homéostasie placentaire telles que les macrophages pourrait être affectée par la fumée de cigarette. Nous avons montré une altération de différentes fonctions des macrophages placentaires telles que la capacité à former des cellules géantes multinucléées (MGCs), ce qui ouvre la voie à une étude plus systématique de l'effet du tabac sur les propriétés placentaires.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I

A. Le placenta :

Le placenta humain est un organe complexe aussi bien du point de vue de son développement que de ses propriétés métaboliques et fonctionnelles. Cet organe autonome et transitoire a pour fonction principale d'assurer le développement harmonieux de l'embryon puis du fœtus pendant la vie intra-utérine en le protégeant de toute infection ou du rejet de la semi-allogreffe qu'il représente. Il a également une fonction endocrinienne qui module aussi la physiologie maternelle. Le placenta humain subit des transformations morphologiques et fonctionnelles spectaculaires entre le premier trimestre de grossesse lorsque l'organogenèse se produit et les deux trimestres plus tardifs [1].

Structure du placenta

Le placenta, un organe en forme de disque, offre le seul lien physique entre la mère et le fœtus. Pendant la grossesse, le placenta se développe pour assurer une très grande surface d'échange materno-fœtale. A terme, le placenta pèse presque 500 g (soit environ 1/6 du poids fœtal), a un diamètre de 15 à 20 cm, une épaisseur de 2-3 cm, une surface d'échange d'environ 15 m² et un réseau sanguin long de 40 à 50 km, ce qui reflète l'intensité des échanges entre la mère et le fœtus au cours de la grossesse [2]. L'unité structurelle de base du placenta est la villosité choriale. Ces villosités sont des projections vasculaires des tissus fœtaux entourés par le chorion. Le chorion se compose de deux couches cellulaires : une couche interne de cellules mononucléées, les cytotrophoblastes villeux qui se différencient pour former la couche cellulaire externe et une couche de syncytiotrophoblastes, en contact direct avec le sang maternel dans l'espace intervilloux et qui assurent les fonctions endocrines et métaboliques ainsi que des fonctions immunosuppressives et d'hémostase comparables à

celles d'un endothélium. On distingue également dans la villosité des cytotrophoblastes intermédiaires à l'origine des cytotrophoblastes extravilloux qui pénètrent la décidua et migrent de façon orientée vers les artères utérines. L'espace intervilloux est une grande étendue caverneuse dans laquelle les villosités se rejoignent. A mesure que les villosités deviennent de plus en plus matures, il y a une réduction du cytotrophoblaste, jusqu'à ce qu'il y est à terme une seule couche de syncytiotrophoblastes qui sépare le sang maternel et l'endothélium fœtal. La cellule clé du placenta humain est donc la cellule cytotrophoblastique, capable in vivo et in vitro, par fusion cellulaire, de former des syncytiotrophoblastes, cette différenciation morphologique étant associée à une différenciation fonctionnelle [3].

Développement du placenta :

Bien que le placenta humain soit aisément identifiable comme une structure en forme de disque servant d'interface avec la mère, il est difficile de le définir biologiquement. D'une part, aucun autre organe ne peut l'égaler pour sa diversité fonctionnelle puisqu'il effectue les fonctions biologiques des différents organes maternels en attendant que ces organes deviennent fonctionnels chez le fœtus. D'autre part, la gamme des variations morphologiques des placentas mammifères est étonnante [4]. Selon Mossman, « le placenta normal des mammifères est une apposition ou une fusion des membranes fœtales à la muqueuse de l'utérus pour un échange physiologique » [5]. Il ressort de cette déclaration largement citée que le placenta a deux composantes, une composante fœtale et une composante maternelle qui doivent interagir avec succès pour une grossesse sans complications. La composante maternelle est l'endomètre qui subit une transition pour former la décidua en début de grossesse. Bien que seulement quelques couches de cellules déciduales soient incorporées dans la plaque basale du placenta et soient souvent considérées comme des contaminants maternels après l'accouchement, le développement et la fonction placentaire sont

inextricablement liés à l'endomètre. L'implantation dans le corps humain est généralement décrite comme un processus hautement invasif, au cours duquel le produit de la conception devient complètement noyé dans l'endomètre. Des syncytiotrophoblastes s'infiltrant entre les cellules épithéliales utérines, mais il semble bien que les cellules stromales de l'endomètre jouent un rôle tout aussi actif.

Le développement du placenta se doit d'être précoce pour être fin prêt à soutenir le fœtus. Des précurseurs villosités couvrent toute la surface du sac chorionique vers la fin de la troisième semaine après la conception. Le développement de la croissance fœtale et des organes fœtaux au cours du premier trimestre de grossesse se produit dans un micro-environnement appauvri en oxygène ; il est stimulé par la sécrétion de substances nutritives et de facteurs de croissance par les glandes de l'endomètre [6]. Des données provenant d'autres espèces montrent que le placenta stimule son propre développement via la signalisation aux glandes de l'endomètre de devoir sécréter « *les protéines du lait de l'utérus* » [7]. En l'absence d'une circulation chorionique efficace à ce stade de la grossesse, il est difficile de savoir comment les nutriments atteignent l'embryon. Les acides aminés accumulés à l'intérieur du fluide coelomique extra-embryonnaire et l'identification récente de protéines de transport spécifiques à la surface externe de la vésicule vitelline secondaire suggèrent que cette structure, pourtant largement considérée comme résiduelle, joue un rôle important dans le transport des nutriments au cours des premiers stades du développement humain [8]. Ainsi, le placenta humain fonctionne d'abord comme un placenta chorio-vitellin, tout comme ceux de nombreuses espèces de mammifères, bien que morphologiquement il ne se développe jamais en tant que tel [4]. Vers la fin du premier trimestre, le placenta subit un remodelage pour former l'organe définitif avec des membranes lisses. Ce processus, associé à l'apparition de la circulation artérielle maternelle, est dû au stress oxydatif induit localement par l'augmentation de la concentration en oxygène [6]. L'absence d'une circulation maternelle continue à

l'intérieur placentaire lors du premier trimestre est essentielle pour contrôler les niveaux d'oxygène à l'intérieur du sac gestationnel pendant l'organogenèse. Elle participe aussi à la défense naturelle du fœtus contre les parasites et les virus à son stade le plus vulnérable.

La circulation placentaire :

Le placenta humain est hémomonochorial. Cette particularité est propre à l'espèce humaine, aux primates supérieurs et au cobaye. L'apparition et le développement de la circulation utéro-placentaire dépend de la conversion des artères spiralées de l'endomètre d'artères musculaires contractiles à des artères très flasques avec conduits dilatés. Les cellules cytotrophoblastiques extravilleuses jouent un rôle clé dans ce processus et migrent des bouts de l'ancrage des villosités placentaires jusqu'à la paroi de l'utérus. Le tissu fœtal (chorion) est ainsi en contact direct avec le sang maternel (figure 1). L'approvisionnement en sang vers l'utérus se fait via les artères utérines et ovariennes qui forment les artères radiées, à partir desquelles les artères radiales pénètrent dans le myomètre. Les artères radiales se divisent ensuite en artères spiralées qui alimentent l'espace intervilloux, baignant les villosités choriales en sang maternel. La pression est d'environ 80-100 mm Hg dans les artères utérines, 70 mm Hg dans les artères spiralées et seulement de 10 mm Hg dans l'espace intervilloux. Deux artères ombilicales provenant des artères iliaques fœtales portent le sang fœtal désoxygéné à travers le cordon ombilical vers le placenta. Les artères ombilicales se divisent ensuite en artères chorioniques qui se terminent en capillaires au sein des villosités. Les substances dans le sang maternel passent de l'espace intervilloux au sang fœtal à travers le syncytiotrophoblaste, le tissu conjonctif du fœtus et les capillaires fœtaux. Les capillaires fœtaux se drainent dans les veines choriales qui se déversent en une seule veine ombilicale. A terme, le flux sanguin maternel est d'environ 600 ml/min, dont 80% passe vers le placenta. Il n'existe pas d'autorégulation au niveau de la circulation utéro-placentaire, le flux étant directement lié à la

pression moyenne de perfusion utérine et inversement proportionnel à la résistance vasculaire utérine. La circulation du sang utéro-placentaire peut par conséquent être réduite par une hypotension maternelle et une pression accrue dans l'utérus durant les contractions utérines. Comme les artères utéro-placentaires renferment des récepteurs adrénergiques, la stimulation sympathique par des vasopresseurs peut conduire à une vasoconstriction de l'artère utérine [9].

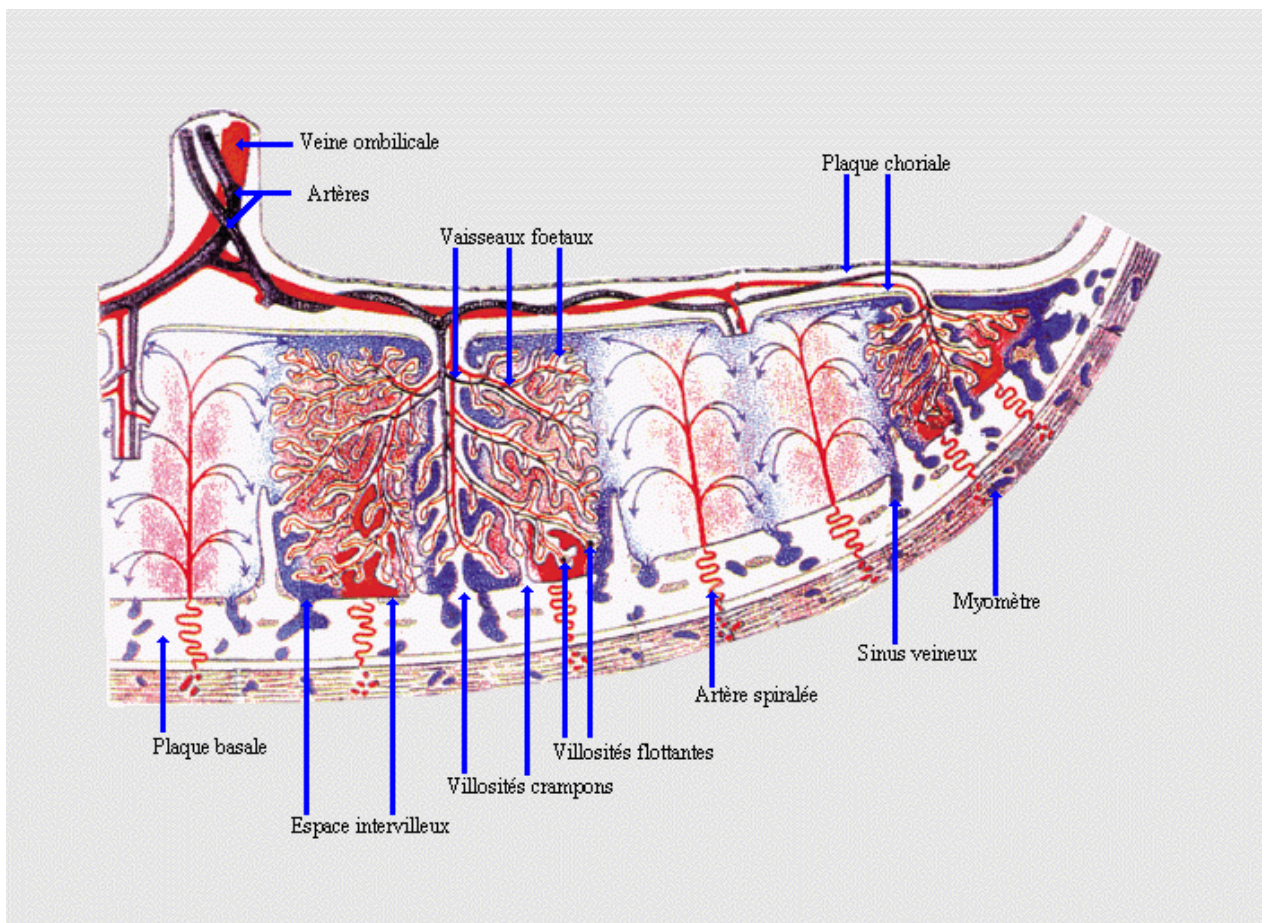


Figure 1 : Circulations sanguines maternelle et fœtale du placenta humain. [3]

Fonctions placentaires :

L'essentiel des informations contenues dans ce paragraphe provient des articles de Alsat & Evain-Brion et de Griffiths & Campbell. Au cours de la grossesse le placenta exerce de nombreuses fonctions essentielles au bon déroulement de celle-ci et à la croissance fœtale.

Fonction d'échange du placenta :

Les échanges placentaires se font selon plusieurs modalités (tableau 1) :

Echange de gaz :

Les poumons du fœtus ne prennent pas part à l'échange de gaz *in utero* : c'est donc le placenta qui est entièrement responsable du transfert de l'oxygène et du dioxyde de carbone (CO₂) au cours du développement du fœtus.

L'oxygène :

L'oxygène traverse facilement le placenta par diffusion passive. Son transfert dépend principalement du gradient de pression partielle entre le sang maternel dans l'espace intervilloux et le sang fœtal dans les artères ombilicales (≈ 4 kPa). Au niveau de l'interface fœto-maternelle, le sang maternel capte le CO₂ devenant ainsi plus acide, ce qui provoque la libération de l'oxygène du sang maternel. Simultanément, le sang fœtal libère du CO₂ et l'augmentation de son alcalinité favorise en retour l'absorption de l'oxygène par le fœtus. Cet effet est connu sous le nom de « double effet de Bohr ».

Le dioxyde de carbone :

Le CO₂ traverse également le placenta par diffusion passive et dépend du gradient de pression partielle du CO₂ entre le sang fœtal dans les artères ombilicales et le sang maternel dans l'espace intervilloux. Au fur et à mesure que le sang maternel libère de l'oxygène, il se charge en CO₂ et en bicarbonate. En se chargeant en oxygène, le sang fœtal a moins d'affinité pour le

CO₂ et le transfère vers le sang maternel. Ces deux événements sont connus sous le nom de « double effet de Haldane ».

4.1.1. Echanges métaboliques :

Le placenta est un tissu métaboliquement très actif. La néoglucogénèse fœtale étant quasi nulle, c'est le glucose maternel qui constitue la principale source d'énergie du fœtus. La diffusion passive du glucose à travers le placenta étant insuffisante pour répondre aux besoins du fœtus, ce sont les transporteurs de glucose qui permettent l'utilisation du glucose par le fœtus. Le placenta possède l'équipement enzymatique nécessaire à la synthèse des acides gras, à leur estérification en triglycérides et à leur oxydation en corps cétoniques. Le placenta accumule aussi les acides aminés qu'il utilise pour la synthèse protéique. Des électrolytes tels que le sodium et le chlore sont principalement transférés par diffusion passive à travers la membrane placentaire alors que les ions calcium et fer nécessitent un transport actif. L'eau se déplace par simple diffusion selon le gradient de pression hydrostatique et osmotique. Certains canaux particuliers dans le trophoblaste peuvent aussi participer à son passage.

4.1.2. Fonctions endocriniennes :

Le placenta est un organe endocrinien extrêmement actif qui produit grand nombre de peptides et d'hormones stéroïdiennes. Ces hormones jouent un rôle essentiel dans l'adaptation de l'organisme maternel et dans le maintien de la gestation, du développement fœtal et l'accouchement à terme. Dès la 8e semaine de grossesse, le placenta humain est le siège d'une importante production d'hormones stéroïdiennes, principalement la progestérone et les œstrogènes (œstriol, œstradiol et œstrone). Ces stéroïdes agissent essentiellement au niveau du muscle utérin où la progestérone a notamment une action tocolytique par le biais de

récepteurs spécifiques dont la synthèse est en partie contrôlée par les œstrogènes. Les stéroïdes en excès, aisément diffusibles et pouvant avoir un rôle délétère sur le fœtus, sont inactivés par les tissus fœtaux et placentaires. Le placenta sécrète également de nombreuses hormones polypeptidiques. Au début de la grossesse, elles favorisent l'accumulation de réserves de nutriments maternels qui seront mobilisées plus tard pour l'utilisation par le fœtus et pour l'allaitement. La gonadotrophine chorionique humaine (HCG) est une hormone glycoprotéique produite dès la deuxième semaine de grossesse au moment de l'implantation et cette sécrétion par les syncytiotrophoblastes atteint un maximum au cours du deuxième mois avant de diminuer vers le troisième mois et de rester stable jusqu'au terme. Elle stimule le corps jaune qui sécrète alors de la progestérone nécessaire au maintien de la grossesse.

La sécrétion de l'hormone lactogène placentaire (hPL) dans le compartiment placentaire maternel est importante alors sa concentration est 100 fois plus faible dans la circulation fœtale. Sa concentration est proportionnelle à la masse placentaire et évolue tout au long de la grossesse. Le placenta est aussi connu pour donner lieu à une sécrétion accrue de facteurs de croissance. En effet, la production placentaire de l'hormone de croissance est si puissante que la sécrétion par l'hypophyse maternelle est supprimée par la grossesse. Des hormones telles que l'érythropoïétine et l'angiotensine sont impliquées dans les adaptations cardiovasculaires maternelles. Tous ces facteurs agissant de façon autocrine ou paracrine. On note enfin dans le placenta la présence de leptine (sécrétée par le tissu adipeux) et d'epidermal growth factor receptor (EGFR) [1].

Fonctions immunologiques :

Les interactions des cellules du trophoblaste extravilleux avec le système immunitaire de la mère attestent du dialogue immunitaire entre la mère et son fœtus.

Bien que la plupart des protéines soient trop volumineuses pour franchir la barrière placentaire, les anticorps maternels de type IgG peuvent la traverser par pinocytose et fournissent la protection immunitaire nécessaire au fœtus pendant les premiers mois de sa vie. Le syncytiotrophoblaste possède des récepteurs pour le fragment Fc des IgG qui, fixés, sont endocytés avant d'être libérés par exocytose dans le sang fœtal. Ce transfert commence au début de la gestation et augmente de façon exponentielle au cours du troisième trimestre.

Le placenta joue le rôle d'une barrière immunologique même s'il laisse passer les anticorps de la mère vers le fœtus. Il est maintenant évident que le degré d'activation des cellules *Natural Killer* utérines (uNK) est essentiel au succès de la grossesse. Ceci dépend de la liaison des ligands HLA-C présents sur les cellules du trophoblaste avec les récepteurs de type Ig exprimés à la surface des uNK [10]. C'est ainsi que le placenta empêche les cellules T cytotoxiques maternelles de s'attaquer au fœtus. Dans ce contexte, plusieurs hormones stéroïdes placentaires, et plus particulièrement la progestérone, sont immunosuppressives et agissent spécifiquement sur les lymphocytes de la mère via la protéine PIBF (*Progesterone-Induced Blocking Factor*). Les molécules HLA classiques sont remplacées par des molécules HLA particulières et peu polymorphes, les HLA-G. On note également la présence de Fas-ligand sur le syncytiotrophoblaste et la déplétion locale en tryptophane, ce qui suggère que les cellules NK ne peuvent attaquer les cellules embryonnaires et le placenta. En effet, les cellules NK reconnaissent les molécules HLA-G, ce qui inhibe leur activité cytolytique et explique pourquoi le fœtus et le placenta sont épargnés par l'arsenal immunitaire de la mère quel que soit le groupe HLA paternel [11,12].

	Mère	Placenta	Fœtus
<i>Simple Diffusion</i>	O ₂ , H ₂ O...	Gradient de concentration	CO ₂ , Urée
<i>Diffusion Facilitée</i>	Couplage à un flux ionique		
	Glucose	Protéines vectrices	Glucose
<i>Transport Actif</i>	Acides Aminés	Energie dépendant ATPase	Acides Aminée
<i>Endocytose</i>	Transferrine	Récepteurs Spécifiques	Fer
	LDL		Cholestérol
	IgG		IgG

Table 1: les types d'échanges placentaires

Les macrophages

Les phagocytes mononucléés sont un ensemble constitué des monocytes, des macrophages et des cellules dendritiques (DCs) qui présentent des morphologies, des caractéristiques phénotypiques et des fonctions différentes [13]. Les monocytes et les macrophages humains sont des acteurs clés de la réponse immunitaire innée. Le modèle initial de la différenciation des macrophages a été proposé par Ralph Van Furth et Zanvil Cohn en 1968 [14]. Les macrophages sont des cellules hématopoïétiques dérivées de la moelle osseuse qui migrent à travers la circulation sanguine vers divers tissus [15]. Ils jouent un rôle essentiel dans la coordination des processus tels que le développement et la défense de l'hôte par la sécrétion de cytokines, de chimiokines et de différents facteurs de croissance. Supports de l'immunité innée, ils font également le lien avec le système immunitaire adaptatif via leur capacité à

présenter l'antigène (ils expriment les antigènes des leucocytes humains (HLA) de classe II et des récepteurs de molécules de co-stimulation tels que CD80 / CD86) aux lymphocytes T [16].

Les différentes populations des macrophages :

Au cours des 20 dernières années, l'utilisation de marqueurs membranaires spécifiques a mis en évidence différentes sous-populations de monocytes. Les monocytes inflammatoires murins sont caractérisés par une expression élevée de Ly6C, de CCR2 et une faible expression en CX3CR1. En revanche, les monocytes patrouilleurs sont caractérisés par la faible expression de Ly6C et CCR2 et une forte expression de CX3CR1. Une hétérogénéité similaire a été trouvée chez l'homme; la population la plus répandue dite monocyte classique, équivalente chez les souris au LY6C^{hi}, exprime des niveaux élevés de CD14 [17]. Le niveau d'expression membranaire de CD14 et CD16 a permis l'identification de deux sous-ensembles mineurs de monocytes, CD14^{hi}CD16^{lo} (également appelés monocytes intermédiaires) et CD14^{lo}CD16^{hi} (appelés monocytes non-classiques), des équivalents des monocytes Ly6C^{lo} chez les souris [18]. La proportion relative des sous-populations de monocytes humains est modulée au cours des réactions inflammatoires ou de maladies infectieuses [19,20].

Cette classification est encore plus complexe pour les macrophages tissulaires. En effet, les macrophages sont appelés selon le type de tissu dans lequel ils résident : les ostéoclastes dans les os, les macrophages alvéolaires dans les poumons, les cellules de Kupffer dans le foie, les macrophages intestinaux dans l'intestin, la microglie dans le système nerveux, les macrophages placentaires et macrophages dans les organes lymphoïdes secondaires [21,22]. Ces macrophages présentent une diversité fonctionnelle allant de la défense de l'hôte au métabolisme et au remodelage tissulaire.

Outre ces macrophages résidents, les macrophages peuvent être recrutés localement en réponse à des traumatismes et leurs caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles

dépendent du type d'atteinte [17]. Les réponses des macrophages à des stimuli différents ont ainsi conduit à la notion de polarisation des macrophages : les macrophages M1 reflèteraient la réponse immunitaire de type Th1 et les macrophages M2 la réponse de type Th2 [23]. Le manque de marqueurs spécifiques M1 et M2 a rendu l'identification *in vivo* de ces sous-populations difficile [24] mais l'utilisation de technologies, tel le microarray, a conduit à l'identification de signatures transcriptionnelles nécessitant cependant une validation fonctionnelle [25]. Des études plus récentes ont montré qu'il existe au moins neuf programmes distincts d'activation des macrophages [26]. Le projet InnGen permettant le tri des macrophages tissulaires de souris C56BL/6 et l'analyse de leur programme d'expression génique a révélé une diversité encore plus considérable [27]. La cytométrie en flux a montré que, chez la souris, les macrophages alvéolaires, la microglie et les macrophages de la pulpe rouge de la rate sont des populations distinctes des autres macrophages [28]. Il est probable que de nouvelles données vont profondément changer notre compréhension de la relation entre la diversité des populations des macrophages et leur origine.

Les macrophages de type M1

Les macrophages M1 sont des effecteurs de la réponse immune de type Th1. Ils promeuvent et coordonnent les processus inflammatoires et sont essentiels à l'élimination des agents pathogènes intracellulaires. Ils sont stimulés par des motifs moléculaires portés par les microorganismes (PAMPs), tels que le lipopolysaccharide (LPS), un puissant agoniste de Toll-like Receptor (TLR)-4. Les motifs moléculaires associés aux dégâts cellulaires (DAMPs), tels que ceux dérivés à partir de mitochondries des neutrophiles apoptotiques, et de l'interféron (IFN)- γ (produit les Th1 et Tc1 activés et les cellules NK) pas compris la phrase [29]. Les réponses inflammatoires et cytotoxiques contre des agents pathogènes intracellulaires et les cellules cancéreuses sont directement induites par une série de cytokines (telles que l'interleukine (IL)-1, IL-6, IL-12 ou le Tumor Necrosis Factor (TNF) et de

médiateurs inflammatoires (tels que le monoxyde d'azote (NO)) [30]. *In vitro* la polarisation M1 des macrophages peut être induite par l'IFN- γ seul ou en combinaison avec d'autres agents tels que le LPS, le TNF ou le granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) [31]. L'IFN- γ induit la phosphorylation en aval de transducteurs de signaux et des activateurs de transcription-1 (STAT1) par la voie de signalisation Janus kinases (JAK). Le LPS en particulier active le TLR-4, ce qui, à son tour, active les mitogen-activated protein kinases (MAPK), le facteur de régulation de l'interféron (IRF) ainsi que le facteur nucléaire κ B (NF- κ B) [32]. La voie de signalisation Notch est également impliquée dans l'expression des cytokines inflammatoires induite par l'interaction LPS/TLR4 [33].

Les macrophages de type M2

Les macrophages M2 sont essentiels pour la résolution de l'inflammation et l'induction de l'angiogénèse, le remodelage des tissus et la réparation tissulaire. Ils produisent en effet des cytokines anti-inflammatoires et différents facteurs angiogéniques [16]. Le phénotype de ces macrophages M2 peut varier selon leur microenvironnement. Au début des étapes de la guérison, les macrophages ont plus un profil M1-like avec une expression élevée de TNF et d'IL-6 et une expression faible en TGF- β , alors que ceux des étapes ultérieures ont plus un profil plutôt M2, avec une production poindre des cytokines inflammatoires et une augmentation des marqueurs d'activation alterne tel que CD206, la dectine-1, l'arginase-1 (Arg-1), et chitinase 3-like 3 (Ym1) [16].

B. La cigarette

La fumée de cigarette est un mélange complexe d'aérosols et de produits toxiques qui peuvent être classés selon l'origine et la composition de la feuille de tabac. La combustion d'une cigarette génère trois types de fumée : la fumée principale connue sous le nom de « mainstream smoke », produite à partir du mégot et qui est directement inhalée par le fumeur (tabagisme actif), la fumée secondaire (« sidestream smoke ») produite en continu par le bout de la cigarette en combustion (tabagisme passif) et la fumée ambiante qui est une combinaison des deux autres [34]. La façon dont la cigarette est fumée affecte le taux de fumée primaire et de fumée secondaire. Des conditions de fumée ont été normalisées par la Federal Trade Commission (FTC) et l'Organisation Internationale de Standardisation (ISO) : elles sont définies par un volume de bouffée de 35 ml d'une durée de 2 secondes à une fréquence d'une minute par bouffée. Ces conditions peuvent cependant ne pas représenter l'exacte utilisation de la cigarette [35].

L'analyse de la composition de la fumée de cigarette a révélé que chaque bouffée peut contenir 10^4 à 10^6 de types d'oxydants [36]. Ces composants sont répartis entre la phase particulaire mieux connue sous le nom de « goudron » et la phase gazeuse de la fumée. Par exemple, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), les nitrosamines et les métaux présents dans la phase particulaire sont le plus souvent associés aux cancers alors que des aldéhydes tels que le formaldéhyde, l'acroléine et l'acétaldéhyde présents principalement dans la phase gazeuse sont impliqués dans les maladies pulmonaire

s chroniques [37]. La phase particulaire est également riche en radicaux libres de longue vie, incluant les semiquinones qui forment des radicaux hydroxyles et du peroxyde d'hydrogène lorsqu'ils réagissent avec l'anion superoxyde. Les radicaux de courte vie tel que l'anion superoxyde ou l'acide nitrique sont prédominants au niveau de la phase gazeuse mais ils

réagissent très vite pour former du peroxy-nitrite hautement réactif [38]. La FTC utilise une méthode uniforme pour mesurer les taux de goudrons et de nicotine dans les cigarettes. Dans les années 1960, la FTC a exigé que les fabricants de cigarette réduisent la quantité de goudrons et de nicotine présents dans la cigarette, ce qui a permis de passer de 38 mg et de 2,7 mg en 1954 à 12 mg et 0,95 mg aujourd'hui [39]. Ces efforts n'ont pas réellement réduit l'exposition aux substances toxiques de la cigarette, les fumeurs ayant changé leurs habitudes afin de compenser la réduction de nicotine, ce qui a conduit à une modification des schémas de maladies associées au tabagisme. Par exemple, l'inhalation profonde des cigarettes à filtre contenant une faible teneur en goudrons conduit à un risque accru de développer un cancer des poumons accompagné d'une délocalisation de la tumeur à cellules squameuses située au centre des poumons à un adénocarcinome situé plus en périphérie [40].

Effets de la fumée de cigarette

Fumer des cigarettes pendant la grossesse entraîne de graves effets négatifs à court et à long terme aussi bien pour la mère que pour l'enfant à naître, comme l'ont montré de nombreuses études [41]. Il s'agit du risque environnemental majeur que peut rencontrer le fœtus. Si on la compare avec d'autres risques dans la période prénatale, l'exposition à la fumée de tabac est considérée comme parmi les plus nuisibles. Les sous-produits de la combustion sont soupçonnés d'infliger plus de dégâts au fœtus que la nicotine elle-même, mais en raison de la complexité et du nombre élevé de substances dangereuses dans la fumée de tabac, on ne sait pas quel effet toxique est causé par quel produit.

La majorité des dommages causés par les cigarettes au fœtus sont pérennes et la médecine moderne offre très peu voire pas de traitement thérapeutique des conséquences à long terme développées par le fœtus [42]. Une augmentation des malformations cardiaques chez les fœtus est ainsi directement corrélée avec le nombre des cigarettes fumées par la mère. Le tabagisme

maternel est susceptible d'affecter le développement rénal de l'enfant pouvant conduire à une hypertension et des maladies rénales dans la vie adulte. Le tabagisme au cours de la grossesse diminue la fonction pulmonaire du futur adulte et augmente la respiration sifflante, l'asthme et les infections respiratoires. En outre, un risque élevé de divers défauts gastro-intestinaux est observé chez les nourrissons des fumeurs. Le tabagisme maternel favorise également l'augmentation de l'Indice de Masse Corporel (IMC) des enfants et augmente donc le risque d'obésité. Enfin, le tabagisme maternel durant la grossesse est associé à la diminution de la taille du cerveau du fœtus conduisant à une baisse des fonctions neurologiques, à une moindre capacité d'intégration visio-motrice et à une diminution de la compétence verbale et la compréhension du langage [43].

Effets sur le placenta

Le tabagisme maternel qu'il soit actif ou passif se manifeste par de nombreux effets néfastes indépendamment du trimestre de gestation. La fumée de cigarette contient en effet des taux élevés de molécules potentiellement cancérigènes sans oublier la nicotine qui représente son composant majoritaire et qui ont un très faible poids moléculaire et une grande solubilité dans l'eau, ce qui leur permet de traverser facilement la barrière placentaire. Leurs métabolites peuvent également être toxiques : c'est ainsi que le métabolite de la nicotine, la cotinine, passe librement la barrière placentaire et se trouve du côté fœtal, avec comme conséquence une exposition à des concentrations plus élevées que chez la mère. Bien que les enzymes xénobiotiques placentaires peuvent détoxifier les composés chimiques étrangers, les constituants du tabac exercent des effets directs sur la prolifération des villosités cytotrophoblastiques et leur différenciation [44–46].

Le tabagisme pendant la grossesse est associé à une diminution de toutes les fonctions biologiques placentaires, ce qui conduit progressivement à un retard de croissance intra-

utérine. C'est ainsi que la fumée de tabac modifie la prolifération et la différenciation des trophoblastes et réduit le flux sanguin dans la circulation ombilico-placentaire [47]. En accord avec ces observations, les placentas de mères fumeuses montrent des signes morphologiques de perfusion réduite [48]. Compte tenu des effets connus de la nicotine, il est peu surprenant que le placenta des fumeuses présente des différences morphologiques spectaculaires avec celui des non-fumeuses. Ces différences peuvent être observées à partir de caractéristiques anatomiques brutes telles que l'augmentation des calcifications ou à l'examen microscopique où l'on observe un changement dans la taille et le volume cellulaire des villosités choriales et du volume de l'espace intervilloux. Les vaisseaux sanguins fœtaux montrent également des signes d'angiogénèse adaptative. Les changements du système vasculaire intrinsèque du placenta pourraient faire partie d'un mécanisme compensatoire qui contribuerait à contrecarrer la baisse du flux sanguin vers l'embryon/fœtus [49].

Enfin, le placenta est une importante source d'hormones, d'oxydants et d'enzymes anti-oxydantes qui sont en mesure, lors d'une grossesse physiologiquement normale, de garder sous contrôle la peroxydation lipidique [50]. Plusieurs études ont conclu que le tabagisme maternel prénatal perturbe l'équilibre entre oxydants et antioxydants, ce qui peut conduire à un stress oxydatif supplémentaire par rapport à une grossesse normale, augmentant ainsi les dégâts causés par les radicaux libres [51].

Fumée de cigarette et différenciation/prolifération cytotrophoblastique

L'hypothèse que le tabagisme maternel pourrait modifier profondément le développement placentaire en modulant la différenciation des cytotrophoblastes (CTB) a été largement testée par des études à la fois *in vitro* et *in vivo*. Le tabagisme maternel entraîne une moindre prolifération des CTB et une différenciation anormale. La détection par immunohistochimie

de l'antigène Ki-67, un marqueur de prolifération présent au niveau du noyau des cellules en phase S du cycle mitotique, a montré une diminution spectaculaire du nombre de CTB qui expriment cet antigène, ce qui indique que peu de cellules ont achevé leur cycle mitotique sans augmentation de la mort cellulaire [52] .

L'ancrage d'explants de villosités choriales en début de gestation ont montré l'incapacité des CTB à se différencier *in vitro* sous l'action du tabac. La nicotine, principal composé de la cigarette, inhiberait également l'invasion des CTB isolés à partir du placenta de mères non fumeuses pendant le premier trimestre de grossesse. Les cellules traitées ont en effet montré une réduction significative de leur capacité à synthétiser et à activer la collagénase IV requise pour l'invasion ainsi que l'expression de la fibronectine et de son récepteur (intégrine $\alpha 5/\beta 1$) [53].

Fumée de cigarette et système immunitaire

Sur le plan systémique, la fumée de cigarette est associée à la libération de cytokines inflammatoires, à l'activation des cellules inflammatoires et à la restriction des médiateurs anti-inflammatoires. Cette inflammation est caractérisée par l'augmentation de la circulation des molécules inflammatoires telles que les protéines de la phase aiguë. Plusieurs études ont montré que la fumée de cigarette entraîne une augmentation de la sécrétion du TNF ainsi que de l'expression de son récepteur, celle d'IL-6, d'IL-8 et de GM-CSF. L'analyse de l'expression génique en microarray a révélé que les gènes codant les cytokines inflammatoires et les chimiokines sont sur-exprimés après exposition à la fumée de cigarette. Il est probable que ces chimiokines permettent le recrutement des neutrophiles, des macrophages et des DCs qui, à leur tour, amplifient le processus inflammatoire et initie la réponse immune adaptative.

Le tabagisme affecte également le système immunitaire placentaire. Le nombre de macrophages inflammatoires décidaux et de uNK est plus élevé chez les fumeuses que chez

les non-fumeuses et le pourcentage de cellules T régulatrices (T_{reg}) est plus faible chez les fumeuses. L'augmentation du nombre de uNK dans les tissus décidaux des femmes fumeuses pourrait être une réponse au stress oxydatif causé par une altération de la vascularisation suite à l'exposition à la fumée de cigarette. Elle pourrait également être une réponse compensatoire puisque le tabagisme altère l'activité des uNK. Même si cette augmentation compensatoire s'avère nécessaire pour stimuler la vascularisation du placenta, elle pourrait affecter le processus inflammatoire. Il semble en effet que les effets du tabagisme sur les uNK soient différents de ceux observés sur les cellules NK systémiques, tant en production de cytokines que de régulation de la réaction inflammatoire [54,55].

D'autres études ont montré une modification du rapport de macrophages M1/M2 chez les fumeuses. C'est ainsi que, chez les non-fumeuses, des niveaux d'expression élevés de marqueurs de macrophages M2 sont détectés au niveau de la décidua pendant le premier trimestre de grossesse, ce qui promeut la tolérance maternelle ainsi que le remodelage vasculaire. Chez les fumeuses, on note la présence de marqueurs des macrophages M1, indiquant une bascule vers un environnement inflammatoire avec, comme conséquence potentielle, une moindre vascularisation [56].

Enfin, le système immunitaire d'un fumeur est moins efficace que celui d'un non-fumeur dans la lutte contre les infections bactériennes. En particulier, la fumée de cigarette stimule le système hématopoïétique, ce qui se traduit par l'augmentation (jusqu'à 30% par rapport à des non-fumeurs) du nombre de neutrophiles polynucléaires circulants (PMNs, les cellules circulantes les plus abondantes de la lignée blanche). Cette augmentation du nombre de PMNs circulants résulte principalement de l'action de la nicotine sur la sécrétion des catécholamines. Par ailleurs, l'exposition *in vitro* des PMNs à la fumée de cigarette provoque des changements morphologiques de ces PMNs, des altérations métaboliques et une diminution de leurs propriétés fonctionnelles telles qu'activité phagocytaire et antimicrobienne [57].

La nicotine :

Nicotine et autres alcaloïdes du tabac :

La nicotine est un insecticide végétal dans les feuilles de tabac. C'est le principal alcaloïde qui représente environ 1,5% du poids du tabac dans la cigarette et 95% de la teneur totale en alcaloïdes. Le tabac utilisée pour la pipe ou d'une façon orale contient les mêmes concentrations en nicotine que la cigarette alors que les cigares et le tabac à mâcher en contiennent seulement la moitié. Une tige de tabac contient en moyenne 10 à 14 mg de nicotine et de 1 à 1,5 mg de nicotine est absorbé par voie systémique lors d'une fumée de tabac. Dans le tabac la nicotine se présente en grande partie sous la forme lévogyre (S) puisque seulement 0,1 à 0,6 % de la teneur totale en nicotine est sous la forme dextrogyre (R). Le tabac contient également de petites quantités d'alcaloïdes mineurs tel que la nornicotine, l'anatabine, l'anabasine, la myosmine ou autres (figure 2) [58]

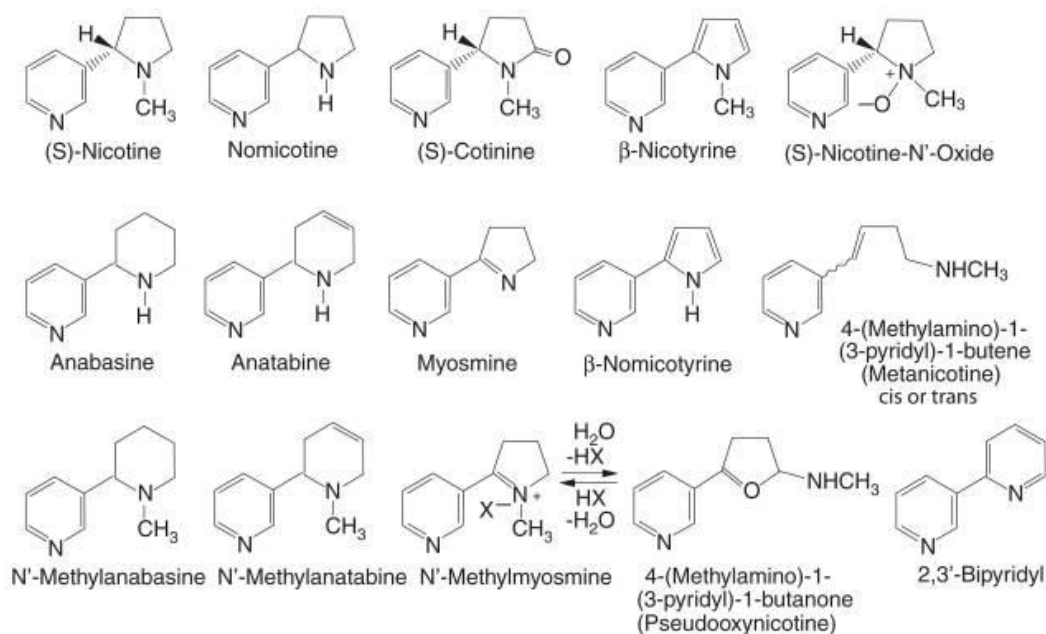


Figure 2 : structure des alcaloïdes du tabac (Benowitz and Jacob (1998))

Absorption de la nicotine :

Lors de la combustion de la cigarette, la nicotine est portée à proximité des gouttelettes de goudrons (phase particulaire) qui sont inhalées. L'absorption de la nicotine au travers des membranes biologiques dépend fortement du pH. La nicotine est une base faible avec un pKa de 8,0. Dans son état ionisé, tel que dans les environnements acides, la nicotine ne traverse pas facilement les membranes. Le pH de la fumée est acide (5,5-6,0). A ce pH la nicotine est essentiellement ionisée. En conséquence, il y a peu d'absorption buccale de la nicotine [59]. Lorsque la fumée atteint les petites voies aériennes et les alvéoles pulmonaires, la nicotine est rapidement absorbée et l'on assiste à une augmentation rapide du taux de nicotine dans le sang lors du *smoking* avec un pic final. Cette absorption rapide à travers les poumons s'explique du fait du pH alcalin (7,4) des alvéoles pulmonaires et des voies aériennes, ce qui facilite son passage à travers les membranes biologiques [58].

Répartition de la nicotine dans les tissus :

Après absorption, la nicotine pénètre dans la circulation sanguine où elle est ionisée à 69% à pH 7,4. Sa liaison aux protéines plasmatiques est inférieure à 5% [60]. La drogue est largement distribuée dans les tissus avec un volume de distribution d'environ 2.6 l/kg. Sur la base de l'autopsie de fumeurs, la concentration la plus élevée de nicotine se situe au niveau du foie, des reins, de la rate et des poumons alors que le tissu adipeux est le tissu où on en trouve le moins. La concentration de nicotine au niveau du muscle squelettique est proche de celle retrouvée dans le sang. Le cerveau est un autre organe cible de la nicotine auquel elle se lie avec une très grande affinité ; cette capacité de liaison est augmentée chez les fumeurs qui présentent un surplus de récepteurs cholinergiques nicotiniques [61,62]. La nicotine s'accumule aussi dans le lait maternel et elle traverse facilement la barrière placentaire. Il

existe ainsi des preuves de l'accumulation de la nicotine dans le sérum fœtal et le liquide amniotique à des concentrations légèrement plus élevées que dans le sérum maternel [63,64]. Le décours temporel de l'accumulation de la nicotine dans le cerveau et dans les autres organes ainsi que les effets pharmacologiques obtenus sont fortement tributaires de son trajet et de son taux. Fumer une cigarette délivre rapidement de la nicotine dans la circulation veineuse pulmonaire à partir de laquelle elle se déplace vers le ventricule gauche du cœur et ensuite dans la circulation systémique artérielle et le cerveau. Le temps de latence entre une bouffée de cigarette et la présence de nicotine dans le cerveau est de 10 à 20 secondes. Les concentrations de nicotine dans le sang artériel après une cigarette peuvent être très élevées et atteindre jusqu'à 1 mg/ml mais sont généralement comprises entre 20 et 60 ng/ml [65].

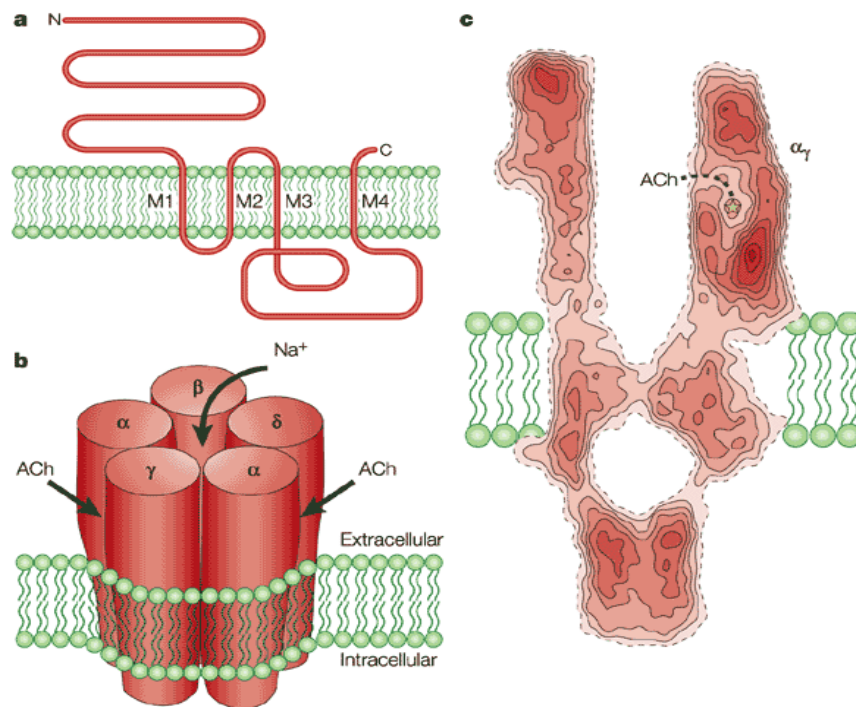
Métabolisme de la nicotine :

La nicotine est métabolisée en un certain nombre de métabolites au niveau du foie. Six métabolites primaires de la nicotine ont été identifiés. Sur le plan quantitatif, le métabolite le plus important dans la plupart des espèces de mammifères est la cotinine. Chez l'homme, environ 70 à 80% de la nicotine est convertie en cotinine. Cette transformation comprend deux étapes : la première est médiée par le cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) et donne la nicotine- $\Delta 1'(5)$ -iminium en équilibre avec la 5'-hydroxynicotine. La deuxième étape est catalysée par une aldéhyde oxydase cytoplasmique. Le nicotine N'-oxyde est un autre métabolite important, 4 à 7% de la nicotine absorbée étant métabolisée par cette voie [66]. En plus de l'oxydation de l'anneau pyrrolidique, la nicotine peut être métabolisée par deux voies non oxydatives : la méthylation de l'azote de l'anneau pyrimidique donne naissance à l'ion isomethonium (appelé aussi N-methylnicotinium) et la glucoronidation [67].

Structure des récepteurs nicotiniques :

La nicotine agit exclusivement via des récepteurs spécifiques, les récepteurs nicotiniques. Ces récepteurs appartiennent à la superfamille Cys-loop, toutes leurs sous-unités contenant dans leur domaine extracellulaire N-terminal une paire de cystéines liées par un pont disulfure et séparées par 13 résidus. Cette superfamille Cys-loop comprend les récepteurs cholinergiques (neuraux et musculaires), le récepteur sérotoninergique de type 3 (5-HT₃), les récepteurs GABAergiques A et C, les récepteurs de la glycine et, chez les invertébrés, les récepteurs de Glutamate 7 et Histidine 8 [68].

Les récepteurs nicotiniques sont des canaux ioniques dont le ligand endogène est l'acétylcholine, un médiateur de la transmission synaptique rapide dans les neurones mais qui a aussi des fonctions différentes dans les cellules non neuronales, non excitables. Les différents sous-types de récepteurs nicotiniques sont constitués par un assemblage de sous-unités α (récepteurs homomères) ou de sous-unités α et non α (récepteurs hétéromères) (figure 3). Chez les mammifères, il existe dix sous-unités α ($\alpha 1$ - $\alpha 10$), quatre sous-unités β ($\beta 1$ - $\beta 4$), une sous-unité δ et une sous-unité ϵ ou γ . On pourrait penser que cette diversité peut engendrer un très grand nombre de récepteurs (environ 20.000), mais cet assemblage entre les différentes sous-unités requiert une interaction appropriée entre les sous-unités, ce qui réduit considérablement le nombre de récepteurs fonctionnels. A cet égard, les différentes combinaisons de sous-unités forment des récepteurs spécifiques avec des propriétés physiologiques et pharmacologiques différentes. Les récepteurs nicotiniques sont des glycoprotéines pentamériques où chaque sous-unité possède 4 domaines membranaires (M1-M4), les domaines M2 formant le canal ionique [69–71]. Plusieurs sous-unités du récepteur nicotinique ont été retrouvées dans les cellules non neuronales telles que les cellules endothéliales, les cellules épithéliales, les trophoblastes, les kératinocytes, les thymocytes, les lymphocytes, les adipocytes, les cellules pancréatiques β , la microglie et les astrocytes [72].



Nature Reviews | Neuroscience

Figure 3 : Structure des récepteurs nicotiniques. a) le motif d'enfilage des sous-unités à travers la membrane. b) représentation schématique de la structure quaternaire du récepteur nicotinique musculaire montrant l'enlacement de la nicotine (entre la sous-unité α/δ et α/γ). c) coupe transversale à travers la structure 4,6-Å du récepteur déterminé par microscopie électronique. La ligne pointillée indique le chemin proposé de site de liaison [73].

Exposition prénatale à la nicotine

Le tabagisme maternel actif ne représente qu'une voie de l'exposition fœtale à la nicotine. D'autres voies comprennent l'exposition de la femme enceinte à la fumée ambiante d'autres fumeurs, l'utilisation d'autres produits du tabac sans pour autant les fumer tel que le tabac à chiquer et l'utilisation d'autres produits qui ne sont pas liés au tabac mais qui contiennent de la nicotine tels que les médicaments utilisés lors d'une thérapie de remplacement de nicotine. De plus, l'exposition prénatale à la nicotine est souvent plus difficile à quantifier puisque la concentration en nicotine diffère d'une cigarette à une autre, et dépend également de la façon dont un fumeur fume sa cigarette [74].

Effets de la nicotine sur le placenta

On estime qu'il y a plus de 4.000 produits chimiques dans la fumée de cigarette dont la nicotine, à qui l'on doit l'effet addictogène de la cigarette. L'exposition *in utero* à la nicotine est associée à un risque accru de développer des effets indésirables, ce qui suggère qu'elle affecte directement le développement du placenta et la circulation foeto-maternelle. Ainsi, l'exposition de rats gravides à la nicotine réduit la croissance fœtale et le poids de naissance, un effet similaire à celui observé chez la femme enceinte. Toujours chez le rongeur, l'invasion du trophoblaste se fait par 2 voies différentes : l'invasion du trophoblaste endovasculaire impliquant des cellules géantes du trophoblaste et l'invasion du trophoblaste interstitiel impliquant des cellules à glycogène [75,76]. L'effet de la nicotine sur les deux voies est le même : inhibition de l'invasion des trophoblastes et de leur différenciation et diminution de l'activité des métalloprotéases (MMPs), en particulier de la MMP-9 exprimée par les trophoblastes à un stade précoce de la gestation. Il a été aussi montré que la nicotine affecte le développement de la vascularisation surtout au niveau du labyrinthe placentaire, zone clé

d'échanges entre la mère et son fœtus. Ces effets pourraient être corrélés avec la diminution de l'expression de Endocrine gland-derived endothelial growth factor (EG-VEGF) connu pour être un facteur important de la mise en place du placenta en régulant la prolifération du trophoblaste et la vascularisation interplacentaire [77].

CHAPITRE II

A. Le Stress Oxydatif

La vie aérobie est apparue il y a environ 2,2 milliards d'années suite à l'évolution de la photosynthèse par les cyanobactéries et leur capacité à tirer profit de l'énergie solaire pour décomposer la molécule d'eau. L'oxygène (O_2) libéré a contribué à la formation des oxydes métalliques présents actuellement dans les rochers et les minerais. Ce n'est qu'ensuite que l' O_2 s'est accumulé dans l'atmosphère [78]. Ce surcroît d' O_2 atmosphérique a permis d'une part la formation de la couche d'ozone (O_3) dans la stratosphère protégeant ainsi les organismes vivants des radiations ultraviolettes-C (UV-C) et d'autre part de former des complexes ferriques insolubles [79]. L' O_2 est utilisé dans pléthore de réactions biochimiques fondamentales tel que la croissance cellulaire, le développement ou encore la reproduction. En dépit de sa polyvalence biochimique, plus de 90% de l'oxygène est utilisé dans la respiration cellulaire en étant l'accepteur final des électrons qui cheminent tout au long de la chaîne respiratoire mitochondriale [78]. Au cours de la phosphorylation oxydative et autres réactions de transfert d'électrons, des métabolites secondaires de l'oxygène hautement réactifs peuvent se former dans les cellules. Ces métabolites sont souvent réunis sous le terme de « *reactive oxygen species* » ou ROS et leur génération expose la cellule vivante au « paradoxe d'oxygène » : l' O_2 est essentiel à la vie mais il s'agit également d'un gaz toxique à caractère mutagène, les ROS pouvant facilement devenir une source de lésions tissulaires [79].

B. Les radicaux libres

Définition

Les radicaux libres sont des molécules contenant des électrons non appariés qui leur confèrent une grande instabilité et un haut degré de réactivité. Les substances réactives oxygénées représentent la plus importante catégorie de ces espèces générées dans les systèmes vivants [80]. Les radicaux libres les plus courants sont le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle ($OH^{\cdot}$) et le monoxyde d'azote ($NO^{\cdot}$). D'autres molécules, comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'ion peroxynitrite ($ONOO^-$), sont des substances oxygénées réactives non radicalaires : ce ne sont pas des radicaux libres mais des dérivés de radicaux libres et ils peuvent en générer par différentes réactions chimiques [81].

Substances oxygénées réactives et leurs modes de production

ROS d'origine mitochondriale

Le radical superoxyde

Lors du métabolisme oxydatif, 2 à 5 % de l'oxygène consommé est converti en radical superoxyde. Des électrons s'échappent de la chaîne respiratoire et se fixent directement sur l'oxygène moléculaire (O_2), selon la réaction : $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\cdot-}$ [81]. Il est relativement peu réactif dans les conditions physiologiques et ne traverse pas les membranes cellulaires mais peut se transformer en intermédiaire plus puissant en la présence d'oxyde nitrique (NO, monoxyde d'azote). L'anion superoxyde peut être converti enzymatiquement en peroxyde d'oxygène (H_2O_2) par différentes isoformes de la superoxyde dismutase [82].

Le peroxyde d'hydrogène

H₂O₂ existe naturellement chez les êtres vivants comme sous-produit de la respiration cellulaire. Il provient notamment de la dismutation enzymatique de l'O₂^{•-} selon la réaction suivante : $2\text{O}_2^{\bullet-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ mais peut également découler d'une dismutation non enzymatique de l'O₂^{•-} ou encore de la réduction directe de l'oxygène [83]. Il s'agit d'un puissant agent oxydant non radicalaire qui peut oxyder ou réduire plusieurs ions inorganiques en solution aqueuse et a la faculté de traverser aisément les membranes biologiques. Son interaction avec l'anion superoxyde ou les ions métalliques divalents tels que le fer ou le cuivre peut donner lieu à un radical très réactif qui est l'hydroxyle d'oxygène (OH[•]) selon la réaction d'Haber-Weiss et la réaction de Fenton respectivement: $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2^{\bullet-} \rightarrow \text{OH}^{\bullet} + \text{OH}^- + \text{O}_2$ et $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}_2^+ \rightarrow \text{OH}^{\bullet} + \text{OH}^- + \text{Fe}_3^+$. Il est généralement éliminé par l'action de la catalase ou de la glutathion peroxydase [82].

Le radical hydroxyle

Dans les organismes vivants deux espèces majeures de ROS se forment en continue lors de la réduction de l'O₂ en eau : le radical superoxyde et le radical hydroxyle (OH[•]). Dans la réaction d'Haber-Weiss le OH[•] est généré en présence de H₂O₂ et des ions fer (Fe²⁺). OH[•] peut être généré in vitro en présence d'acide ascorbique et de fer en absence d'un agent réducteur où l'un des électrons du groupe OH[•] est transféré à l'ion ferrique avec création d'un ion ferreux, constituant un cas particulier de la réaction de Fenton : $\text{Fe}_3^+ + \text{HO}^- \rightarrow \text{Fe}_2^+ + \text{OH}^{\bullet}$ [84]. La durée de vie de OH[•] est de l'ordre de 10⁻⁹ s, ce qui en fait le radical biologiquement le plus actif. S'il ne peut diffuser de son site de production dans les systèmes biologiques, il peut en revanche endommager les macromolécules environnantes telles que les acides aminés, les carbonyles, les lipides, les acides nucléiques avec formation de déoxyguanidine (8-OH-dG), un marqueur fiable du dommage d'ADN dépendant des ROS [82].

Autres sources de ROS

Des ROS peuvent être également produits suite à diverses réactions d'oxydation (lors du métabolisme des purines par la xanthine oxydase, lors de l'auto-oxydation des catécholamines ou suite à leur métabolisme par la monoamine oxydase, lors du métabolisme de l'acide arachidonique par les lipooxygénases...). Par ailleurs, lors des réactions inflammatoires, les cellules phagocytaires activées peuvent produire une grande quantité de ROS (flambée oxydative ou *oxidative burst*) [81]. Le cytochrome P450 tout comme les microsomes et les peroxysomes sont également des sources de ROS, en particulier $O_2^{\cdot-}$ et H_2O_2 . Plus de 80% du H_2O_2 produit au niveau des sites d'hypoxie *in vivo* a pour origine les microsomes. Les peroxysomes sont connus pour engendrer la formation d' H_2O_2 mais pas d' $O_2^{\cdot-}$ dans les conditions physiologiques. Les ROS peuvent aussi se former par des processus exogènes via des agents environnementaux cancérigènes non génotoxiques. L'induction d'un stress oxydatif a été observé après exposition à divers xénobiotiques tels que les substances chloridées nom ???, les métaux oxydo-réducteurs que non redox, les ions, les rayonnements ultraviolets et les barbituriques [80].

Les défenses antioxydantes

Définition

Le terme d'antioxydant se réfère à un ensemble de composés possédant un large terrain de mécanismes d'actions [85]. Selon Halliwell, « un antioxydant est une substance qui, lorsqu'elle est présente à de faibles concentrations par rapport à celles d'un substrat oxydable, est capable de retarder d'une façon significative ou d'inhiber complètement l'oxydation de ce substrat » [86].

Caractéristiques d'un antioxydant

Un bon antioxydant devrait : (i) éliminer d'une manière spécifique les radicaux libres ; (ii) chélater les métaux de transition ; (iii) interagir avec d'autres antioxydants ; (iv) être facilement absorbé ; (v) avoir une concentration et une pertinence dans les tissus et (vi) être actif aussi bien dans les domaines aqueux et membranaire [80]. L'effet des ROS est contrebalancé autant par l'action des enzymes antioxydantes que les antioxydants non enzymatiques et ceci offre une protection maximale des sites biologiques. Ces défenses comportent la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPx), la catalase (CAT), l'acide ascorbique (Vitamine C), l' α -tocophérol (Vitamine E), le glutathion (GSH), les β -carotènes, la vitamine A... [87].

Superoxyde Dismutase

L'une des enzymes antioxydantes intracellulaires les plus importantes est la SOD. Elle catalyse la dismutation de l' $O_2^{\bullet-}$ en O_2 et H_2O_2 . La SOD existe sous plusieurs isoformes différentes selon la nature du métal dans leur site actif, leur composition en acides aminés, le nombre des sous-unités et leurs cofacteurs. Chez l'homme, on dénombre trois isoformes : (i) la SOD mitochondriale (Mn-SOD), la Cu,Zn-SOD et la SOD extracellulaire (EC-SOD) [88]. Une autre classe de SOD complètement distincte contenant du nickel dans son site actif (Ni-SOD) a été récemment découverte dans les cyanobactéries et les streptomyces : c'est une petite protéine de 117 acides aminés sans homologies de séquence avec les autres isoformes [80]. Les SOD neutralisent $O_2^{\bullet-}$ par oxydations et réductions successives des métaux de transition de son site actif [87].

Catalase

La catalase est une enzyme présente dans les cellules des animaux, des végétaux et des bactéries. Elle est localisée dans les peroxysomes. Elle assure d'une façon très efficace la

conversion du H_2O_2 en O_2 et eau : une molécule de catalase peut ainsi convertir environ 6 millions de molécules de H_2O_2 par minute. La diminution de capacité de certaines tumeurs à détoxifier H_2O_2 est liée à une diminution des catalases [80].

La glutathion peroxydase

Il existe deux isoformes de GPx, l'une étant dépendante du sélénium et l'autre indépendante de ce sélénium (glutathione-S-transférase, GST). Ces deux enzymes diffèrent par le nombre de leurs sous-unités, la nature de la liaison du sélénium au centre actif et leurs mécanismes catalytiques. Leurs propriétés antioxydantes leur permettent d'éliminer les peroxydes. La GPx agit en conjonction avec le tripeptide glutathion (GSH) présent dans les cellules à de grandes concentrations (de l'ordre du micromolaire). Le substrat des GPx est H_2O_2 ou un peroxyde organique ROOH. La réaction est donc du type : $2\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GSSG} + 2\text{H}_2\text{O}$; $2\text{GSH} + \text{ROOH} \rightarrow \text{GSSG} + \text{ROH} + \text{H}_2\text{O}$ avec formation d'eau et d'alcool [80].

C. Les astrocytes

Présentation générale

Les cellules gliales représentent la majeure population cellulaire du névraxe (environ 90% des cellules sont des cellules gliales, contre seulement 10% de neurones chez l'homme). Le terme de « glie » a été introduit en 1858 par Rudolf Ludwig Karl Virchow, pour qui ces cellules étaient un tissu conjonctif dépourvu d'éléments cellulaires [89]. La diversité des cellules gliales a été ensuite mise en évidence par Camillo Golgi et Santiago Ramon y Cajal. Les cellules gliales du système nerveux central (SNC) sont actuellement classées en quatre types principaux : les astrocytes, les oligodendrocytes, les cellules NG2 et les cellules microgliales. Les cellules épendymaires, présentes au niveau des ventricules et responsables de la production et de la circulation du liquide céphalo-rachidien, sont également considérées comme des cellules gliales. Au niveau du système nerveux périphérique, on trouve essentiellement les cellules de Schwann. Les astrocytes et les oligodendrocytes dérivent, tout comme les neurones, du neuroépithélium formant le tube neural. Leurs progéniteurs se différencient en neuroblastes ou glioblastes. Les cellules microgliales, quant à elles, dérivent du mésoderme hémangioblastique et leurs progéniteurs sont des macrophages fœtaux [90].

En raison de leur incapacité à émettre des potentiels d'action, les cellules gliales ont longtemps été considérées comme de simples cellules de soutien ou cellules « nourricières » des neurones. Cette vision de cellules « passives » est aujourd'hui obsolète, puisqu'il est avéré que les cellules gliales, et spécialement les astrocytes, utilisent une autre forme d'excitabilité que l'excitabilité électrique [91].

Physiologie et fonctions générales des astrocytes

Les astrocytes sont les cellules majoritaires du SNC. Elles doivent leur nom à Michael Von Lenhossek, en raison de leur morphologie étoilée. Cette classe de cellules comprend différents types cellulaires, dont les principaux représentants sont les astrocytes protoplasmiques présents dans la substance grise et les astrocytes fibreux présents dans la substance blanche. Les fonctions astrocytaires sont aussi diverses qu'essentiels puisqu'elles sont impliquées dans le maintien de l'homéostasie ionique et énergétique et interviennent dans la synaptogenèse, la transmission neuronale et la plasticité synaptique [90].

Organisation spatiale

Au sein du SNC, les astrocytes sont organisés de façon particulière, ce qui leur permet d'interagir entre eux ainsi qu'avec les neurones.

Organisation en syncytium

Les astrocytes sont couplés entre eux et forment un syncytium astrocytaire. Plus précisément, ce sont des jonctions communicantes de type gap qui sous-tendent ce couplage [92]. Les jonctions de type gap sont présentes dans différents types cellulaires où elles permettent des échanges métaboliques ou ioniques. D'un point de vue structurel, ces jonctions sont formées par l'apposition de structures particulières appelées connexons (ou hémicanaux). Un connexon est formé par l'assemblage de six sous-unités, appelées connexines, dont il existe 20 sous-types différents. Le pore du canal est formé par l'assemblage des deux connexons sur deux cellules voisines et permet la diffusion de petites molécules (inférieures à environ 1 kDa). Le couplage via ce type de jonctions permet donc la diffusion de certains ions ou petites molécules telles que certains transmetteurs. Ce mécanisme permet par exemple de redistribuer le potassium suite à sa recapture ou le passage interastrocytaire de molécules de signalisation comme l'ATP, l'IP3 ou le glutamate [93,94].

Organisation en « îlots synaptiques fonctionnels »

Au-delà de leur organisation en syncytium, les astrocytes présentent un niveau d'organisation territorial particulier. De manière intéressante, il a été montré que les astrocytes occupent des territoires séparés ne se recouvrant que très peu, au niveau de leurs prolongements astrocytaires. Grâce à cette organisation, les astrocytes ne créent pas seulement un espace entre eux mais établissent des territoires qui sont exclusifs [95]. Cette organisation territoriale implique des conséquences fonctionnelles majeures. Des études de microscopie électronique ont montré que les prolongements astrocytaires sont capables d'entrer en contact avec les corps cellulaires, les dendrites, les épines dendritiques ou les terminaisons pré-synaptiques des cellules neuronales avoisinantes [96]. Cette organisation a donné naissance au concept de synapse tripartite où l'élément neuronal pré-synaptique et post-synaptique sont enrobés par un prolongement astrocytaire [97]. Un même neurone peut traverser plusieurs territoires astrocytaires, permettant une régulation différentielle de ses différents compartiments subcellulaires. A l'inverse, un même astrocyte peut réguler l'activité de plusieurs neurones (quelques somas et des centaines de dendrites). Cette organisation particulière définit des « îlots synaptiques fonctionnels » qui pourraient permettre de réguler de manière coordonnée plusieurs synapses de différents neurones [98].

Ainsi, les astrocytes présentent différents niveaux d'organisation qui leur permettent de réguler l'activité neuronale de manière sélective. Leur organisation en îlots fonctionnels confère un premier niveau de régulation, dont la spécificité est majorée par le faible degré de recouvrement entre astrocytes. Ces îlots synaptiques pourraient être eux-mêmes regroupés en territoires fonctionnels. Enfin, le syncytium astrocytaire représente un troisième niveau de régulation qui permet, dans certaines conditions, d'accéder à une communication et, probablement, à une régulation à distance [99].

Fonctions des astrocytes chez l'adulte

A l'heure actuelle, l'importance et la diversité des fonctions astrocytaires sont largement reconnues. Ces cellules interviennent dans le maintien de l'équilibre énergétique, ionique et hydrique, dans la régulation de la concentration en neurotransmetteurs dans l'espace synaptique et extrasynaptique et dans la libération de gliotransmetteurs.

Maintien du métabolisme énergétique et de l'homéostasie ionique

Bien que représentant seulement 2% du poids du corps humain, le cerveau consomme environ 20% du glucose et de l'oxygène qu'il puise dans la circulation sanguine. Le glucose traverse la barrière hémato-encéphalique par le biais de transporteurs du glucose (GLUT) exprimés par les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins. Une fois dans l'espace extra-cellulaire, il est recapté par les neurones et les astrocytes, exprimant tous deux des transporteurs GLUT. Les neurones consomment 90% de l'énergie mais la recapture du glucose est équivalente dans les deux types cellulaires. Les astrocytes servent ensuite de « support métabolique » aux neurones via le cycle du lactate. Après recapture du glucose, celui-ci est transformé en pyruvate puis en lactate, grâce à la glycolyse. Le lactate est alors transféré dans l'élément neuronal, où il entre dans le cycle tricarboxylique afin de fournir de l'ATP, principal substrat énergétique impliqué dans les fonctions neuronales [100,101] (figure 4).

Outre la régulation du métabolisme énergétique, les astrocytes sont impliqués dans le maintien de l'homéostasie ionique grâce à l'expression de différents transporteurs et canaux ioniques. Le contrôle de la concentration ionique extracellulaire est primordial car toute modification affecte les propriétés membranaires et donc l'excitabilité des cellules. Lors d'une transmission de potentiel d'action, la recapture du potassium extracellulaire s'accompagne d'une augmentation du volume d'eau dans les astrocytes. Par ailleurs, la

recapture de l'eau au niveau de la synapse permettrait de diminuer le volume de la fente synaptique, concentrant ainsi les neurotransmetteurs libérés. Enfin, les astrocytes régulent les échanges d'eau entre le sang et le parenchyme cérébral, assurant le maintien de l'homéostasie de l'eau [102].

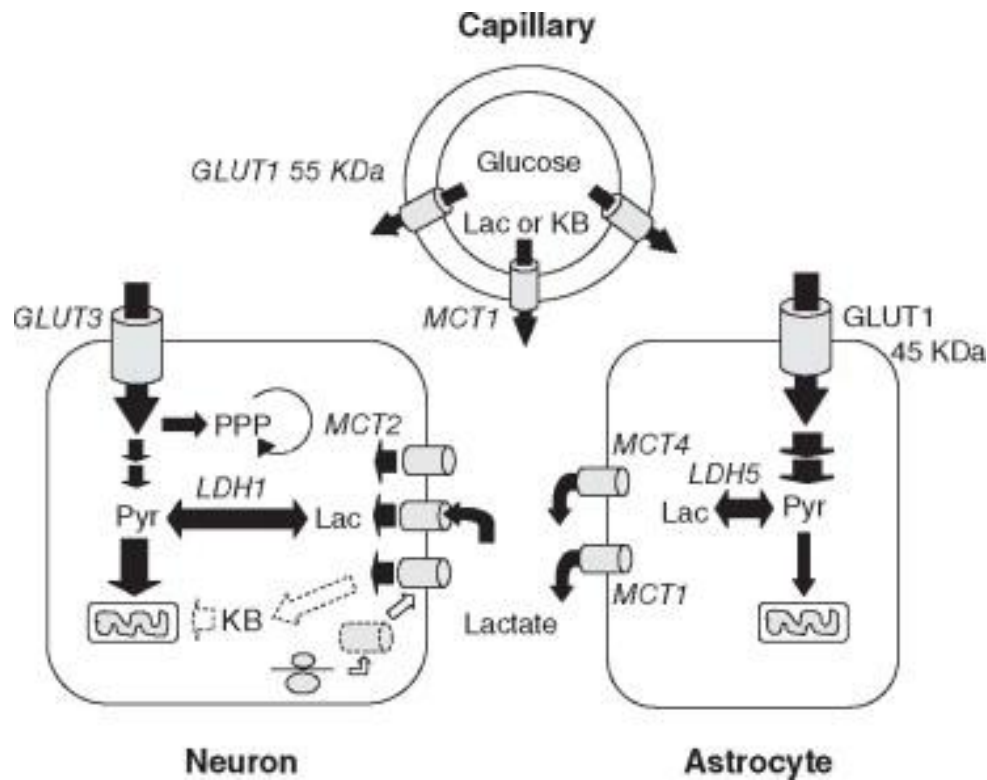


Figure 4 : Représentation schématique de la recapture du glucose et de la glycolyse dans les astrocytes et les neurones. Le glucose est transporté dans le milieu intracellulaire grâce aux transporteurs GLUT3 dans les neurones et GLUT1 dans les astrocytes. Le glucose entre alors dans le cycle de la glycolyse. Au niveau de l'astrocyte la glycolyse permet de libérer du lactate dans le milieu extracellulaire (via l'action des transporteurs MCT1 et 4). Le lactate est recapté par le neurone via l'action des transporteurs MCT2. Celui-ci est transformé en pyruvate via l'action de la LDH1 et sert alors de substrat énergétique au neurone. MCT : monocarboxylate transporter, LDH : lactate déshydrogénase

Recapture des neurotransmetteurs

Les transporteurs des neurotransmetteurs permettent aux astrocytes de maintenir l'homéostasie des neurotransmetteurs et de réguler leur action dans la fente synaptique. La recapture du glutamate utilise les gradients électrochimiques du sodium et du potassium : l'entrée d'une molécule de glutamate est couplée à celle de trois ions Na^+ et un H^+ et à la sortie d'un ion K^+ . Cette recapture permet de lutter contre les phénomènes d'excitotoxicité liés à ce neurotransmetteur.

Libération de gliotransmetteurs

L'une des découvertes les plus récentes concernant les astrocytes est leur aptitude à libérer des gliotransmetteurs capables de moduler l'excitabilité neuronale ou la transmission synaptique. Le premier gliotransmetteur mis en évidence a été le glutamate, puis d'autres comme l'ATP et la D-sérine ont suivi. Il a été plus récemment montré que les astrocytes sont également capables de libérer du GABA ou des neuropeptides. Dans le domaine de la gliotransmission, le mécanisme de libération reste encore hypothétique. En effet, certaines études font état d'une exocytose alors que d'autres mettent en avant des mécanismes non vésiculaires. La libération vésiculaire (ou exocytose) est la principale voie de libération des neurotransmetteurs par les neurones. Cette voie est dépendante du calcium et fait intervenir une machinerie protéique spécifique [99].

Le calcium : élément clé de l'excitabilité astrocytaire

La vision des astrocytes comme étant des cellules « passives » est aujourd'hui obsolète. Les travaux d'Ann Cornell-Bell et Steve Finkbeiner en 1990 ont montré que les astrocytes sont dotés d'une excitabilité reposant sur des variations intracellulaires de calcium [103]. En culture cellulaire, ce signal calcique s'étend à tout le réseau astrocytaire sous forme de vague

calcique. Cette diffusion se ferait selon un mécanisme régénératif, par diffusion d'inositol triphosphate (IP_3) et de Ca^{2+} via les jonctions gap ou via la libération d'ATP (qui agirait de façon paracrine, en provoquant la libération d' IP_3 dans la cellule voisine). L'intervention du Ca^{2+} en tant que messenger repose sur ses variations de concentrations intracellulaires, régulées grâce à de nombreux acteurs impliqués notamment dans sa libération ou son extrusion. De manière générale, les cellules gliales comme les neurones, ont accès à deux sources de calcium. Une source extracellulaire, où l'entrée de Ca^{2+} est permise par des canaux calciques dépendant du voltage (Ca_v), des récepteurs ionotropiques couplés à une conductance calcique et des canaux activés par la déplétion des stocks internes. Une seconde source se trouve au sein du réticulum endoplasmique (RE). Lors du déclenchement de signaux Ca^{2+} , la concentration intracellulaire de Ca^{2+} peut passer de 30-40 nM à 200-800 nM. De trop grandes concentrations étant néfastes pour la cellule, il existe des systèmes tampons et différents moyens d'extrusion pour réguler les concentrations de cet ion. Ainsi, le Ca^{2+} est extrudé dans le compartiment extracellulaire par l'action de pompes calciques ou par l'action d'échangeurs Na^+ / Ca^{2+} . Au niveau du RE, ce sont principalement des pompes de type SERCA (pour « sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPases ») qui permettent la recapture du Ca^{2+} [99].

EXPOSE DES TRAVAUX

A. Article 1

Cigarette smoking interferes with placenta macrophage functions:

A new mechanism to compromise pregnancy

Rym Belhareth, Amira Ben Amara, Céline Chartier, Mohamed Amri, Jean-Louis Mege

Soumis à publication

Malgré les efforts concertés de la plupart des chercheurs et des professionnels de la santé, le tabagisme maternel durant la grossesse demeure un grave problème de santé publique. Environ 20 à 30% des femmes enceintes fument pendant leur grossesse et seulement une minorité d'entre elles abandonnent la cigarette pendant leur gestation. Ainsi, le tabagisme actif par la mère expose le fœtus en développement à des agents qui peuvent traverser la barrière placentaire et interférer avec les fonctions placentaires. En plus des fonctions homéostatiques du placenta, un large éventail de fonctions immunologiques, y compris les réponses immunitaires innées et adaptatives, pourraient être compromises.

Dans cette étude, j'ai évalué l'effet de l'extrait de la fumée de cigarette (CSE) sur les macrophages isolés à partir de placentas humains (pMφs), qui sont les principaux partenaires de l'immunité innée foeto-maternelle. Le CSE inhibe la formation de cellules géantes multinucléées (MGCs). Cette propriété est spécifique aux macrophages car la fusion des macrophages dérivés de monocytes est également inhibée lors de la formation de granulomes *in vitro*. L'ingestion de parois de levure (zymosan) par les pMφs est inhibée par le CSE, ce qui suggère que le CSE interfère avec les récepteurs phagocytaires des pMφs. En outre, le CSE augmente la libération du TNF et de l'IL-33 par les pMφs et diminue celle de l'IL-10, ce qui suggère qu'il affecte l'équilibre entre cytokines inflammatoires et anti-inflammatoires. Enfin,

le CSE accroît l'expression des gènes des métalloprotéinases (MMPs) connues pour être impliqués dans le remodelage tissulaire et la fusion cellulaire

Cigarette smoking interferes with placenta macrophage functions:

A new mechanism to compromise pregnancy

Rym Belhareth,^{1,2} Amira Ben Amara,¹ Céline Chartier,¹

Mohamed Amri,² Jean-Louis Mege¹

Short title: Cigarette smoking and placenta macrophages

¹Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses Tropicales et Emergentes, Aix-Marseille Université, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 7278, INSERM U1095, 13385 Marseille, France

²Laboratoire de Neurophysiologie Fonctionnelle et Pathologies UR/11ES09. FST Campus Universitaire 2092 El Manar Tunis, Tunisie.

Corresponding author:

Rym BELHARETH. Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses Tropicales et Emergentes, Aix-Marseille Université, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 7278, INSERM U1095, 13385 Marseille, France. Mail to: rymbelhareth@gmail.com

Abstract

Smoking is a major public health issue and the increasing number of female smokers is a new feature of tobacco toxicity. Hence, active smoking by the mother exposes the developing fetus to agents that can cross the placental barrier and interfere with placental functions. In addition to the homeostatic functions of the placenta, a wide range of immunological functions, including innate and adaptive immune responses, might be impaired. In this study, we assessed the effect of cigarette smoke extract (CSE) on macrophages isolated from human placentas (pMφs), which are major partners of innate feto-maternal immunity. CSE significantly ($p < 0.001$) inhibited the formation of multinucleated giant cells (MGCs). This property of CSE is specific to macrophages because the fusion of monocyte-derived macrophages is inhibited during the *in vitro* formation of granulomas. We also investigated particle uptake and cytokine production by pMφs exposed to CSE. CSE inhibited the uptake of zymosan, but not that of opsonized zymosan, suggesting that it interferes with phagocytic receptors, not with the phagocytic machinery of pMφs. CSE increased the release of Tumor Necrosis Factor and interleukin-33, and decreased that of interleukin-10, demonstrating that the balance between inflammatory and anti-inflammatory cytokines is affected by CSE. Furthermore, CSE enhanced the expression of metalloproteinase (MMP) genes such as MMP-1, MMP-10 and MMP-12, known to be involved in tissue remodeling including macrophage fusion. Finally, we showed that nicotine, one of the major compounds of tobacco, did not affect the functional properties of pMφs. Taken together, these results suggest that CSE-induced pMφs disruptions may compromise the success of healthy pregnancy independently of nicotine.

Keywords: placental macrophages, cigarette smoking, MGCs, cytokines, MMPs

Introduction

Smoking is one of the most addictive and powerful habits that has influenced the behavior of human beings for over four centuries, even though it results in numerous tobacco-induced diseases. Many women still smoke during pregnancy in developed countries and a growing number of developing countries. The complications of pregnancy due to tobacco include lower fetal growth, spontaneous abortion and premature births [104]. Maternal smoking may also be the main cause of sudden death syndrome in infants [105]. These risks are highly preventable. Nevertheless, smoking remains popular despite major public health campaigns against smoking [106].

The combustion of tobacco at the tip of cigarettes warms aspirated air, causing the evaporation of nicotine and other components. Cigarette smoke contains more than 6,000 different chemical compounds that are present in gaseous and particulate phases and generate toxic components responsible for oxidative stress and tissue inflammation [107] through damage to lipids, proteins, extracellular matrix, DNA and organelles [108,109]. Despite the large number of compounds present in cigarette smoke, nicotine, a poisonous alkaloid and a psychoactive chemical, is thought to be a major contributor of the deleterious effects of cigarette smoke. It is especially responsible for tobacco addiction through binding to nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) [110]. Many studies have shown that inhalation of cigarette smoke affects innate and adaptive immune functions. Indeed, it modulates the release of inflammatory cytokines such as Tumor Necrosis Factor (TNF) and anti-inflammatory cytokines such as interleukin (IL)-10 [111]. It seems that the anti-inflammatory effects of cigarette smoke are mediated by nicotine, oxidants, carbon monoxide and some aromatic compounds [112]. Cigarette smoke also promotes IL-33 secretion in airway epithelial cells and peripheral blood. IL-33 is a member of the IL-1 family that promotes Th2 immune response and is probably involved in chronic obstructive pulmonary disease [113]. The

molecular mechanisms governing the adverse effects of cigarette smoking are beginning to be understood. Hence, cigarette smoke modifies the signaling pathways in immune cells, endothelial and epithelial respiratory cells through acetylation, nitrosilation, carbonylation and oxidation, which in turn results in changes in cell activation, differentiation and surviving [114].

The placenta is a unique active organ that connects the developing embryo to the uterine wall. Placenta is a fetal-maternal tissue, arising from the partial melting of a maternal endometrial tissue, called decidua, and fetal tissue-derived trophoblasts, called chorion. It is permanently remodeled by metalloproteinases (MMPs) that degrade the extracellular matrix in response to hormones, growth factors, and cytokines [115]. One major function of the placenta includes tolerance of the semi-allograft that represents the fetus [116]. Early in pregnancy, the placenta is rich in immune cells, including macrophages (pMφs), T lymphocytes and natural killer cells, which support maternal tolerance to paternal antigens [21,117]. pMφs are abundant at the different stages of gestation [118] and perform fundamental functions including placental construction and fetal protection from infection [16]. These functions are made possible because pMφs respond rapidly to different stimuli from their micro-environment, allowing them to alternate from an inflammatory (M1 macrophages) to an anti-inflammatory (M2 macrophages) profile [119].

There is evidence that cigarette smoke is toxic for the placenta [120]. Indeed, maternal smoking is associated with the abnormal proliferation and differentiation of cytotrophoblasts, leading to thickening of the trophoblastic basement membrane [121]. It also increases collagen content of the villous mesenchyme and decreases tissue vascularization early in pregnancy. These tissue alterations are associated with numerous changes in placental enzymatic and synthetic functions [122]. Among the smoke components that affect placental functions, nicotine likely plays a major role because it diffuses rapidly through the human

placenta due to its low molecular weight and high lipid solubility. Hence, its concentrations is 15% higher in fetal circulation than in maternal circulation [123].

To our knowledge, the direct effect of cigarette smoke on pMφs has not been studied. In this paper, we show that cigarette smoke extract (CSE) affected the capacity of pMφs to form multinucleated giant cells (MGCs). It also impaired functional activities of pMφs including cytokine release and MMP gene expression. These results clearly demonstrate that cigarette smoke dramatically affects pMφ functions and add new features for the deleterious effect of smoke in pregnancy.

Materials and Methods

Cigarette Smoke Extract

CSE was prepared according to the protocol of Su *et al.* with some minor modifications [124]. Briefly, the smoke of one lit cigarette was drawn with a vacuum apparatus that bubbled the mainstream smoke through 1 ml of DMEM-F12 cell medium (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). The extract was then adjusted to pH 7.4 and filtered through a 0.2 μm filter. Aliquots were stored at -80°C and considered as 100% CSE.

Isolation and culture of pM ϕ s

Placentas were collected at the time of delivery from healthy women in the Gynecology-Obstetrics Department of the Hospital de la Conception (Marseille, France) after the approval by the Aix-Marseille University Ethics Committee (N°08-012) and written informed consent by the women. Gestational age ranged from 37 to 40 weeks. Placentas (approximately 200 g) were cut into small pieces and samples were incubated in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) buffered with HEPES, MgSO_4 , 2.5% trypsin (Invitrogen) and DNase I (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) for 45 min at 37°C . The supernatant was subsequently filtered through 100 μm pores in tubes containing 2 ml fetal calf serum (FCS) and centrifuged for 15 min. pM ϕ s were isolated as described previously [125]. In brief, pM ϕ s were recovered by depositing isolated placenta cells onto a Ficoll cushion, followed by centrifugation at $700 \times g$ for 20 min. Mononuclear cells with a density lower than 1.067 were recovered, and the pM ϕ s were isolated using magnetic beads coated with anti-CD14 antibodies (Abs, Miltenyi Biotec, Paris, France). The purity of isolated CD14^{+} cells, checked by flow cytometry, was higher than 97%. Isolated pM ϕ s were cultured in 24-well plates on glass coverslips for 9 days, and the appearance of MGCs was studied as previously described [21]. In brief, pM ϕ s (5×10^5 cells/assay) were cultured in DMEM-F12 containing 10% FCS,

100 U/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin (Life Technologies) in the presence or absence of CSE, α -bungarotoxin (Invitrogen) or nicotine (Sigma-Aldrich). Cell morphology and the percentage of MGCs were determined by microscopic examination using May-Grünwald Giemsa staining. Cell viability was assessed by trypan blue exclusion.

Functional activities of pMφs

The functional activities of pMφs were studied as follows. First, pMφs (2×10^5 cells/assay) were incubated with yeast cell walls (zymosan, 10 particles/cell) conjugated with Alexa-Fluor-555 (Sigma-Aldrich) in the presence of different concentrations of CSE for 6 h at 37°C. In some experiments, zymosan particles were opsonized with 10% AB human serum. After extensive washing to remove unbound particles, pMφs were fixed with 3% paraformaldehyde for 15 min., permeabilized with 0.3% Triton X-100 for 3 min. and incubated with Alexa-Fluor 488 phalloidin to label filamentous actin (F-actin, Invitrogen) and DAPI (Invitrogen) to label cell nuclei for 30 min. Images were captured under a Leica microscope and were processed with Adobe Photoshop software. Second, the ability of pMφs to secrete cytokines was determined by incubating pMφs (5×10^5 cells/assay) with a potent agonist such as *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS, Sigma-Aldrich) used at a concentration of 1 µg/ml in the presence or absence of CSE for 24 h. Culture supernatants were collected and centrifuged at $1000 \times g$ for 10 min. to eliminate cell debris and frozen at -80°C before cytokine determination. TNF, IL-33 and IL-10 levels were determined using ELISA kits (R&D Systems, Lille, France) according to the manufacturer's protocols. Intra-and inter-variability were less than 10 pg/ml. Results are expressed as ng/ml and represent the means $\pm$ SEM of 3 different placentas.

Reverse transcription

Real-time quantitative RT-PCR (qRT-PCR) was performed as previously described [126]. Total cellular RNA was extracted using an RNeasy Mini kit (Qiagen) with a DNase I step to eliminate DNA contaminants before RNA elution and storage at -20°C. Reverse transcription of 150 ng of RNA was performed using the Moloney murine leukemia virus (MMLV) RT kit (Invitrogen) and using SYBR Green Fast Master Mix (Roche Diagnostics, Meylan, France) and Light Cycler 480. Inflammatory, immunoregulatory and MMP genes were selected according to a list published elsewhere [127–129]. All selected primers were designed using Primer3 (version 0.4.0) and their sequences are provided in Table 1. The results of qRT-PCR were normalized using the housekeeping gene β -actin (ACTB) and are expressed as the median of fold change ($FC=2^{-\Delta\Delta C_t}$), where $\Delta\Delta C_t = (C_{tTarget}-C_{tACTB})_{assay} - (C_{tTarget}-C_{tACTB})_{control}$.

Circulating cells and granuloma formation

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from leukopacks (Etablissement Français du Sang, Marseille) after centrifugation through a Ficoll density cushion. Monocytes were selected using magnetic beads coated with anti-CD14 Abs. PBMCs (2×10^6 cells/assay) were incubated in 96-well plates with 800 beads coated with BCG extracts in RPMI 1640 containing 10% FCS and antibiotics as previously described [130] in the presence or absence of CSE. Granulomas, defined as collections of PBMCs that entirely covered beads, were observed under light microscopy every 2 days for 9 days. Individual granulomas were collected, incubated in 2 mM EDTA at 4°C for 15 min. to dissociate cells and MGCs were identified after May-Grünwald-Giemsa staining.

Statistical analysis

Results are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). The data were analyzed with GraphPad Prism using analysis of variance (ANOVA), completed by a post-test (Bonferron's Multiple Comparison Test). Results with a p value < 0.05 were considered significant.

Results

CSE inhibits the formation of MGCs

It has recently been demonstrated that cultured pMφs spontaneously fuse into MGCs and that this pMφ maturation likely plays an important role in normal pregnancy [21]. We wondered whether CSE altered the ability of pMφs to fuse into MGCs. CSE clearly inhibited the formation of MGCs. Indeed, in the absence of CSE, the percentage of MGCs steadily increased, reaching 80% after 9 days. In the presence of 0.2% CSE, the proportion of MGCs did not exceed 20% after 9 days. In the presence of 0.5 and 1% CSE, the formation of MGCs was completely prevented (**Figure 1A**). This was not due to a decreased viability of pMφs because their number remained constant in the presence of 0.5 and 1.0% CSE, whereas it steadily decreased in untreated cells (**Figure 1B**). While pMφ-derived MGCs contained approximately 8 to 10 nuclei/cell in the absence of CSE, the remaining MGCs found after treatment with 0.2% CSE contained only 2 or 3 nuclei. In addition, the size of MGCs was lower in cells treated with CSE than in control MGCs (50-60 μm vs. 100 μm) (**Supplementary figure 1**). Taken together, these data show that CSE inhibits the ability of pMφs to form MGCs.

CSE inhibits the formation of MGCs from myeloid origin

The ability to form MGCs is shared by several cell types including macrophages and epithelial cells. We previously developed an *in vitro* approach to generate granulomas in which macrophages are able to differentiate into MGCs [130]. For that purpose, PBMCs from healthy donors were incubated with BCG-coated Sepharose beads in the presence or the absence of CSE for 9 days. PBMCs were able to form granulomas in the absence of CSE (100% of beads were covered with PBMCs after 3 days). Similar results were obtained with 0.2% CSE. In the presence of 0.5% CSE, the formation of granulomas was lower and

transient: only 60% of granulomas were observed after 6 days and granulomas disappeared after 9 days. No granulomas were observed in the presence of 1% CSE (**Figure 2A**). As the formation of granulomas is associated with the appearance of MGCs, we studied the presence of MGCs among granuloma cells. In the absence of CSE, MGCs contained 6 to 8 nuclei per cell. The number of nuclei per MGC decreased with increasing concentrations of CSE (**Figure 2B**). Taken together, our results suggest that CSE interferes with the formation of MGCs from myeloid origin.

CSE affects cytokine and MMP production by pMφs

We wondered whether the inability of pMφs to form MGCs in the presence of CSE was associated with altered activation status. We first investigated the production of TNF, IL-33 and IL-10. CSE significantly ($p < 0.05$) increased the unstimulated release of TNF (120 pg/ml) and IL-33 (80 pg/ml) only at 1%, but did not affect the release of IL-10 (**Figure 3A**). LPS induced the release by pMφs of high levels of TNF and IL-10 (about 400 and 600 pg/ml, respectively) and, to a lesser extent, that of IL-33 (about 50 pg/ml). Again, CSE at 1% significantly ($p < 0.01$) increased the release of TNF and IL-33, but inhibited ($p < 0.05$) that of IL-10 (less than 200 pg/ml). This effect was dose-dependent (**Figure 3B**). The increased production of TNF and the decreased production of IL-10 observed in LPS-stimulated pMφs may be related to an M1 polarization of pMφs whereas the increased stimulated production of IL-33 might favor an M2 polarization of pMφs. To discriminate between these hypotheses, we analyzed the transcriptional expression of 9 M1 and 8 M2 genes using qRT-PCR. There was no significant difference in the expression of M1 and M2 genes in CSE-treated pMφs whatever the concentration used (**Supplementary table 2**). These results suggest that CSE affects the cytokine imbalance in pMφs without reprogramming macrophages toward an M1 or M2 profile. Secondly, we wondered whether CSE affected the transcriptional expression of

MMPs known to play a major role in tissue remodeling including cell fusion and to reflect cell activation [131]. The expression of MMP transcripts by pMφs was assessed after 24 h using qRT-PCR. CSE at 0.2% had no effect on the expression MMPs in pMφs. In contrast, CSE at higher concentrations (0.5 and 1%) strongly upregulated the expression of MMP-1, MMP-10 and MMP-12, and that of MMP-2, MMP-7 and MMP-9 to a lesser extent (**Figure 4**). Taken together, these results indicate that CSE induces an inflammatory signature in which the expression of MMPs is upregulated.

CSE affects the uptake of zymosan particles

As CSE interfered with the formation of pMφ-derived MGCs and affected their activation status, we investigated one property of macrophages related to cell fusion, i.e. phagocytic ability, using fluorescent zymosan particles. In control pMφs, 95% of cells internalized unopsonized zymosan particles. Zymosan uptake was completely inhibited by 0.5 and 1% CSE. This effect was dose-dependent: approximately 70% of pMφs treated with 0.2% CSE ingested zymosan particles but at a low level. It is noteworthy that the binding of zymosan particles was similarly inhibited by CSE (**Figure 5**). In contrast, CSE, whatever its concentration, had no effect on the uptake of opsonized zymosan (**supplementary Figure 2**), suggesting that CSE does not affect the phagocytic machinery per se.

Does nicotine mimic CSE effects on pMφs ?

We wondered whether nicotine was responsible for the effects of CSE on pMφ functions. Firstly, the ability of pMφs to form MGCs was studied through two complementary approaches. pMφs incubated with 10 μM α-bungarotoxin, an inhibitor of nicotinic receptors, remained able to form MGCs (**Figure 6A**). The formation of MGCs was also maintained in the presence of nicotine from 0.1 nM to 1 μM (**Figure 6B**). Secondly, pMφs were incubated

in the presence of nicotine and their ability to release cytokines was determined. In the absence of LPS, nicotine did not affect the release of TNF and IL-10 and had a poor effect on the release of IL-33 (**Figure 7A**). Similarly, the LPS-stimulated release of TNF, IL-33 and IL-10 was marginally affected by nicotine (**Figure 7B**). We also showed that nicotine, like CSE, was unable to polarize pMφs (**Supplementary table 3**). Finally, we tested the effect of nicotine on the expression of MMP genes in pMφs stimulated or not with LPS for 24 hours (**Figure 8**). It clearly appeared that nicotine did not affect the expression of MMP genes. Taken together, these results suggest that nicotine is not involved in CSE-mediated alterations of pMφ functions.

Discussion

During pregnancy, placental macrophages play a key role by governing tissue homeostasis and managing host defenses and fetal tolerance. pMφs exhibit specific properties including the ability to spontaneously mature into MGCs [21]. In this study, we demonstrated for the first time that CSE interferes with the ability of pMφs to form MGCs. Defective MGC formation has been also been reported in chorioamnionitis in which placental development is compromised and the fetal risk is increased [21]. Interference with macrophage fusion was specific to the myeloid compartment. Indeed, CSE inhibited both the formation of granulomas and the appearance of MGCs that result from the fusion of monocyte-derived macrophages.

The impairment of pMφ fusion was associated with the impairment of other macrophage functions. First, CSE inhibited the uptake of unopsonized zymosan but not that of opsonized zymosan, demonstrating that the phagocytic machinery of pMφ was not impaired. It is likely that CSE interferes with the binding step of zymosan uptake (see below). The alteration of particle uptake by cigarette extracts has previously been reported. Hence, cigarette smoke reduces the ability of macrophages to bind and internalize yeasts [132]. It is noteworthy that the receptors recognizing zymosan particles and yeasts mainly include lectins and integrins, that are also involved in the process of cell fusion [133]. It is likely that cigarette smoke also affects the ultimate phases of the phagocytic process. Indeed, it has previously been shown that CSE decreases the clearance of *Pseudomonas aeruginosa* and *Hemophilus influenzae* in alveolar macrophages exposed to CSE [132,134].

CSE also affected the activation status of pMφs, as determined by the modulation of cytokine release. Indeed, CSE increased the release of TNF and IL-33 by unstimulated and LPS-stimulated pMφs, but decreased that of IL-10, demonstrating that CSE affects the immune balance required for a normal pregnancy [135]. TNF overproduction is in agreement with the recent observation that smoke exposure increases TNF production by alveolar

macrophages [136]. The decreased IL-10 production reinforces the inflammatory context that may account for the risk of preterm delivery and abortion during the first trimester of pregnancy in pregnant smokers [137,138]. The modulation of TNF and IL-10 by CSE did not account for defective MGC formation since the addition of IL-10 to monocytes reduces the formation of MGCs [139]. Increased IL-33 production extends to pMφs that have been found in airways exposed to tobacco smoke. By contrast to peripheral blood and airway cells (10), IL-33 production by pMφs did not reflect macrophage M2 polarization. Using a combination of transcriptional biomarkers related to the M1 or M2 phenotypes, we found that pMφs exposed to cigarette smoke were unable to express a clearly defined M1 or M2 profile. This is consistent with previous reports showing that at term, pMφs are unable to polarize into M1 and M2 macrophages [21,137]. We can assume that the concept of M1/M2 macrophages often used to describe the remarkable adaptation of macrophages to their micro-environment [138] is not applicable to the placenta.

Cell-cell fusion requires a series of tightly orchestrated events. The mechanisms leading to the formation of giant macrophages are not well understood. They depend on the activation status of macrophages and include the modulation of receptors such as CD44, CD47, CD200, signal regulatory protein 1-a, IL-4R, E-cadherin and mannose receptor. Some of these, such as lectins, are involved in yeast recognition and uptake, establishing a link between defective MGC formation and zymosan uptake. Indeed, it has been demonstrated that the formation of foreign body giant cells, resulting from the fusion of monocyte-derived macrophages and foreign bodies, exhibits several features of phagocytosis [139]. It also involves the activity of different MMPs that are well known to affect the extracellular matrix [131]. In our study, we observed that different MMP genes were upregulated in the presence of CSE, especially the MMP-12 gene. MMP-12 is the specific elastase of macrophages and is involved in the acute inflammatory response by increasing TNF release [140]. It is

noteworthy that alveolar macrophages from emphysematous lungs, a major complication of tobacco smoking, produce elevated quantities of matrix-degrading enzymes [141,142] and that MMP-12 plays a major role in the development of smoke-induced emphysema [143]. We also observed an overexpression of the genes encoding MMP-2 and MMP-9, two MMPs known to have elastolytic activity. It is tempting to relate the increased expression of MMP genes to TNF overproduction. This hypothesis is supported by the work of Chung *et al.* in which TNF receptor knockout mice were protected from cigarette smoke-induced elastin breakdown in bronchoalveolar lavage fluid [144]. Conversely, TNF overexpression in mice results in chronic pulmonary inflammation as in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD); changes in elastin remodeling in both airway and alveolar walls are involved in pathogenesis and reflect MMP modulation [145,146].

On the other hand, we demonstrated that defective macrophage fusion and phagocytosis did not depend on the presence of nicotine. The mRNA profile of studied MMPs was not affected by nicotine in pMφs. This is clearly distinct from other cell types. The expression of the genes encoding MMP-1, MMP-2 and MMP-3 is upregulated in arterial smooth muscle cells treated by nicotine [147], while no effect was observed on MMP-2 gene expression in arterial endothelial cells as well as in fetal guinea pig myocardium [148,149]. Only the production of cytokines was slightly modulated in the presence of nicotine. This finding is in agreement with other reports involving nicotine and other immune cells. Nicotine augments the production of inflammatory cytokines such as TNF and IL-1 β , chemokines including keratinocyte-derived chemokine, and nitric oxide synthase [150]. We hypothesize that other CSE compounds play a specific role in macrophage functions. Taken together, these results show that nicotine, even at high concentrations, does not mimic CSE, containing thousands of toxic components, on pMφs.

In conclusion, this is the first study to demonstrate the direct effects of smoke on essential functions of pMφs including cytokine release and the ability to form MGCs. The effects are nicotine-independent. We suggest that the modulation of pMφs may play a role in the deleterious effects of smoking in pregnant women.

Conflict of interest statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Acknowledgments

We would like to thank Dr. C. Capo for his help and advice during the redaction of the manuscript, Professor Florence Bretelle and N. Willigens for collecting placentas.

References

1. Burton GJ, Jauniaux E. What is the placenta? *Am J Obstet Gynecol*. 2015;213: S6.e1–S6.e4. doi:10.1016/j.ajog.2015.07.050
2. Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology with Student Consult Online Access*, 9th Edition. 9th edition. Philadelphia, PA: Saunders; 2011.
3. Alsat E, Evain-Brion D. Le placenta humain : neuf mois d’une intense activité encore méconnue. *Médecine Thérapeutique Pédiatrie*. 1999;1: 509–16.
4. Wooding P, Burton G. *Comparative Placentation* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2008. Available: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-78797-6>
5. Mossman HW. Comparative morphogenesis of the fetal membranes and accessory uterine structures. *Placenta*. 1991;12: 1–5. doi:10.1016/0143-4004(91)90504-9
6. Burton GJ, Jauniaux E, Charnock-Jones DS. The influence of the intrauterine environment on human placental development. *Int J Dev Biol*. 2010;54: 303–312. doi:10.1387/ijdb.082764gb
7. Spencer TE. Biological Roles of Uterine Glands in Pregnancy. *Semin Reprod Med*. 2014;32: 346–357. doi:10.1055/s-0034-1376354
8. Jauniaux E, Cindrova-Davies T, Johns J, Dunster C, Hempstock J, Kelly FJ, et al. Distribution and transfer pathways of antioxidant molecules inside the first trimester human gestational sac. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89: 1452–1458. doi:10.1210/jc.2003-031332
9. Griffiths SK, Campbell JP. Placental structure, function and drug transfer. *Contin Educ Anaesth Crit Care Pain*. 2015;15: 84–89. doi:10.1093/bjaceaccp/mku013
10. Moffett A, Hiby SE, Sharkey AM. The role of the maternal immune system in the regulation of human birthweight. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2015;370: 20140071. doi:10.1098/rstb.2014.0071
11. Burton GJ, Kaufmann P, Huppertz B. Chapter 5 - Anatomy and Genesis of the Placenta. In: Wassarman JDNMPWPRGCM de KSRM, editor. *Knobil and Neill’s Physiology of Reproduction (Third Edition)*. St Louis: Academic Press; 2006. pp. 189–243. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780125154000500105>

12. Malek A. Role of IgG antibodies in association with placental function and immunologic diseases in human pregnancy. *Expert Rev Clin Immunol*. 2013;9: 235–249. doi:10.1586/eci.12.99
13. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2009;27: 669–692. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132557
14. van Furth R, Cohn ZA. THE ORIGIN AND KINETICS OF MONONUCLEAR PHAGOCYTES. *J Exp Med*. 1968;128: 415–435.
15. Gordon S. The macrophage: past, present and future. *Eur J Immunol*. 2007;37 Suppl 1: S9–17. doi:10.1002/eji.200737638
16. Pinhal-Enfield G, Leibovich J, Vas N. The Role of Macrophages in the Placenta. In: Violin Pereira L, editor. *Embryology - Updates and Highlights on Classic Topics*. InTech; 2012. Available: <http://www.intechopen.com/books/embryology-updates-and-highlights-on-classic-topics/the-role-of-macrophages-in-the-placenta>
17. Belhareth R. Macrophage populations and self-renewal: Changing the paradigm. *World J Immunol*. 2015;5: 131. doi:10.5411/wji.v5.i3.131
18. Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2011;11: 762–774. doi:10.1038/nri3070
19. Ka MB, Gondois-Rey F, Capo C, Textoris J, Million M, Raoult D, et al. Imbalance of circulating monocyte subsets and PD-1 dysregulation in Q fever endocarditis: the role of IL-10 in PD-1 modulation. *PloS One*. 2014;9: e107533. doi:10.1371/journal.pone.0107533
20. Ziegler-Heitbrock L. Monocyte subsets in man and other species. *Cell Immunol*. 2014;289: 135–139. doi:10.1016/j.cellimm.2014.03.019
21. Ben Amara A, Gorvel L, Baulan K, Derain-Court J, Buffat C, V  rollet C, et al. Placental macrophages are impaired in chorioamnionitis, an infectious pathology of the placenta. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2013;191: 5501–5514. doi:10.4049/jimmunol.1300988
22. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol*. 2011;11: 723–737. doi:10.1038/nri3073
23. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol*. 2010;11: 889–896. doi:10.1038/ni.1937
24. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdt S, et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*. 2014;41: 14–20. doi:10.1016/j.immuni.2014.06.008
25. Ka MB, Daumas A, Textoris J, Mege J-L. Phenotypic diversity and emerging new tools to study macrophage activation in bacterial infectious diseases. *Front Immunol*. 2014;5: 500. doi:10.3389/fimmu.2014.00500
26. Xue J, Schmidt SV, Sander J, Draffehn A, Krebs W, Quester I, et al. Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. *Immunity*. 2014;40: 274–288. doi:10.1016/j.immuni.2014.01.006
27. Gautier EL, Shay T, Miller J, Greter M, Jakubzick C, Ivanov S, et al. Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nat Immunol*. 2012;13: 1118–1128. doi:10.1038/ni.2419
28. Becher B, Schlitzer A, Chen J, Mair F, Sumatoh HR, Teng KWW, et al. High-dimensional analysis of the murine myeloid cell system. *Nat Immunol*. 2014;15: 1181–1189. doi:10.1038/ni.3006
29. Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative Activation of Macrophages: An Immunologic Functional Perspective. *Annu Rev Immunol*. 2009;27: 451–483. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132532

30. Classen A, Lloberas J, Celada A. Macrophage activation: classical versus alternative. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2009;531: 29–43. doi:10.1007/978-1-59745-396-7_3
31. Lawrence T, Natoli G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat Rev Immunol*. 2011;11: 750–761. doi:10.1038/nri3088
32. ter Horst EN, Hakimzadeh N, van der Laan AM, Krijnen PAJ, Niessen HWM, Piek JJ. Modulators of Macrophage Polarization Influence Healing of the Infarcted Myocardium. *Int J Mol Sci*. 2015;16: 29583–29591. doi:10.3390/ijms161226187
33. Xu H, Zhu J, Smith S, Foldi J, Zhao B, Chung AY, et al. Notch-RBP-J signaling regulates the transcription factor IRF8 to promote inflammatory macrophage polarization. *Nat Immunol*. 2012;13: 642–650. doi:10.1038/ni.2304
34. Silvio De Flora FD. Modulation of cigarette smoke-related end-points in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res*. 2003;523-524: 237–52. doi:10.1016/S0027-5107(02)00340-8
35. Shields PG. Tobacco Smoking, Harm Reduction, and Biomarkers. *J Natl Cancer Inst*. 2002;94: 1435–1444. doi:10.1093/jnci/94.19.1435
36. Sobus SL, Warren GW. The biologic effects of cigarette smoke on cancer cells. *Cancer*. 2014;120: 3617–3626. doi:10.1002/cncr.28904
37. Thorne D, Adamson J. A review of in vitro cigarette smoke exposure systems. *Exp Toxicol Pathol*. 2013;65: 1183–1193. doi:10.1016/j.etp.2013.06.001
38. Faux SP, Tai T, Thorne D, Xu Y, Breheny D, Gaca M. The role of oxidative stress in the biological responses of lung epithelial cells to cigarette smoke. *Biomark Biochem Indic Expo Response Susceptibility Chem*. 2009;14 Suppl 1: 90–96. doi:10.1080/13547500902965047
39. Centers for Disease Control and Prevention (US), National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion (US), Office on Smoking and Health (US). How Tobacco Smoke Causes Disease: The Biology and Behavioral Basis for Smoking-Attributable Disease: A Report of the Surgeon General [Internet]. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention (US); 2010. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53017/>
40. Thun MJ, Carter BD, Feskanich D, Freedman ND, Prentice R, Lopez AD, et al. 50-Year Trends in Smoking-Related Mortality in the United States. *N Engl J Med*. 2013;368: 351–364. doi:10.1056/NEJMsa1211127
41. Bickerstaff M, Beckmann M, Gibbons K, Flenady V. Recent cessation of smoking and its effect on pregnancy outcomes. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 2012;52: 54–58. doi:10.1111/j.1479-828X.2011.01387.x
42. Thäle V, Schlitt A. Folgen von Alkohol und Rauchen in der Schwangerschaft. *Internist*. 2011;52: 1185–1190. doi:10.1007/s00108-011-2826-3
43. Mund M, Louwen F, Klingelhofer D, Gerber A. Smoking and Pregnancy — A Review on the First Major Environmental Risk Factor of the Unborn. *Int J Environ Res Public Health*. 2013;10: 6485–6499. doi:10.3390/ijerph10126485
44. Arnould JP, Verhoest P, Bach V, Libert JP, Belegaud J. Detection of benzo[a]pyrene-DNA adducts in human placenta and umbilical cord blood. *Hum Exp Toxicol*. 1997;16: 716–721.
45. Rogers JM. Tobacco and pregnancy. *Reprod Toxicol*. 2009;28: 152–160. doi:10.1016/j.reprotox.2009.03.012
46. Sastry BVR, Chance MB, Hemontolor ME, Goddijn-Wessel TAW. Formation and Retention of Cotinine during Placental Transfer of Nicotine in Human Placental Cotyledon. *Pharmacology*. 1998;57: 104–116. doi:10.1159/000028231
47. Rua E de AO, Porto ML, Ramos JPL, Nogueira BV, dos Santos Meyrelles S, Vasquez EC, et al. Effects of tobacco smoking during pregnancy on oxidative stress in the

- umbilical cord and mononuclear blood cells of neonates. *J Biomed Sci.* 2014;21. doi:10.1186/s12929-014-0105-z
48. Jauniaux E, Burton GJ. The effect of smoking in pregnancy on early placental morphology. *Obstet Gynecol.* 1992;79: 645–648.
49. Zdravkovic T, Genbacev O, McMaster MT, Fisher SJ. The adverse effects of maternal smoking on the human placenta: a review. *Placenta.* 2005;26 Suppl A: S81–86. doi:10.1016/j.placenta.2005.02.003
50. Dittrich R, Schibel A, Hoffmann I, Mueller A, Beckmann MW, Cupisti S. Influence of maternal smoking during pregnancy on oxidant status in amniotic fluid. *Vivo Athens Greece.* 2012;26: 813–818.
51. Chelchowska M, Ambroszkiewicz J, Gajewska J, Laskowska-Klita T, Leibschang J. The effect of tobacco smoking during pregnancy on plasma oxidant and antioxidant status in mother and newborn. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2011;155: 132–136. doi:10.1016/j.ejogrb.2010.12.006
52. Genbacev O, McMaster MT, Lazic J, Nedeljkovic S, Cvetkovic M, Joslin R, et al. Concordant in situ and in vitro data show that maternal cigarette smoking negatively regulates placental cytotrophoblast passage through the cell cycle. *Reprod Toxicol Elmsford N.* 2000;14: 495–506.
53. Librach CL, Werb Z, Fitzgerald ML, Chiu K, Corwin NM, Esteves RA, et al. 92-kD type IV collagenase mediates invasion of human cytotrophoblasts. *J Cell Biol.* 1991;113: 437–449. doi:10.1083/jcb.113.2.437
54. Jauniaux E, Burton GJ. Morphological and biological effects of maternal exposure to tobacco smoke on the feto-placental unit. *Early Hum Dev.* 2007;83: 699–706. doi:10.1016/j.earlhumdev.2007.07.016
55. Mian MF, Lauzon NM, Stämpfli MR, Mossman KL, Ashkar AA. Impairment of human NK cell cytotoxic activity and cytokine release by cigarette smoke. *J Leukoc Biol.* 2008;83: 774–784. doi:10.1189/jlb.0707481
56. Prins JR, Hylkema MN, Erwich JJHM, Huitema S, Dekkema GJ, Dijkstra FE, et al. Smoking during pregnancy influences the maternal immune response in mice and humans. *Am J Obstet Gynecol.* 2012;207: 76.e1–14. doi:10.1016/j.ajog.2012.04.017
57. Zuo L, He F, Sergakis GG, Koozehchian MS, Stimpfl JN, Rong Y, et al. Interrelated role of cigarette smoking, oxidative stress, and immune response in COPD and corresponding treatments. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2014;307: L205–218. doi:10.1152/ajplung.00330.2013
58. Benowitz NL, Hukkanen J, Jacob P. Nicotine chemistry, metabolism, kinetics and biomarkers. *Handb Exp Pharmacol.* 2009; 29–60. doi:10.1007/978-3-540-69248-5_2
59. Gori GB, Benowitz NL, Lynch CJ. Mouth versus deep airways absorption of nicotine in cigarette smokers. *Pharmacol Biochem Behav.* 1986;25: 1181–1184.
60. Benowitz NL, Jacob P, Jones RT, Rosenberg J. Interindividual variability in the metabolism and cardiovascular effects of nicotine in man. *J Pharmacol Exp Ther.* 1982;221: 368–372.
61. Breese CR, Marks MJ, Logel J, Adams CE, Sullivan B, Collins AC, et al. Effect of smoking history on [3H]nicotine binding in human postmortem brain. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997;282: 7–13.
62. Perry DC, Dávila-García MI, Stockmeier CA, Kellar KJ. Increased nicotinic receptors in brains from smokers: membrane binding and autoradiography studies. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999;289: 1545–1552.
63. Dahlström A, Lundell B, Curvall M, Thapper L. Nicotine and cotinine concentrations in the nursing mother and her infant. *Acta Paediatr Scand.* 1990;79: 142–147.

64. Dempsey DA, Benowitz NL. Risks and benefits of nicotine to aid smoking cessation in pregnancy. *Drug Saf.* 2001;24: 277–322.
65. Rose JE, Behm FM, Westman EC, Coleman RE. Arterial nicotine kinetics during cigarette smoking and intravenous nicotine administration: implications for addiction. *Drug Alcohol Depend.* 1999;56: 99–107.
66. Hukkanen J, Jacob P, Benowitz NL. Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacol Rev.* 2005;57: 79–115. doi:10.1124/pr.57.1.3
67. Benowitz NL, Jacob P, Fong I, Gupta S. Nicotine metabolic profile in man: comparison of cigarette smoking and transdermal nicotine. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994;268: 296–303.
68. Karlin A. Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nat Rev Neurosci.* 2002;3: 102–114. doi:10.1038/nrn731
69. Arias HR, Bhumireddy P, Bouzat C. Molecular mechanisms and binding site locations for noncompetitive antagonists of nicotinic acetylcholine receptors. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006;38: 1254–1276. doi:10.1016/j.biocel.2006.01.006
70. Gotti C, Clementi F. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog Neurobiol.* 2004;74: 363–396. doi:10.1016/j.pneurobio.2004.09.006
71. Biological and Biophysical Aspects of Ligand-gated Ion Channel Receptor Superfamilies, 2006. Research Signpost; 2006.
72. Arias HR, Richards VE, Ng D, Ghafoori ME, Le V, Mousa SA. Role of non-neuronal nicotinic acetylcholine receptors in angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41: 1441–1451. doi:10.1016/j.biocel.2009.01.013
73. Karlin A. ION CHANNEL STRUCTUREEMERGING STRUCTURE OF THE NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTORS. *Nat Rev Neurosci.* 2002;3: 102–114. doi:10.1038/nrn731
74. Tiesler CMT, Heinrich J. Prenatal nicotine exposure and child behavioural problems. *Eur Child Adolesc Psychiatry.* 2014;23: 913–929. doi:10.1007/s00787-014-0615-y
75. Ain R, Canham LN, Soares MJ. Gestation stage-dependent intrauterine trophoblast cell invasion in the rat and mouse: novel endocrine phenotype and regulation. *Dev Biol.* 2003;260: 176–190.
76. Vercruysse L, Caluwaerts S, Luyten C, Pijnenborg R. Interstitial trophoblast invasion in the decidua and mesometrial triangle during the last third of pregnancy in the rat. *Placenta.* 2006;27: 22–33. doi:10.1016/j.placenta.2004.11.004
77. Holloway AC, Salomon A, Soares MJ, Garnier V, Raha S, Sergent F, et al. Characterization of the adverse effects of nicotine on placental development: in vivo and in vitro studies. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2014;306: E443–456. doi:10.1152/ajpendo.00478.2013
78. Babcock GT. How oxygen is activated and reduced in respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96: 12971–12973.
79. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 2006;141: 312–322. doi:10.1104/pp.106.077073
80. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 2006;160: 1–40. doi:10.1016/j.cbi.2005.12.009
81. Ré DB, Nafia I, Nieoullon A, Le Goff LK, Had-Aissouni L. Stress oxydatif cérébral : les astrocytes sont-ils vulnérables aux faibles concentrations intracellulaires de glutamate ? Implications sur la survie neuronale. *Ann Fr Anesth Réanimation.* 2005;24: 502–509. doi:10.1016/j.annfar.2005.03.004
82. Novo E, Parola M. Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2008;1: 5. doi:10.1186/1755-1536-1-5

83. Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med*. 2000;29: 222–230.
84. Lipinski B, Lipinski B. Hydroxyl Radical and Its Scavengers in Health and Disease, Hydroxyl Radical and Its Scavengers in Health and Disease. *Oxidative Med Cell Longev*. 2011;2011, 2011: e809696. doi:10.1155/2011/809696, 10.1155/2011/809696
85. Sheu S-S, Nauduri D, Anders MW. Targeting antioxidants to mitochondria: a new therapeutic direction. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1762: 256–265. doi:10.1016/j.bbadis.2005.10.007
86. Halliwell B. Antioxidants: the basics--what they are and how to evaluate them. *Adv Pharmacol San Diego Calif*. 1997;38: 3–20.
87. Matés JM, Pérez-Gómez C, Núñez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem*. 1999;32: 595–603.
88. Landis GN, Tower J. Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mech Ageing Dev*. 2005;126: 365–379. doi:10.1016/j.mad.2004.08.012
89. Virchow R. *Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre*. 1. Auflage. Berlin: Hirschwald; 1858.
90. Wiley: Glial Neurobiology - Alexei Verkhratsky, Arthur Morgan Butt [Internet]. [cited 21 Jan 2016]. Available: <http://eu.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/productCd-0470015640.html>
91. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2010;119: 7–35. doi:10.1007/s00401-009-0619-8
92. Christian Giaume AK. Giaume C, Koulakoff A, Roux L, Holcman D, Rouach N. Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions. *Nat Rev Neurosci* 11:87-99. *Nat Rev Neurosci*. 2010;11: 87–99. doi:10.1038/nrn2757
93. Scemes E, Spray DC. Extracellular K⁺ and Astrocyte Signaling via Connexin and Pannexin Channels. *Neurochem Res*. 2012;37: 2310–2316. doi:10.1007/s11064-012-0759-4
94. Harris AL. Connexin channel permeability to cytoplasmic molecules. *Prog Biophys Mol Biol*. 2007;94: 120–143. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2007.03.011
95. Bushong EA, Martone ME, Jones YZ, Ellisman MH. Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2002;22: 183–192.
96. Ventura R, Harris KM. Three-Dimensional Relationships between Hippocampal Synapses and Astrocytes. *J Neurosci*. 1999;19: 6897–6906.
97. Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci*. 1999;22: 208–215. doi:10.1016/S0166-2236(98)01349-6
98. Halassa MM, Fellin T, Takano H, Dong J-H, Haydon PG. Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2007;27: 6473–6477. doi:10.1523/JNEUROSCI.1419-07.2007
99. Barat E. Etude des interactions entre neurones et astrocytes au sein de la substance noire réticulée [Internet]. Université de Grenoble. 2012. Available: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00906952/document>
100. Tsacopoulos M, Magistretti PJ. Metabolic coupling between glia and neurons. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 1996;16: 877–885.
101. Pellerin L. Food for thought: the importance of glucose and other energy substrates for sustaining brain function under varying levels of activity. *Diabetes Metab*. 2010;36 Suppl 3: S59–63. doi:10.1016/S1262-3636(10)70469-9

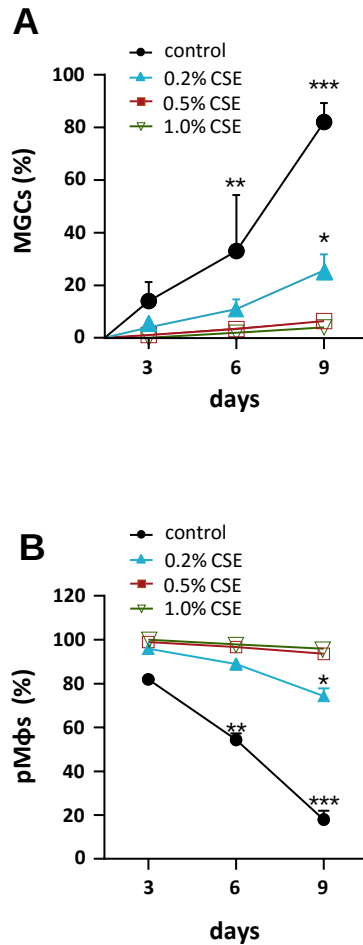
102. Simard M, Nedergaard M. The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience*. 2004;129: 877–896. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.09.053
103. Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM, Cooper MS, Smith SJ. Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science*. 1990;247: 470–473.
104. Rua E de AO, Porto ML, Ramos JPL, Nogueira BV, dos Santos Meyrelles S, Vasquez EC, et al. Effects of tobacco smoking during pregnancy on oxidative stress in the umbilical cord and mononuclear blood cells of neonates. *J Biomed Sci*. 2014;21. doi:10.1186/s12929-014-0105-z
105. Zhang K, Wang X. Maternal smoking and increased risk of sudden infant death syndrome: A meta-analysis. *Leg Med*. 2013;15: 115–121. doi:10.1016/j.legalmed.2012.10.007
106. Cnattingius S. The epidemiology of smoking during pregnancy: Smoking prevalence, maternal characteristics, and pregnancy outcomes. *Nicotine Tob Res*. 2004;6: S125–S140. doi:10.1080/14622200410001669187
107. Ni I, Ji C, Vij N. Second-Hand Cigarette Smoke Impairs Bacterial Phagocytosis in Macrophages by Modulating CFTR Dependent Lipid-Rafts. *PLoS ONE*. 2015;10: e0121200. doi:10.1371/journal.pone.0121200
108. Kong Q, Lin C-LG. Oxidative damage to RNA: mechanisms, consequences, and diseases. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2010;67: 1817–1829. doi:10.1007/s00018-010-0277-y
109. Mazzone P, Tierney W, Hossain M, Puvenna V, Janigro D, Cucullo L. Pathophysiological impact of cigarette smoke exposure on the cerebrovascular system with a focus on the blood-brain barrier: expanding the awareness of smoking toxicity in an underappreciated area. *Int J Environ Res Public Health*. 2010;7: 4111–4126. doi:10.3390/ijerph7124111
110. Bierut LJ, Stitzel JA, Wang JC, Hinrichs AL, Grucza RA, Xuei X, et al. Variants in Nicotinic Receptors and Risk for Nicotine Dependence. *Am J Psychiatry*. 2008;165: 1163–1171. doi:10.1176/appi.ajp.2008.07111711
111. Arnson Y, Shoenfeld Y, Amital H. Effects of tobacco smoke on immunity, inflammation and autoimmunity. *J Autoimmun*. 2010;34: J258–J265. doi:10.1016/j.jaut.2009.12.003
112. Tobin F, Vuillaume G, Talikka M, Diserens G, Diserens G, Peitsch MC, et al. Pre-malignant processes of smoking-induced lung adenocarcinoma development: A conceptual biological model. *Adv Lung Cancer*. 2013;02: 32–53. doi:10.4236/alc.2013.22006
113. Xia J, Zhao J, Shang J, Li M, Zeng Z, Zhao J, et al. Increased IL-33 expression in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2015; ajplung.00305.2014. doi:10.1152/ajplung.00305.2014
114. Stämpfli MR, Anderson GP. How cigarette smoke skews immune responses to promote infection, lung disease and cancer. *Nat Rev Immunol*. 2009;9: 377–384. doi:10.1038/nri2530
115. Vacek TP, Rehman S, Neamtu D, Yu S, Givimani S, Tyagi SC. Matrix metalloproteinases in atherosclerosis: role of nitric oxide, hydrogen sulfide, homocysteine, and polymorphisms. *Vasc Health Risk Manag*. 2015;11: 173–183. doi:10.2147/VHRM.S68415
116. Zhang S, Regnault TRH, Barker PL, Botting KJ, McMillen IC, McMillan CM, et al. Placental adaptations in growth restriction. *Nutrients*. 2015;7: 360–389. doi:10.3390/nu7010360

117. García K, García V, Laspiur JP, Duan F, Meléndez LM. Characterization of the Placental Macrophage Secretome: Implications for Antiviral Activity. *Placenta*. 2009;30: 149–155. doi:10.1016/j.placenta.2008.10.014
118. Bulmer JN, Johnson PM. Macrophage populations in the human placenta and amniochorion. *Clin Exp Immunol*. 1984;57: 393–403.
119. Daley JM, Brancato SK, Thomay AA, Reichner JS, Albina JE. The phenotype of murine wound macrophages. *J Leukoc Biol*. 2010;87: 59–67.
120. Kawashima A, Koide K, Ventura W, Hori K, Takenaka S, Maruyama D, et al. Effects of Maternal Smoking on the Placental Expression of Genes Related to Angiogenesis and Apoptosis during the First Trimester. *PLoS ONE*. 2014;9: e106140. doi:10.1371/journal.pone.0106140
121. Genbacev O, McMaster MT, Lazic J, Nedeljkovic S, Cvetkovic M, Joslin R, et al. Concordant in situ and in vitro data show that maternal cigarette smoking negatively regulates placental cytotrophoblast passage through the cell cycle. *Reprod Toxicol Elmsford N*. 2000;14: 495–506.
122. Eric Jauniaux GJB. Jauniaux E, Burton GJ. Morphological and biological effects of maternal exposure to tobacco smoke on the feto-placental unit. *Early Hum Dev* 83: 699–706. *Early Hum Dev*. 2007;83: 699–706. doi:10.1016/j.earlhumdev.2007.07.016
123. Machaalani R, Say M, Waters KA. Effects of cigarette smoke exposure on nicotinic acetylcholine receptor subunits $\alpha 7$ and $\beta 2$ in the sudden infant death syndrome (SIDS) brainstem. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2011;257: 396–404. doi:10.1016/j.taap.2011.09.023
124. Su Y, Han W, Giraldo C, De Li Y, Block ER. Effect of cigarette smoke extract on nitric oxide synthase in pulmonary artery endothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1998;19: 819–825. doi:10.1165/ajrcmb.19.5.3091
125. Ben Amara A, Ghigo E, Le Priol Y, Lépolard C, Salcedo SP, Lemichez E, et al. *Coxiella burnetii*, the Agent of Q Fever, Replicates within Trophoblasts and Induces a Unique Transcriptional Response. *PLoS ONE*. 2010;5: e15315. doi:10.1371/journal.pone.0015315
126. Thuny F, Textoris J, Ben Amara A, El Filali A, Capo C, Habib G, et al. The Gene Expression Analysis of Blood Reveals S100A11 and AQP9 as Potential Biomarkers of Infective Endocarditis. *PLoS ONE*. 2012;7: e31490. doi:10.1371/journal.pone.0031490
127. Mehraj V, Textoris J, Ben Amara A, Ghigo E, Raoult D, Capo C, et al. Monocyte responses in the context of Q fever: from a static polarized model to a kinetic model of activation. *J Infect Dis*. 2013;208: 942–951. doi:10.1093/infdis/jit266
128. Thuny F, Habib G, Le Dolley Y, Canault M, Casalta J-P, Verdier M, et al. Circulating Matrix Metalloproteinases in Infective Endocarditis: A Possible Marker of the Embolic Risk. *PLoS ONE*. 2011;6. doi:10.1371/journal.pone.0018830
129. Benoit M, Thuny F, Le Priol Y, Lepidi H, Bastonero S, Casalta J-P, et al. The transcriptional programme of human heart valves reveals the natural history of infective endocarditis. *PloS One*. 2010;5: e8939. doi:10.1371/journal.pone.0008939
130. Delaby A, Gorvel L, Espinosa L, Lépolard C, Raoult D, Ghigo E, et al. Defective monocyte dynamics in Q fever granuloma deficiency. *J Infect Dis*. 2012;205: 1086–1094. doi:10.1093/infdis/jis013
131. MacLauchlan S, Skokos EA, Meznarich N, Zhu DH, Raoof S, Shipley JM, et al. Macrophage fusion, giant cell formation, and the foreign body response require matrix metalloproteinase 9. *J Leukoc Biol*. 2009;85: 617–626. doi:10.1189/jlb.1008588
132. Barbour SE, Nakashima K, Zhang J-B, Tangada S, Hahn C-L, Schenkein HA, et al. Tobacco and Smoking: Environmental Factors That Modify the Host Response

- (Immune System) and Have an Impact On Periodontal Health. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1997;8: 437–460. doi:10.1177/10454411970080040501
133. Le Cabec V, Cols C, Maridonneau-Parini I. Nonopsonic Phagocytosis of Zymosan and *Mycobacterium kansasii* by CR3 (CD11b/CD18) Involves Distinct Molecular Determinants and Is or Is Not Coupled with NADPH Oxidase Activation. *Infect Immun*. 2000;68: 4736–4745.
 134. Karavitis J, Kovacs EJ. Macrophage phagocytosis: effects of environmental pollutants, alcohol, cigarette smoke, and other external factors. *J Leukoc Biol*. 2011;90: 1065–1078. doi:10.1189/jlb.0311114
 135. Renaud SJ, Graham CH. The Role of Macrophages in Utero-placental Interactions During Normal and Pathological Pregnancy. *Immunol Invest*. 2008;37: 535–564. doi:10.1080/08820130802191375
 136. Kearley J, Silver JS, Sanden C, Liu Z, Berlin AA, White N, et al. Cigarette smoke silences innate lymphoid cell function and facilitates an exacerbated type I interleukin-33-dependent response to infection. *Immunity*. 2015;42: 566–579. doi:10.1016/j.immuni.2015.02.011
 137. Gustafsson C, Mjösberg J, Matussek A, Geffers R, Matthiesen L, Berg G, et al. Gene Expression Profiling of Human Decidual Macrophages: Evidence for Immunosuppressive Phenotype. *PLoS ONE*. 2008;3: e2078. doi:10.1371/journal.pone.0002078
 138. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest*. 2012;122: 787–795. doi:10.1172/JCI59643
 139. McNally AK, Anderson JM. Multinucleated giant cell formation exhibits features of phagocytosis with participation of the endoplasmic reticulum. *Exp Mol Pathol*. 2005;79: 126–135. doi:10.1016/j.yexmp.2005.06.008
 140. Goldklang MP, Marks SM, D'Armiento JM. Second hand smoke and COPD: lessons from animal studies. *Front Physiol*. 2013;4: 30. doi:10.3389/fphys.2013.00030
 141. McGarry Houghton A. Matrix metalloproteinases in destructive lung disease. *Matrix Biol*. 2015;44–46: 167–174. doi:10.1016/j.matbio.2015.02.002
 142. Russell REK, Thorley A, Culpitt SV, Dodd S, Donnelly LE, Demattos C, et al. Alveolar macrophage-mediated elastolysis: roles of matrix metalloproteinases, cysteine, and serine proteases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002;283: L867–873. doi:10.1152/ajplung.00020.2002
 143. Hautamaki RD, Kobayashi DK, Senior RM, Shapiro SD. Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science*. 1997;277: 2002–2004.
 144. Churg A, Dai J, Tai H, Xie C, Wright JL. Tumor necrosis factor-alpha is central to acute cigarette smoke-induced inflammation and connective tissue breakdown. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166: 849–854. doi:10.1164/rccm.200202-097OC
 145. Eurlings IMJ, Dentener MA, Mercken EM, de Cabo R, Bracke KR, Vernooy JHJ, et al. A comparative study of matrix remodeling in chronic models for COPD; mechanistic insights into the role of TNF- α . *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2014;307: L557–L565. doi:10.1152/ajplung.00116.2014
 146. Eurlings IM, Dentener MA, Cleutjens JP, Peutz CJ, Rohde GG, Wouters EF, et al. Similar matrix alterations in alveolar and small airway walls of COPD patients. *BMC Pulm Med*. 2014;14: 90. doi:10.1186/1471-2466-14-90
 147. Carty CS, Soloway PD, Kayastha S, Bauer J, Marsan B, Ricotta JJ, et al. Nicotine and cotinine stimulate secretion of basic fibroblast growth factor and affect expression of matrix metalloproteinases in cultured human smooth muscle cells. *J Vasc Surg*. 1996;24: 927–934; discussion 934–935.

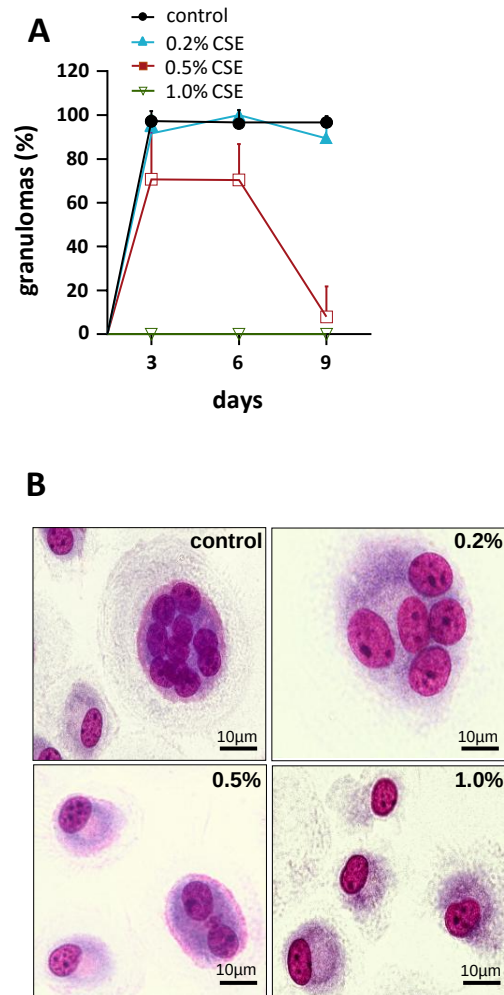
148. Zhang S, Day I, Ye S. Nicotine induced changes in gene expression by human coronary artery endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2001;154: 277–283.
149. Thompson LP, Liu H, Evans L, Mong JA. Prenatal Nicotine Increases Matrix Metalloproteinase 2 (MMP-2) Expression in Fetal Guinea Pig Hearts. *Reprod Sci*. 2011;18: 1103–1110. doi:10.1177/1933719111404605
150. Lau PP, Li L, Merched AJ, Zhang AL, Ko KWS, Chan L. Nicotine Induces Proinflammatory Responses in Macrophages and the Aorta Leading to Acceleration of Atherosclerosis in Low-Density Lipoprotein Receptor^{-/-} Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26: 143–149. doi:10.1161/01.ATV.0000193510.19000.10

Figure 1. Effect of CSE on MGC formation



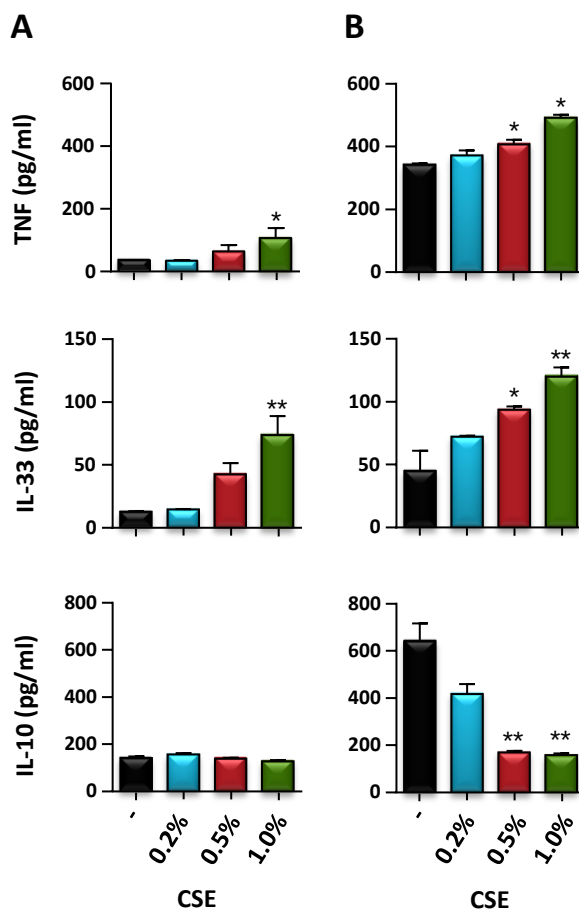
pMφs were incubated with different concentrations of CSE for 9 days. Cells were stained with May-Grünwald Giemsa and examined microscopically. (A) MGCs were defined by the number of nuclei per cell and size. The percentage of cells with at least two nuclei was calculated and the results were expressed as the mean $\pm$ SEM of 3 different experiments. (B) The viability of pMφs was determined by trypan blue exclusion and the results were expressed as the mean $\pm$ SEM of 3 different experiments.

Figure 2. Effect of CSE on granuloma formation



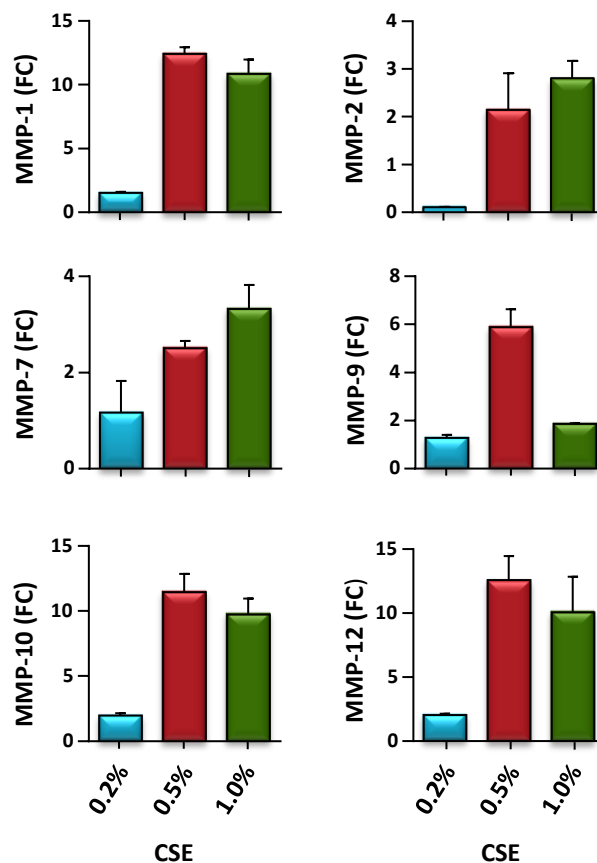
PBMCs were incubated with beads coated with BCG extracts and CSE for 9 days. Granulomas were defined as beads fully covered by PBMCs. (A) The percentage of granulomas was expressed as the mean $\pm$ SEM of 3 different experiments. (B) Granulomas formed after 9 days were aspirated in a pipette and dissociated. Isolated granuloma cells were stained with MGG—Representative micrographs of granuloma cells are shown

Figure 3. Effect of CSE of cytokine release by pMφs



Unstimulated pMφs (A) and pMφs stimulated by LPS (B) were incubated with CSE for 24 h. Cell supernatants were collected and assayed for the presence of TNF, IL-33 and IL-10 using specific immunoassays. Data are presented as the mean $\pm$ SEM of three different experiments. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001.

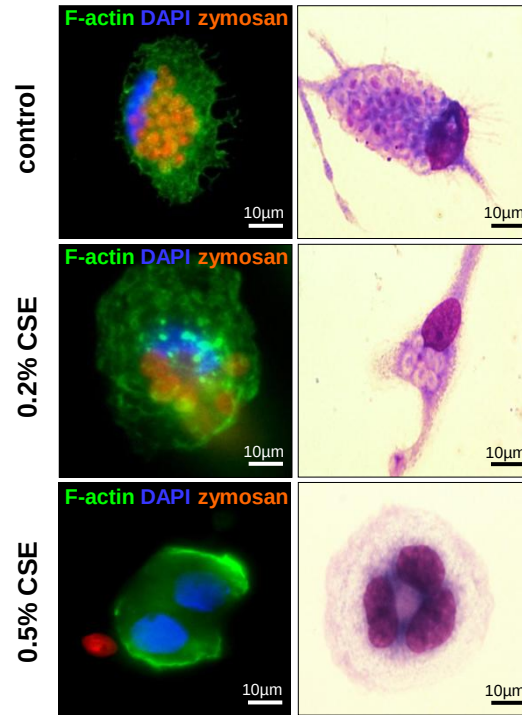
Figure 4. Effect of CSE on the transcriptional expression of MMPs



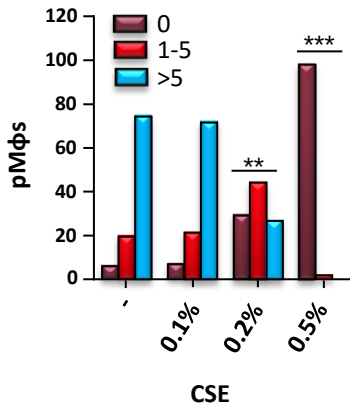
pMφs were treated by CSE for 24 h. RNA was extracted and qRT-PCR was conducted with probes for MMPs. The FC values were normalized using ACTB as internal controls. They are expressed relative to pMφs incubated in the absence of CSE.

Figure 5. Effect of CSE on particle uptake by pMφs

A

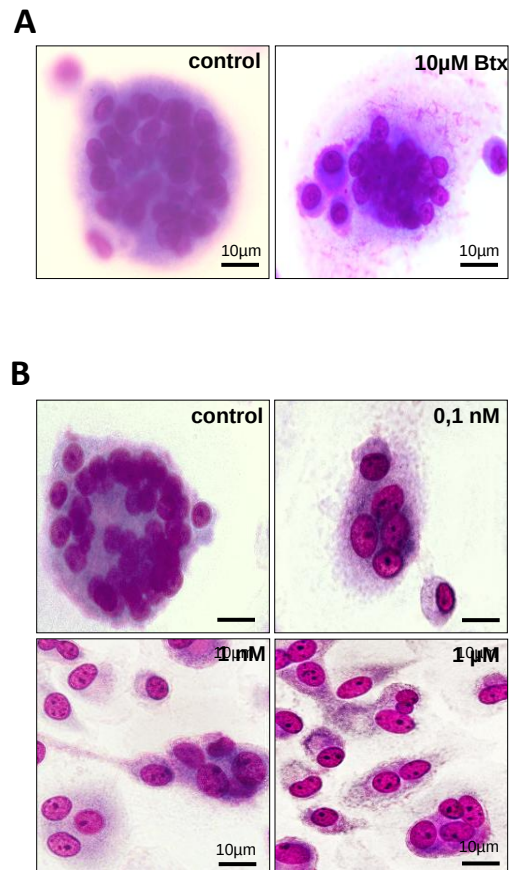


B



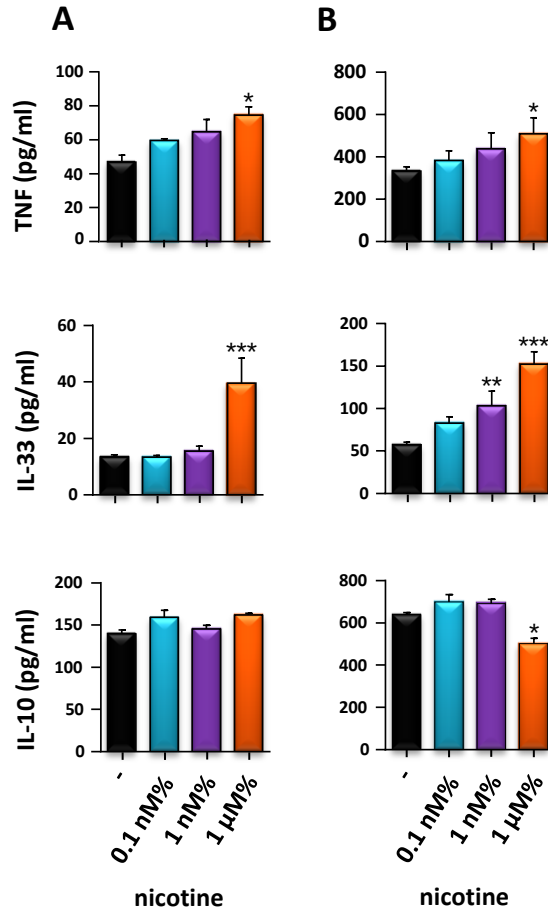
pMφs treated or not with CSE were incubated with fluorescent zymosan particles for 6 h. Cells were labelled with DAPI and phalloidin Alexa-Fluor 488, or stained with MGG. (A) Representative micrographs of zymosan internalization are shown. (B) The number of internalized particles per pMφ was determined. The percentage of cells that have no particles, 1 to 5 particles and more than 5 particles was calculated and the results are expressed as the mean $\pm$ SEM of three different experiments. **p < 0.01.

Figure 6. Effect of α -bungarotoxin and nicotine on MGC formation



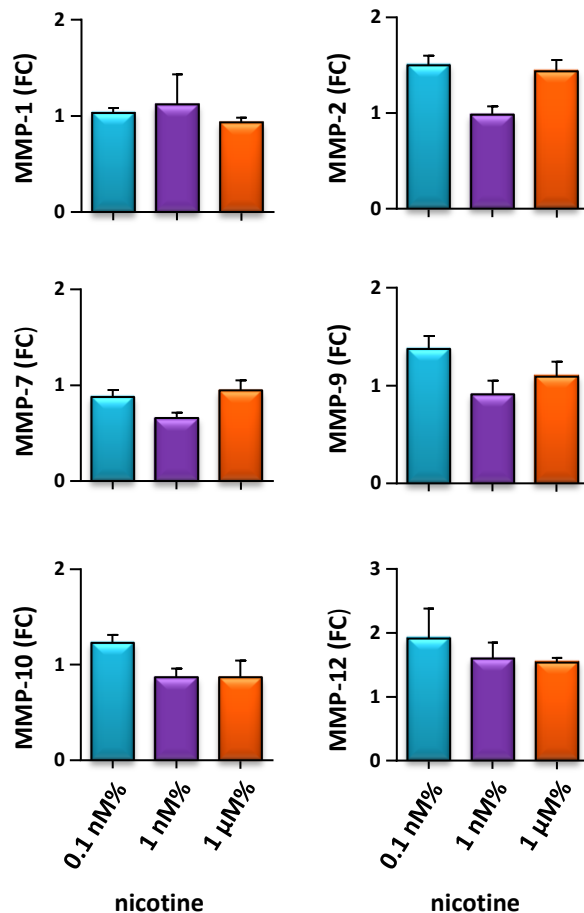
pM ϕ s were incubated with Btx. (A) or nicotine (B) for 9 days. The formation of MGCs was studied by optical microscopy after MGG staining. Representative micrographs are shown.

Figure 7. Effect of nicotine on cytokine production by pMφs



Unstimulated pMφs (A) and LPS-stimulated pMφs (B) were incubated with nicotine for 24 h. Supernatants were collected and assayed for the presence of IL-10, TNF, and IL-33. Data are presented as mean $\pm$ SEM of three different experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Figure 8. Modulation by nicotine of the transcriptional expression of MMPs



pMφs were incubated with different concentrations of nicotine for 24 h. RNA was extracted and qRT-PCR was conducted with probes for MMPs. Results were normalized using ACTB and are expressed as the median of fold change. The FC values were normalized using ACTB as internal controls. They are expressed relative to pMφs incubated in the absence of CSE.

Supplementary Table 1. Sequences of PCR primers

	GENE SYMBOL	5' _3' (Forward)	5' _3' (Reverse)
M1	CXCL9	ACACTTGC GGATATTCTGGACT	GGGAGATGGTGTGTAATTGAT
	EDN1	CCTCCATCCCCATACTAAATC	GTCTCCAAAAATCAAGGACAGG
	HESX1	GCTCGGGGAAAACAAACC	TTCTTCTGGCATTGGGTGA
	IDO1	TCATCTCACAGACCACAAGTCA	CAAAATAGGAGGCAGTTCCAGT
	IL15	AGAATGTGAGGAACTGGAGGAA	TGTCTAAGCAGCAGAGTGATGT
	IL15RA	ATCTTCCGTCCCTCATCCTAAC	CTCAGCATCTCTCCACCTTT
	IL2RA	GTTGAAGAGGAAGGGCAAAAC	ACTGGGAAGTTGGAATGAGATG
	TNF	CATCTATCTGGGAGGGGTCTTC	AGGAGGGGGTAATAAAGGGATT
	TNFSF10	GAAAATAATCCCCACACGCTAC	GTCACTCTCTCCACCTCACA
M2	ALOX15	AACTTCCACCAGGCTTCTCTC	GGGGGCTGAAATAACCAAAG
	CCL13	GAGCAGAGAGGCAAAGAAACA	ATGTGAAGCAGCAAGTAGATGG
	CCL23	CATCTCCTACCCCCACGAA	CATTCTCACGCAAACCTGAACT
	CHN2	AGAACTGTGGCTGGAAAATGAG	GTGGTTGTCTGTTGTGTGTGAG
	CLEC4F	GGCATTCTGGTAGAGTTCACA	ATACTTTCTGAGTGGGCAGGA
	CTSC	GAGGTTGTGTCTTGTAGCCAGT	CCCCTTTTGTAGTGGAGGAAG
	FN1	ACACCTGGAGCAAGAAGGATAA	CCACAGAGTAGACCACACCACT
	HRH1	ACTTGGAGGTGGTATGTGCTG	CTCAGGGCTTGCTTCTTGTAGT
	SLC4A7	CCCTCAAACAGTCCTCCTTCT	TTTCCTCATTCTTCTGCTCCTC
MMP	MMP1	TAGCTCAGGATGACATTGATGG	GAAAAACCGGACTTCATCTCTG
	MMP2	TACTGGATCTACTCAGCCAGCA	CTTCAGGTAATAGGCACCCTTG
	MMP7	CGATCCACTGTAATATGCGGTA	AGAAGCCAAACTCAAGGAGATG
	MMP9	CAGGGACCACAACCTCGTCA	CACCACCACAACATCACCTATT
	MM10	TGACAGGGAAGCTAGACACTGA	TTCCCAGACTTTTCAGAGCTTTC
	MMP12	TAGAGAAGGAAGGGCTTCAGT	GCCACTTTTGGAGTACTTGTCC
	ACTIN	GGAAATCGTGCGTGACATA	AGGAAGGAAGGCTGGAAGAG

Supplementary Table 2. M1/M2 transcripts in pMφs exposed to CSE

GENES	24 h			48 h		
	0.2%	0.5%	1%	0.2%	0.5%	1%
CXCL9	1.4	1.3	1.2	3.1	0.1	0.4
EDN1	0.7	2.8	1.2	3.3	0.4	1.8
HESX1	ND	ND	1.2	6.6	0.6	5.3
IDO1	0.7	1.3	1.2	3	0.3	2.3
IL15	0.6	0.4	0.2	3	0.1	0.4
IL15RA	2.7	1.8	0.8	2	0.1	1.4
IL2RA	0.7	1.5	1.2	3.8	0.3	1.1
TNF	0.7	2.9	1.2	12	0.6	3
TNFSF10	0.7	1.3	1.2	5.5	0.6	5
ALOX15	0.7	1.3	1.2	5.5	1.2	3
CCL13	0.7	2.3	1.2	2.7	2.6	12.1
CCL23	0.7	1.3	1.2	5.5	0.6	6
CHN2	ND	1.6	1.2	5.5	0.6	3
CLEC4	ND	ND	ND	2.7	0.3	1.5
CTSC	1.2	0.7	1.3	0.9	0	0
FN1	0.9	0.7	0.3	1.4	0.2	0.8
HRH1	0.9	1	0.4	ND	ND	ND
SLC4A7	0.5	0.6	0.5	5	116.6	70.5

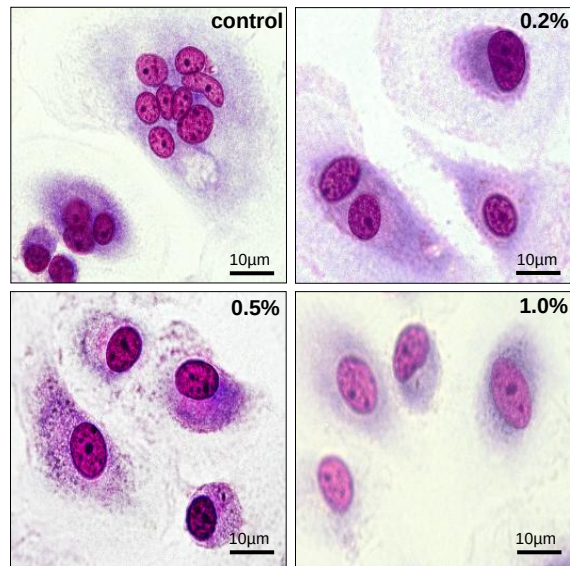
Nine genes of M1 macrophages (in red) and 9 genes of M2 macrophages (in blue) were selected. Their modulation in pMφs treated with different concentrations of CSE compared with control pMφs was studied by qRT-PCR.

Supplementary Table 3. M1/M2 transcripts in pMφs exposed to nicotine

GENES	24 h			48 h		
	0.1nM	1nM	1μM	0.1nM	1nM	1μM
CXCL9	0.9	0.7	2.5	1.5	37	1.1
EDN1	0.3	0.5	0.5	1.7	20.6	1
HESX1	0.6	0.4	0.7	0.1	1.1	0.2
IDO1	0.8	0.8	1.3	1.3	6.9	0.5
IL15	1.1	1	1.1	4.7	54.9	0.9
IL15RA	1.8	1.2	1.3	1.4	11.7	0.5
IL2RA	1.5	1.1	1.4	0.1	3	0.2
TNF	2.4	0.9	1.3	0.5	10.3	3.3
TNFSF10	2.1	2.9	1.8	1.5	9.2	1.6
ALOX15	0.5	0.4	1.7	0.8	11.6	0.9
CCL13	1.2	1.4	1.8	0.8	23.3	3.6
CCL23	1.6	1.6	2	0.7	15.9	0.6
CHN2	0.8	0.8	1.3	0.4	5.8	0.4
CLEC4	0.8	ND	1.3	0.8	23.3	0.9
CTSC	2.9	0.9	0.9	0.2	0.2	0.1
FN1	1.7	1	1.3	0.8	16.8	2.2
HRH1	ND	ND	11.8	1.2	8.2	0.6

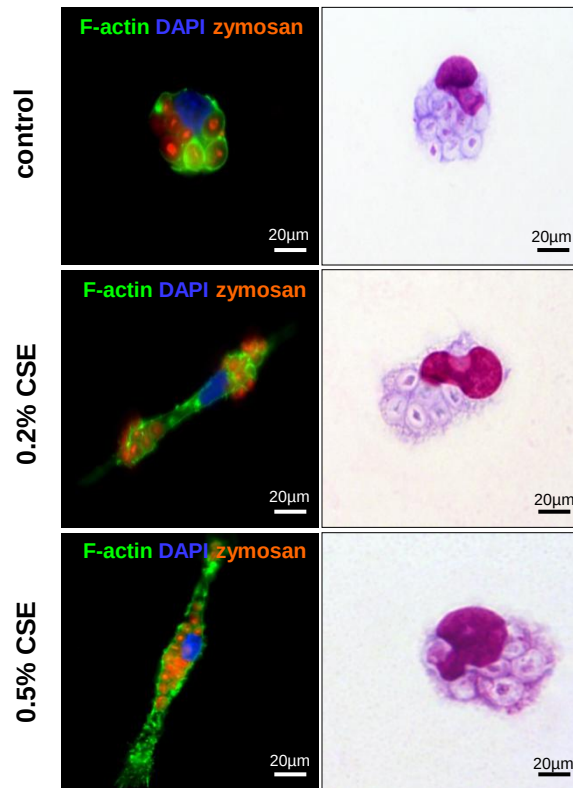
Nine genes of M1 and M2 polarized macrophages were respectively selected.. Their modulation in pMφs treated with different concentrations of nicotine compared with control pMφs was studied by qRT-PCR.

Supplementary Figure 1. Effect of CSE on the ability of pMφs to form MGCs



pMφs were incubated in the presence or the absence of different concentrations of CSE. After 9 days, cells were stained with MGG. Representative micrographs are shown. In the absence of CSE, MGCs contained 8 to 10 nuclei, while the remaining MGCs found after treatment with 0.2% CSE contained only 2 or 3 nuclei. With higher concentrations of CSE, cells were mononucleated.

Supplementary Figure 2. Effects of CSE on the uptake of opsonised particles



Fluorescent zymosan particles were incubated for 1 h with 10% AB human serum and incubated with pMφs for 6 h in the presence or the absence of CSE. The uptake of opsonised zymosan was analyzed by fluorescence microscopy after cell labelling with DAPI and phalloidin (left). pMφs were also stained with MGG and examined with optical microscopy (right). Representative micrographs of zymosan uptake are shown.

A. Article 2

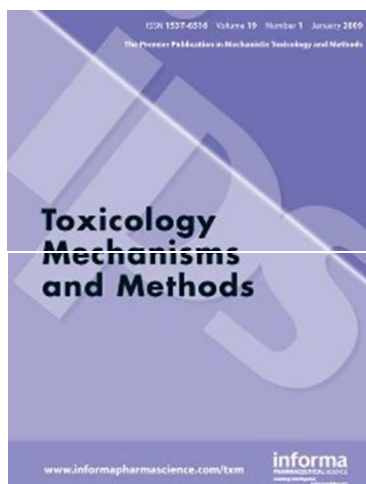
Prenatal exposure to cigarette smoke enhances strong oxidative stress in astrocytes of neonatal rat

Yosra Hamdi, Hayfa Madfai*, Rym Belhareth*, Mokni Meherzia,
Olfa Masmoudi-Kouki and Mohamed Amri

En revision

Le stress oxydatif est impliqué dans la pathogénèse des maladies liées au tabagisme. La protection des astrocytes de toute agression semble être essentielle pour maintenir le bon fonctionnement du cerveau.

Dans cette étude, nous avons étudié l'effet de l'exposition gestationnelle des rats à la fumée de cigarettes sur la survie des astrocytes. Les rats nouveau-nés ont été pesés 24 heures après la naissance puis les hémisphères cérébraux ont été recueillis pour la culture des astrocytes. L'incubation en présence de H_2O_2 des astrocytes isolés chez les animaux exposés à la fumée de cigarette diminue significativement la proportion de cellules vivantes par rapport à des cellules contrôles. En outre, H_2O_2 incubé avec les cellules astrogliales après exposition à la fumée de cigarette réduit à la fois l'activité de la superoxyde dismutase et de la catalase. Cette étude indique ainsi que les cellules astrogliales provenant de rats nouveau-nés exposés *in utero* à la fumée de cigarette sont extrêmement vulnérables aux agressions oxydatives. L'existence de lésions excitotoxiques chez les nouveau-nés exposés *in utero* à la fumée de cigarette suggère que, malgré l'importante activité antioxydante des astrocytes, ces derniers ne peuvent survivre et ne peuvent donc protéger les neurones soumis au stress.



Prenatal exposure to cigarette smoke enhances strong oxidative stress in astrocytes of neonatal rat

Journal:	<i>Toxicology Mechanisms and Methods</i>
Manuscript ID	UTXM-2015-0339.R1
Manuscript Type:	Original Paper
Date Submitted by the Author:	04-Jan-2016
Complete List of Authors:	Hamdi, Yosra; Laboratory of Functional Neurophysiology and Pathology, Research Unit UR11ES09, Department of Biological Sciences, Faculty of Science of Tunis, University Tunis El Manar, 2092 Tunis, Tunisia Medfai, Hayfa; Laboratory of Functional Neurophysiology and Pathology, Research Unit UR11ES09, Department of Biological Sciences, Faculty of Science of Tunis, University Tunis El Manar, 2092 Tunis, Tunisia Belhareth, Rym; Laboratory of Functional Neurophysiology and Pathology, Research Unit UR11ES09, Department of Biological Sciences, Faculty of Science of Tunis, University Tunis El Manar, 2092 Tunis, Tunisia Mokni, Meherzia; Laboratory of Functional Neurophysiology and Pathology, Research Unit UR11ES09, Department of Biological Sciences, Faculty of Science of Tunis, University Tunis El Manar, 2092 Tunis, Tunisia Masmoudi-Kouki, Olfa; Laboratory of Functional Neurophysiology and Pathology, Research Unit UR11ES09, Department of Biological Sciences, Faculty of Science of Tunis, University Tunis El Manar, 2092 Tunis, Tunisia Amri, Mohamed; Universite de Tunis El Manar Faculte des Sciences de Tunis
Keywords:	cigarette smoke, Astrocytes, oxidative stress, SOD, Catalase

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



Ms # Toxicology Mechanisms and Methods ID UTXM-2015-0339

Revised version

Prenatal exposure to cigarette smoke enhances oxidative stress in astrocytes of neonatal rat

Yosra Hamdi, Hayfa Madfai*, Rym Belhareth*, Mokni Meherzia, Olfa Masmoudi-Kouki and Mohamed Amri

Laboratory of Functional Neurophysiology and Pathology, Research Unit UR11ES09, Department of Biological Sciences, Faculty of Science of Tunis, University Tunis El Manar, 2092 Tunis, Tunisia

(*) Equal contribution

Corresponding authors at: Laboratory of Functional Neurophysiology and Pathology, Research Unit UR/11ES09. Faculty of Science of Tunis. University of Tunis El Manar, Tunis. 2092. Tunisia. Tel: +216 71 872 600; Fax: +216 71 871 666.

E-mail address: mohamed.amri@fst.rnu.tn

Running title: Gestational cigarette exposure and astrocytes assaults.

Abstract

Oxidative stress is involved in the pathogenesis of smoking-related disease. Protection of astrocytes from oxidative insult appears essential to maintain brain function. In this study, we have investigated the effect of gestational cigarette exposure on astrocyte survival. Pregnant female were randomly allocated to the control group or to the cigarette smoke group in which they were exposed to 6 cigarettes per day in an exposure chamber, twice a day for 20 days. The control group was kept in the exposure chamber for the same duration, but without exposure to cigarette smoke. Newborn rats from both groups were weighed 24 hours after birth and then cerebral hemispheres were collected for astrocyte culture. Incubation of astrocytes isolated from animals exposed to cigarette smoke with 300 μM H_2O_2 for 1 h induces a significant decrease of the proportion of surviving cells compared to cells isolated from control animals. We have observed that H_2O_2 -treated astroglial cells derived from cigarette smoke exposure reduced both superoxide dismutase and catalase activities. In conclusion, this study indicates that astroglial cells derived from newborn rats exposed *in utero* to cigarette smoke are extremely vulnerable to oxidative assault than cultured astrocytes obtained from control animals. These results point out the existence of excitotoxic lesions in newborn exposed *in utero* to cigarette smoke and suggest that despite their high antioxidative activities, astrocytes cannot survive and protect neurons under massive oxidative stress.

Key words: cigarette smoke, Astrocytes, oxidative stress, SOD, catalase

Abbreviations: H_2O_2 , hydrogen peroxide; ROS, reactive oxygen species; SOD, superoxide dismutase; LDH, Lactate dehydrogenase; PCS, prenatal cigarette smoke.

Introduction

Cigarette smoking during pregnancy continues to be a significant public health concern (Borgerding and Klus, 2005) and remains the most preventable cause of premature birth, birth defect and infant death (Campos *et al.*, 2014; Hackshaw *et al.*, 2011). Epidemiological studies indicate that passive maternal smoking can have a negative impact on fetal growth (Lammer *et al.*, 2004; 2005). Most tobacco constituents have a low molecular weight and high water solubility, and therefore can easily cross the placenta (Jauniaux and Burton, 2007). In particular, nicotine passes freely across to the fetus which is accordingly exposed to relatively higher nicotine concentrations than its mother. Furthermore, cigarette smoke can have a direct toxic effect on the fetal cells or an indirect effect through damage or functional disturbances of the placenta (Wickstrom, 2007). Smoking may also affect fetal development by influencing maternal nutritional intake and metabolism (Jauniaux and Burton, 2007).

It is now established that cigarette smoking causes a disruption of oxidative metabolism (Somborac-Bacura *et al.*, 2013). This disturbance derives from the fact that cigarette smoke encompasses and generates various reactive oxygen species (ROS) such as superoxide radical, hydrogen peroxide and hydroxyl radical (Aoshiba and Nagai, 2003). Highly reactive radicals are known to alter cellular antioxidant defences and to induce a strong oxidative stress responsible for the oxidation of membrane lipids, cellular proteins and DNA (Asadi *et al.*, 2012; Shibata and Kobayashi, 2008), which are toxic for the cells and can trigger cell death by apoptosis. The brain is the most susceptible organ to oxidative damage because of its high oxygen demand and the high amounts of polyunsaturated fatty acids present in neuronal membranes (Uttara *et al.*, 2009). It is well documented that astroglial cells contain high levels of ROS scavenger molecules such as glutathione (Dringen and Hirrlinger, 2003) and the antioxidant enzymes Mn- and Cu,Zn-superoxide dismutases (Mn- and Cu,Zn-SOD), catalase and glutathione peroxidase (Lindenau *et al.*, 2000; Saha and Pahan, 2007; Sokolova *et al.*, 2001) which are not only involved in the protection of astroglial cells against the deleterious effects of ROS but may also play a critical role for neuron survival (Fernandez-Fernandez *et al.*,

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

2012). In fact, astrocytes contribute to the defense of surrounding neurons by providing trophic supports and antioxidant molecules *i.e.* the glial cell-line derived neurotrophic factor (Sandhu *et al.*, 2009) and glutathione precursors (Masmoudi-Kouki *et al.*, 2011). Despite their high antioxidative activities, astrocytes can be affected, in terms of viability and functionality, by an insurmountable oxidative stress (Ferrero-Gutierrez *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2009). In particular, astrocyte cells are extremely vulnerable to H₂O₂ and astrocytic apoptosis occurs in various brain injuries (Giffard and Swanson, 2005; Takuma *et al.*, 2004). Interestingly, excessive production of H₂O₂ is observed in healthy subjects after the consumption of only one cigarette and it has been established that H₂O₂-provoked oxidative stress plays a major role in pathogenesis of smoking-related diseases (Guatura *et al.*, 2000).

As loss of glial cells may critically impair neuronal survival, protection of astrocytes from oxidative insult appears essential to maintain brain function. The purpose of the present study was thus to examine the effect of prenatal cigarette smoke exposure on the vulnerability of cells to oxidative injuries in cultured astroglial cells from newborn rats.

Materials and Methods

Experimental animals

The animals used were pregnant rats of the Wistar strain (Pasteur Institute, Tunis, Tunisia). They were acclimatized to the laboratory environment under controlled conditions of temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), average humidity ($70 \pm 10\%$) and light—dark (12:12 h). They were provided with food and water ad libitum for several days prior to the experiment. Animals were divided into two groups of 6 animals each, Groupe 1: control, not exposed to cigarette at all and group 2, was exposed to cigarette smoke. Approval for these experiments was obtained from the Medical Ethical Committee For the Care and Use of Laboratory Animals of Pasteur Institute of Tunis (approval number: FST/LNFP/Pro 152012).

Cigarette smoke exposure

Pregnant rats were exposed to side stream cigarette smoke in whole body smoke exposure chamber immediately after being pointed as addicted (Florek *et al.*, 2005) and exposed to the tobacco smoke generated from a Tunisian brand of cigarettes without a filter tip. Animals were exposed to 6 cigarette smoke with an interval of 10 min between each cigarette twice daily on Days 1-20 of gestation. Control rats were placed in smoking chambers for a total period of time that was the same as for exposed rats, but control rats were not exposed to cigarette smoke. The new-born rats were sacrificed 24 hours after birth.

Secondary cultures of rat cortical astrocytes

Secondary cultures of rat cortical astrocytes were prepared as previously described (Hamdi *et al.*, 2011). Briefly, cerebral hemispheres from one day- new born rats of group 1 and 2 were collected separately in DMEM/F12 (2:1; v/v) culture medium supplemented with 2 mM glutamine, 1‰ insulin, 5 mM HEPES, 0.4% glucose and 1% of the antibiotic-antimycotic solution. The tissues were dissociated mechanically with a syringe equipped with a 1-mm gauge needle, and filtered through a 100-µm sieve (Falcon, Franklin Lakes, NJ, US). Dissociated cells were resuspended in culture

medium supplemented with 10% FBS, plated in 175-cm² flasks (Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Germany) and incubated at 37 °C in a 5% CO₂/95% O₂ atmosphere. When cultures were confluent, astrocytes were isolated by shaking overnight the flasks with an orbital agitator. Adhesive cells were detached by trypsination and preplated for 5 min to discard contaminating oligodendrocytes and microglial cells. Then, non-adhering cells were harvested and plated on Petri dishes at a density of 0.3 x 10⁶ cells/ml. For measurement of cell cytotoxicity, cells were seeded in 24-well plates. After 5 days (DIV5), the proportion of astrocytes was higher than 98% of total cells, as determined by staining with antibodies against glial fibrillary acidic protein (Castel *et al.*, 2006). All experiments were performed on 5-day-old secondary cultures

Cell cytotoxicity measurement

The cytotoxicity of cigarette smoking on astrocytes was determined by measurement of lactate dehydrogenase (LDH) activity in culture medium. The amount of LDH released into medium was measured by LDH assay kit (Bio-Maghreb, Ariana, Tunisia) according to the manufacturer's instructions. The results were expressed as a percentage of LDH release from control cells.

Measurement of antioxidant enzyme activities

Cultured cells from group 1 and 2 were washed twice with PBS, homogenized in the same solution at 4°C and harvested by centrifugation (350g, 4°C, 10 min). Cell pellet was resuspended in 50 µL of ice-cold lysing buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 8), 10 mM EDTA, 100 µM phenylmethylsulfonylfluoride and 1% Triton X-100 and the homogenate was centrifuged at 16, 000 g for 20 min at 4°C. Cellular extract contained in the supernatant was stored at -20°C until enzyme activity determinations.

SOD activity was measured using a spectrophotometric assay, which consists in measuring epinephrine autooxidation induced by superoxide anion. Proteins (60 µg) contained in cellular extracts were incubated for 3 min with a mixture containing bovine catalase (0.4 U/µL), DL-epinephrine (5

mg/mL) and Na_2CO_3 / NaHCO_3 buffer (62.5 mM, pH 10.2). The oxidation of epinephrine was measured at 480 nm with a Bio-Rad spectrophotometer (Bio-Rad Laboratories, Philadelphia, US).

Catalase activity was determined on the basis of the decrease of H_2O_2 . Proteins (80 μg) contained in cellular extracts were mixed with 30 mM H_2O_2 in PBS. The disappearance of H_2O_2 was measured at 240 nm for 180 s at 30 s intervals. Catalase activity was calculated using the extinction coefficient of 40 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ for H_2O_2 .

Measurement of Proteins

Quantification of protein concentration in cellular extract was determined by Biuret method (Peters, 1968). Briefly, 20 μl of sample was mixed with 1 ml of Biuret reagent, incubated at ambient temperature for 5 min and absorbance was read at 540 nm with a Bio-Rad spectrophotometer. Corresponding protein concentration in each sample was calculating from the standard protein (bovine albumin) provided by the kit.

Statistical analysis

Data are presented as the mean $\pm$ SEM from at least three independent experiments. Statistical analysis of the data was performed by using Student's t test and ANOVA, followed by Bonferroni's test.

Results

Effect of cigarette smoke exposure during pregnancy on body weight

Exposure of female rats to cigarette smoke during pregnancy resulted in a significant decrease of body weight (Fig. 1A). Lower body weights were observed in their newborns but no death or malformed animals has been observed in the exposed group (Fig. 1B).

Effect of prenatal cigarette smoke exposure on astrocyte death

Astrocyte cells obtained from newborn rats prenatally exposed to cigarette smoke showed a significant decrease of the proportion of surviving cells (Fig. 2A). Examination of cultures by phase-contrast microscopy revealed that cells derived from cigarette smoke-exposed animals displayed a flat polygonal morphology similar to that of astrocytes from untreated-females, while, smoke induced a decrease of cell confluence (Fig. 2B).

We have previously reported that, in cultured astrocytes, H₂O₂ (100 to 800 μM) provoked a dose- and time-dependent decrease of the proportion of surviving cells. The concentration of 300 μM H₂O₂, which killed 50% of cells, after 1 h of treatment, was chosen to evaluate the impact of *in utero* cigarette smoke exposure on exacerbation of oxidative damages. In the present study, we show that cigarette smoke induced a significant increase of H₂O₂ (300 μM)-induced LDH release from cultured astrocytes compared to cells isolated form control animals (141.4± 6.3 untreated animals vs 181.6 ± 6.2 treated animals) (Fig. 2C).

Effect of prenatal cigarette smoke exposure on antioxidant enzyme activities in cultured astrocytes

To test whether prenatal smoking affects the oxidative stress parameters of postnatal astrocytes, we assessed the activities of the two antioxidant enzymes SOD and catalase, considering their major effects on cellular antioxidant defence. As illustrated in Fig. 3, prenatal exposure to cigarette smoke provoked a significant decrease of both SOD (Fig. 3A) and catalase (Fig. 3B) activities in cultured astrocytes. In order to evaluate the vulnerability of astrocytes isolated from postnatal rat exposed *in*

1
2
3 *utero* to cigarette smoke, cells were treated with 300 μ M H₂O₂ for 1 h. In accordance with its pro-
4
5 oxidant action, H₂O₂ reduced significantly SOD (- 26%, P<0.05) and catalase (-37%, P<0.05)
6
7 activities. Cultured astrocytes from cigarette smoke-exposed animals exhibited a lower SOD (- 62 %,
8
9 P < 0.001) (Fig. 3C) and catalase (- 56 %, P< 0.001) (Fig. 3D) activities than cells isolated from
10
11 control animals, in the presence of the same dose of H₂O₂.
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Discussion

Here, we provide experimental evidence between prenatal cigarette smoke exposure and disturbances seen in astroglial cells of neonatal rats. Following gestational exposure to cigarette smoke, the offspring were found not only to have lower body weight but also to be impaired in astrocytes activities on multiple levels, ranging from cell damage and death to specific alterations via disturbances of the endogenous antioxidant system.

In agreement with previous reports (Campos *et al.*, 2014; Schneider *et al.*, 2011), we observed that offspring of animals exposed to cigarette smoke *in utero* show significantly lower birth weights. Interestingly, it has been reported that prenatal cigarette exposure in women during pregnancy reduces body weight, length and head circumference of newborns, suggesting relationship between smoke exposure exposure and adverse birth outcome (Perera *et al.*, 2005; Tsui *et al.*, 2008). These weight differences may be due to decrease of metabolic activities and reduction in appetite for food induced by cigarette smoke. In agreement with this hypothesis, previous reports have revealed that maternal smoking is associated with alterations of protein metabolism and enzyme activity in fetal cord blood (Jauniaux *et al.*, 2001; Jauniaux and Burton, 2007). It has also been found that brain responds to altered energy homeostasis by adjusting food intake (Morton *et al.*, 2006) and both maternal and fetal blood contain a high level of carboxyhemoglobin when the mother smokes during pregnancy (Soothill *et al.*, 1996).

The brain is extremely vulnerable to oxidative stress, in part because it contains a high degree of polyunsaturated fatty acids, consumes high fraction of the total oxygen consumption and is not enriched in antioxidant defenses (Uttara *et al.*, 2009). Cigarette smoke exposure may account for ROS production in neuronal cells, since smoking generates an array of other free radical species, notably H₂O₂, superoxide anions, and hydroxyl radicals in tissues (Gokulakrishnan and Ali, 2010). These ROS, which can easily cross the plasma membrane (Kaczara *et al.*, 2010; Pedroso *et al.*, 2009) impair cellular antioxidant defenses and thus promotes lipid peroxidation leading to cell death (Hamdi *et al.*, 2011, 2012) in the smoker's tissues (Pryor and Stone, 1993) and rat brain (Anbarasi *et al.*, 2005). Consistent with this notion, this study suggests that prenatal smoking exposure induced a strong

increase of ROS production, in cultured astrocytes. The stimulatory effect of cigarette smoking on ROS formation and alteration of endogenous antioxidant systems are probably keys mechanisms in neurotoxic action of smoke. Indeed, we have observed that exposition to cigarette smoke during gestational period reduces significantly SOD and catalase antioxidant enzymes activities. Furthermore, *in vitro* studies have confirmed that astrocytes isolated from *in utero* cigarette smoking-exposed rats exhibit an increased vulnerability to oxidative stress induced by H₂O₂. Similarly, data from other groups indicate that inhibition of SOD and/or catalase activities in cultured astrocytes is associated with an exacerbation of oxidative damages induced by H₂O₂ or hypoxia (Desagher *et al.*, 1996 ; Li *et al.*, 2008; Pedroso *et al.*, 2009). Besides, it has been reported that, in cultured astrocytes, stimulation of SOD and catalase activities or overexpression of SOD is able to prevent ROS-induced alteration of mitochondrial integrity, caspase-3 activation and thus cell apoptosis (Hamdi *et al.*, 2011, 2012; Yang *et al.*, 2008). Altogether, these data indicate that the exacerbation of oxidative injuries induced by prenatal exposure to cigarette smoke in astrocytes is attributable, at least in part, to inhibition of endogenous antioxidant systems and over-production of ROS levels.

Prenatal cigarette smoke exposure-reduced antioxidant enzyme activities might have a physiopathological significance in neurodegenerative diseases and stroke. The central nervous system is sensitive to oxidative stress due to its high metabolism and high levels of unsaturated lipids so that down-regulation of antioxidant enzyme systems in astroglial cells could critically impair neuronal survival observed during brain development and several neuropathological processes. It is now established that astroglial cells contribute to the defense of surrounding neurons under moderate oxidative stress by releasing neuroprotective factors and antioxidant molecules such as the glial cell-line derived neurotrophic factor (Sandhu *et al.*, 2009), endozepines (Kaddour *et al.*, 2013) and glutathione precursors (Takuma *et al.*, 2004). Other studies indicate that oxidative damages and inhibition of antioxidant enzyme activities, in astrocytes, are continuously increased with progression cigarette smoking exposure (Campos *et al.*, 2014; Hilbert and Mohsenin, 1996 ; Hulea *et al.*, 1995). Therefore, protection of astrocytes from oxidative assault appears essential to maintain cerebral antioxidant competence and to prevent neuronal damage as well as to facilitate neuronal recovery.

In conclusion, the present study demonstrates that exposure to cigarette smoke during pregnancy exerts a potent pro-oxidant action in offspring’s astrocytes. The toxic effect of prenatal cigarette smoke exposure is attributable, at least in part, to inactivation of endogenous antioxidant systems, especially to reduction of SOD and catalase activities leading to formation of ROS and finally to cell death.

Acknowledgments

Financial support of the Tunisian Ministry of research is gratefully acknowledged. The authors wish to thank Mr Samir Elbahi for skilful technical assistance.

Declaration of Interest statement

The authors report no declarations of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

References

Anbarasi K, Vani G, and Devi CS. (2005). Protective effect of bacoside A on cigarette smoking-induced brain mitochondrial dysfunction in rats. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, **24**, 225-234.

Aoshiba K, and Nagai A. (2003). Oxidative stress, cell death, and other damage to alveolar epithelial cells induced by cigarette smoke. *Tob Induc Dis*, **1**, 219-226.

Asadi E, Jahanshahi M, and Golalipour MJ. (2012). Effect of vitamin e on oocytes apoptosis in nicotine-treated mice. *Iran J Basic Med Sci*, **15**, 880-884.

Borgerding M, and Klus H. (2005). Analysis of complex mixtures-cigarette smoke. *Exp Toxicol Pathol*, **57 Suppl 1**, 43-73.

- Campos KK, Dourado VA, Diniz MF, Bezerra FS, and Lima WG. (2014). Exposure to cigarette smoke during pregnancy causes redox imbalance and histological damage in lung tissue of neonatal mice. *Exp Lung Res*, **40**, 164-171.
- Castel H, Diallo M, Chatenet D, Leprince J, Desrues L, Schouft MT, Fontaine M, Dubessy C, Lihrmann I, Scalbert E, et al. (2006). Biochemical and functional characterization of high-affinity urotensin II receptors in rat cortical astrocytes. *J. Neurochem*, **99**, 582-595.
- Desagher S, Glowinski J, and Premont J. (1996). Astrocytes protect neurons from hydrogen peroxide toxicity. *J Neurosci*, **16**, 2553-2562.
- Dringen R, and Hirrlinger J. (2003). Glutathione pathways in the brain. *Biol Chem*, **384**, 505-516.
- Fernandez-Fernandez S, Almeida A, and Bolanos JP. (2012). Antioxidant and bioenergetic coupling between neurons and astrocytes. *Biochem J*, **443**, 3-11.
- Ferrero-Gutierrez A, Perez-Gomez A, Novelli A, and Fernandez-Sanchez MT. (2008). Inhibition of protein phosphatases impairs the ability of astrocytes to detoxify hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med*, **44**, 1806-1816.
- Florek E, Ignatowicz E, Wrzosek J, and Piekoszewski W. (2005). Effect of rutin on total antioxidant status of rats exposed to cigarette smoke. *Pharmacol Rep*, **57**, 84-89.
- Giffard RG, and Swanson RA. (2005). Ischemia-induced programmed cell death in astrocytes. *Glia*, **50**, 299-306.
- Gokulakrishnan A, and Ali AR. (2010). Cigarette smoke-induced biochemical perturbations in human erythrocytes and attenuation by epigallocatechin-3-gallate--tea catechin. *Pharmacol Rep*, **62**, 891-899.
- Guatura SB, Martinez JA, Santos Bueno PC, and Santos ML. (2000). Increased exhalation of hydrogen peroxide in healthy subjects following cigarette consumption. *Sao Paulo Med J*, **118**, 93-98.
- Hackshaw A, Rodeck C, and Boniface S. (2011). Maternal smoking in pregnancy and birth defects: a systematic review based on 173 687 malformed cases and 11.7 million controls. *Hum Reprod Update*, **17**, 589-604.

Hamdi Y, Kaddour H, Vaudry D, Bahdoudi S, Douiri S, Leprince J, Castel H, Vaudry H, Tonon MC, Amri M, et al. (2012). The octadecaneuropeptide ODN protects astrocytes against hydrogen peroxide-induced apoptosis via a PKA/MAPK-dependent mechanism. *PloS one*, **7**, e42498.

Hamdi Y, Masmoudi-Kouki O, Kaddour H, Belhadj F, Gandolfo P, Vaudry D, Mokni M, Leprince J, Hachem R, Vaudry H, et al. (2011). Protective effect of the octadecaneuropeptide on hydrogen peroxide-induced oxidative stress and cell death in cultured rat astrocytes. *J Neurochem*, **118**, 416-428.

Hilbert J, and Mohsenin V. (1996). Adaptation of lung antioxidants to cigarette smoking in humans. *Chest*, **110**, 916-920.

Hulea SA, Olinescu R, Nita S, Crocnan D, and Kummerow FA. (1995). Cigarette smoking causes biochemical changes in blood that are suggestive of oxidative stress: a case-control study. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, **14**, 173-180.

Jauniaux E, Biernaux V, Gerlo E, and Gulbis B. (2001). Chronic maternal smoking and cord blood amino acid and enzyme levels at term. *Obstet Gynecol*, **97**, 57-61.

Jauniaux E, and Burton GJ. (2007). Morphological and biological effects of maternal exposure to tobacco smoke on the feto-placental unit. *Early Hum Dev*, **83**, 699-706.

Kaczara P, Sarna T, and Burke JM. (2010). Dynamics of H₂O₂ availability to ARPE-19 cultures in models of oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, **48**, 1064-1070.

Kaddour H, Hamdi Y, Vaudry D, Basille M, Desrues L, Leprince J, Castel H, Vaudry H, Tonon MC, Amri M, et al. (2013). The octadecaneuropeptide ODN prevents 6-hydroxydopamine-induced apoptosis of cerebellar granule neurons through a PKC-MAPK-dependent pathway. *J. Neurochem*, **125**, 620-633.

Lammer EJ, Shaw GM, Iovannisci DM, and Finnell RH. (2005). Maternal smoking, genetic variation of glutathione s-transferases, and risk for orofacial clefts. *Epidemiology*, **16**, 698-701.

Lammer EJ, Shaw GM, Iovannisci DM, Van Waes J, and Finnell RH. (2004). Maternal smoking and the risk of orofacial clefts: Susceptibility with NAT1 and NAT2 polymorphisms. *Epidemiology*, **15**, 150-156.

- Li Y, Bao Y, Jiang B, Wang Z, Liu Y, Zhang C, and An L. (2008). Catalpol protects primary cultured astrocytes from in vitro ischemia-induced damage. *Int J Dev Neurosci*, **26**, 309-317.
- Lindenau J, Noack H, Possel H, Asayama K, and Wolf G. (2000). Cellular distribution of superoxide dismutases in the rat CNS. *Glia*, **29**, 25-34.
- Masmoudi-Kouki O, Douiri S, Hamdi Y, Kaddour H, Bahdoudi S, Vaudry D, Basille M, Leprince J, Fournier A, Vaudry H, et al. (2011). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide protects astroglial cells against oxidative stress-induced apoptosis. *J. Neurochem*, **117**, 403-411.
- Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, and Schwartz MW. (2006). Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*, **443**, 289-295.
- Park SJ, Kim HY, Kim H, Park SM, Joe EH, Jou I, and Choi YH. (2009). Oxidative stress induces lipid-raft-mediated activation of Src homology 2 domain-containing protein-tyrosine phosphatase 2 in astrocytes. *Free Radic Biol Med*, **46**, 1694-1702.
- Pedroso N, Matias AC, Cyrne L, Antunes F, Borges C, Malho R, de Almeida RF, Herrero E, and Marinho HS. (2009). Modulation of plasma membrane lipid profile and microdomains by H₂O₂ in *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Radic Biol Med*, **46**, 289-298.
- Perera FP, Rauh V, Whyatt RM, Tang D, Tsai WY, Bernert JT, et al. (2005). A summary of recent findings on birth outcomes and developmental effects of prenatal ETS, PAH, and pesticide exposures. *Neurotoxicology* **26**, 573-587.
- Peters T Jr. (1968). Proposals for standardization of total protein assays. *Clin chem* **14**, 1147-1159.
- Pryor WA, and Stone K. (1993). Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxyxynitrate, and peroxyxynitrite. *Ann N Y Acad Sci*, **686**, 12-27; discussion 27-18.
- Saha RN, and Pahan K. (2007). Differential regulation of Mn-superoxide dismutase in neurons and astroglia by HIV-1 gp120: Implications for HIV-associated dementia. *Free Radic Biol Med*, **42**, 1866-1878.

Sandhu JK, Gardaneh M, Iwasiow R, Lanthier P, Gangaraju S, Ribecco-Lutkiewicz M, Tremblay R, Kiuchi K, and Sikorska M. (2009). Astrocyte-secreted GDNF and glutathione antioxidant system protect neurons against 6OHDA cytotoxicity. *Neurobiol Dis*, **33**, 405-414.

Schneider T, Ilott N, Brolese G, Bizarro L, Asherson PJ, and Stolerma IP. (2011). Prenatal exposure to nicotine impairs performance of the 5-choice serial reaction time task in adult rats. *Neuropsychopharmacology*, **36**, 1114-1125.

Shibata N, and Kobayashi M. (2008). The role for oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Brain Nerve*, **60**, 157-170.

Sokolova T, Gutterer JM, Hirrlinger J, Hamprecht B, and Dringen R. (2001). Catalase in astroglia-rich primary cultures from rat brain: immunocytochemical localization and inactivation during the disposal of hydrogen peroxide. *Neurosci Lett*, **297**, 129-132.

Somborac-Bacura A, van der Toorn M, Franciosi L, Slebos DJ, Zanic-Grubisic T, Bischoff R, and van Oosterhout AJ. (2013). Cigarette smoke induces endoplasmic reticulum stress response and proteasomal dysfunction in human alveolar epithelial cells. *Exp physiol*, **98**, 316-325.

Soothill PW, Morafa W, Ayida GA, and Rodeck CH. (1996). Maternal smoking and fetal carboxyhaemoglobin and blood gas levels. *Br J Obstet Gynaecol*, **103**, 78-82.

Takuma K, Baba A, and Matsuda T. (2004). Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection. *Prog Neurobiol*, **72**, 111-127.

Tsui HC, Wu HD, Lin CJ, Wang RY, Chiu HT, Cheng YC, Chiu TH, and Wu FY. (2008). Prenatal smoking exposure and neonatal DNA damage in relation to birth outcomes. *Pediatr res* **64**, 131-134.

Uttara B, Singh AV, Zamboni P, and Mahajan RT. (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuroparmacol*, **7**, 65-74.

Wickstrom R. (2007). Effects of nicotine during pregnancy: human and experimental evidence. *Curr Neuroparmacol*, **5**, 213-222.

Yang CS, Tzou BC, Liu YP, Tsai MJ, Shyue SK, and Tzeng SF. (2008). Inhibition of cadmium-induced oxidative injury in rat primary astrocytes by the addition of antioxidants and the reduction of intracellular calcium. *J Cell Biochem*, **103**, 825-834.

Legends

Fig. 1. Effect of cigarette smoke exposure on body weight

Rats from group 1 (non exposed animals, ○) and 2 (exposed animals, ■) were exposed during pregnancy to fresh air or to cigarette smoke and body weights were measured during pregnancy (A) and in newborn rats (B). Data are expressed as Mean ± SEM for n = 6 rats. ANOVA followed by Bonferroni's test: ***p* < 0.01; ****p* < 0.001; ns, not statistically different vs. control. ##*p* < 0.01; ####*p* < 0.0001 vs. prenatal exposed- animals. PCS: prenatal cigarette smoke-group

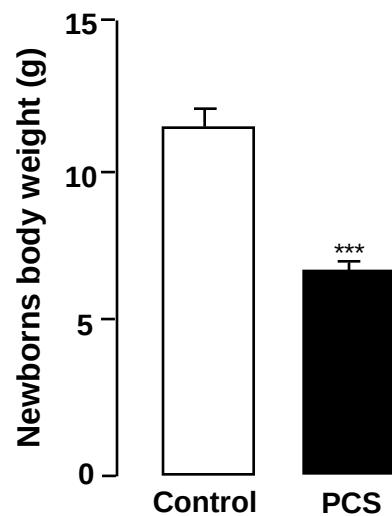
Fig. 2. Effect of cigarette smoke exposure on astrocyte survival

(A) Effect of prenatal cigarette smoke-induced release of lactate dehydrogenase from cultured rat astrocytes isolated from group 1 (offspring of non exposed animals, □) and 2 (offspring of smoke exposed animals, ■). The results are expressed as percentages of lactate dehydrogenase (LDH) released from untreated cells, quantified by using an LDH activity kit assay. Each value is the mean (± SEM) from at least 6 different wells from 3 independent cultures. ANOVA followed by the t.test. ****p* < 0.001 vs. control. (B) Phase-contrast images illustrating the effect of prenatal cigarette smoke in morphology of cultured rat astrocytes. Secondary astrocytes culture obtained from offspring of control animals (Ba) and treated animals (Bb) were photographed at 7-day-old. Scale bar = 50 μm. (C) Effect of H₂O₂-treatment on release of LDH from cultured rat astrocytes. Cells from group 1 (offspring of non exposed animals, □) and 2 (offspring of smoke exposed animals, ■) were incubated for 1 h with culture medium in the absence or presence of H₂O₂. ANOVA followed by the Bonferroni's test. **p* < 0.05; ****p* < 0.001 vs. control. ##*p* < 0.01 different vs. H₂O₂-treated cells. PCS: prenatal cigarette smoke-group

Fig. 3. Effect of prenatal cigarette smoke on SOD and catalase activities in postnatal cultured rat astrocytes.

Cells from group 1 (offspring of non exposed animals, □) and 2 (offspring of smoke exposed animals, ■) were incubated for 1 h with culture medium in the absence (A-B) or presence of H₂O₂ (C-D). SOD activity was determined by measurement of epinephrine autoxidation induced by superoxide anion,

and catalase activity by the decrease of H_2O_2 . The results are expressed as a percentage of control after calculating SOD activities (UI/min/mg protein) and catalase activities (mmol/min/mg protein). Each value is the mean ($\pm$ SEM) calculated from at least 3 different dishes from 3 independent cultures. ANOVA followed by the Bonferroni's test. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ vs. control. ## $p < 0.01$ different vs. H_2O_2 -treated cells. PCS: prenatal cigarette smoke-group



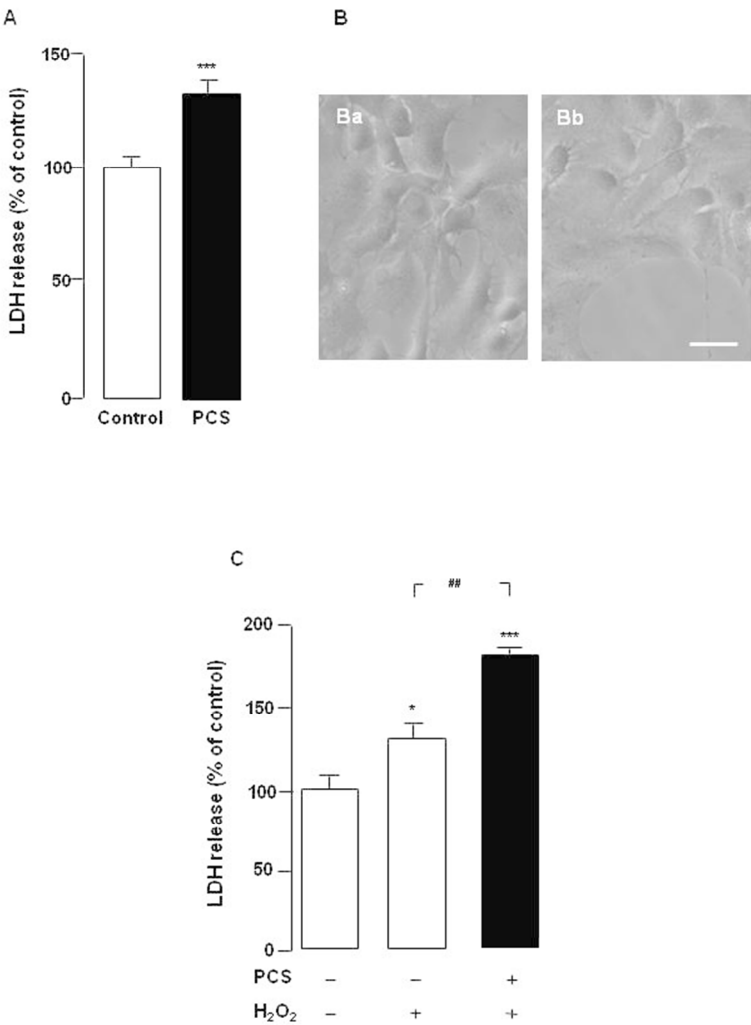


Figure 2
Hamdi et al.

190x254mm (96 x 96 DPI)

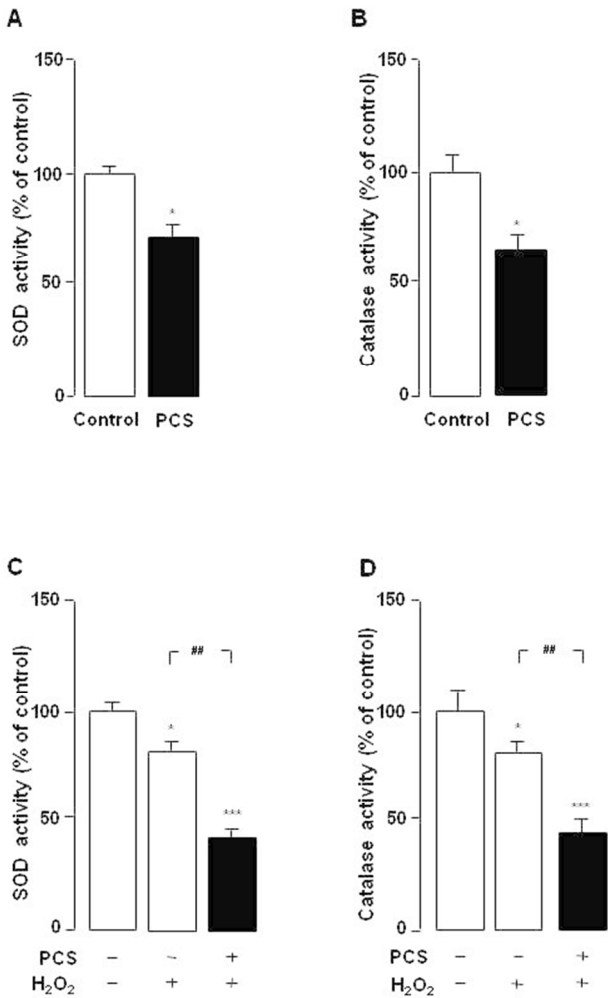


Figure 3
Hamdi et al.

190x254mm (96 x 96 DPI)

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

Il y a aujourd'hui dans le monde plus d'un milliard de fumeurs. Environ 20% d'entre eux sont des femmes. Il est par ailleurs bien établi que les femmes sont aussi sensibles que les hommes, sinon plus, aux méfaits du tabac. Les fumeurs, hommes et femmes, sont plus sujets aux cancers, aux maladies cardiaques et aux infections respiratoires. Le tabac provoque en outre des cancers spécifiquement féminins et a des effets nocifs sur la grossesse et la santé génésique.

Le tabagisme maternel augmente significativement le risque de complications graves de la grossesse en raison des nombreux composants de la cigarette qui peuvent traverser la barrière placentaire et atteindre ainsi le fœtus en plein développement.

Mon projet de thèse est parti du constat que les macrophages placentaires possèdent des propriétés spécifiques. Sur le plan phénotypique, ils expriment CD14 tout comme les monocytes et non pas CD68, un marqueur classique des macrophages. Sur le plan fonctionnel, ils se différencient en quelques jours en cellules géantes multinucléées, ce que ne font ni les monocytes ni les macrophages différenciés à partir de monocytes. C'est la raison pour laquelle j'ai en premier temps étudié la formation des cellules géantes multinucléées en présence de fumée de cigarette. J'ai montré que la cigarette affecte la capacité des macrophages placentaires à former des cellules géantes multinucléées. La fumée de cigarette affecte également la capacité des macrophages dérivés des monocytes à former des cellules géantes multinucléées lors de la formation *in vitro* de granulomes, ce qui suggère qu'elle affecte les macrophages indépendamment de leur tissu d'origine. J'ai montré également que la phagocytose de particules non opsonisées est fortement compromise en présence de fumée de cigarette mais pas celle des mêmes particules opsonisées, ce qui suggère que c'est l'étape d'adhésion des particules aux macrophages placentaires (récepteurs des lectines, intégrines) qui est affectée et non la machinerie phagocytaire elle-même. On peut supposer que les

nombreux produits chimiques, tels que des aldéhydes hautement réactifs, dont la fumée de cigarette est composée pourraient modifier les protéines membranaires des macrophages placentaires.

Les mécanismes conduisant à la formation de macrophages géants multinucléés ne sont pas bien compris. Ils dépendent de l'état d'activation des macrophages et comprennent la modulation de différents récepteurs. Ils impliquent également l'activité de différentes MMPs bien connues pour affecter la matrice extracellulaire. J'ai montré que différents gènes de MMPs, en particulier le gène codant MMP-12, sont surexprimés en présence de fumée de tabac. MMP-12 est une élastase spécifique des macrophages impliquée en particulier dans la réponse inflammatoire aiguë puisqu'elle augmente la libération de TNF. Il est à noter que MMP-12 joue un rôle important dans le développement de l'emphysème, une complication majeure de la consommation de tabac, puisque les macrophages alvéolaires des poumons emphyémateux en produisent des quantités élevées.

La surexpression des gènes de MMP-12 et des MMPs de façon plus générale devrait s'accompagner d'une surproduction de TNF. Cette hypothèse est étayée par des travaux sur les souris n'exprimant pas de récepteurs de TNF : elles sont protégées de la dégradation de la matrice alvéolaire causée par la fumée de cigarette. La capacité des macrophages placentaires à sécréter des cytokines aussi bien inflammatoires qu'anti-inflammatoires en présence de fumée de cigarette a été déterminée. On observe une plus grande production de TNF et d'IL-33, des médiateurs de la réponse Th1 et Th2 respectivement. On observe également une moindre production d'IL-10, une cytokine majeure de l'immunorégulation. Cette surproduction de TNF et la moindre production d'IL-10 renforce le contexte inflammatoire placentaire, ce qui pourrait être associé à un risque d'accouchement prématuré et d'avortement chez les femmes enceintes et fumeuses. J'ai également montré que le déséquilibre observé entre la production de cytokines inflammatoires et celle de cytokines anti-inflammatoires par

les macrophages placentaires exposés à la fumée de cigarette n'est pas lié à un déséquilibre M1/M2 comme l'indique l'étude des marqueurs transcriptionnels des macrophages M1 ou M2, ce qui est en accord avec des résultats montrant que les macrophages issus de placentas à terme ne se polarisent pas en macrophages M1 et M2.

Enfin, j'ai supposé que les effets de la fumée de tabac sur les macrophages placentaires pourraient être associés à la nicotine. Tel n'est pas le cas puisque montré puisque la nicotine n'induit ni un défaut de formation des cellules géantes multinucléées ni une moindre ingestion de particules non opsonisées. De façon similaire, elle n'affecte pas le profil transcriptionnel des MMPs, ce qui est distinct d'autres types cellulaires pour lesquels ces gènes sont surexprimés. Seule la production des cytokines inflammatoires telles que le TNF et l'IL-33 tu as fait ça est légèrement modulée par la nicotine, sans qu'on puisse en dire plus. En résumé, la nicotine ne semble pas jouer un rôle majeur dans la modulation des fonctions des macrophages placentaires par la fumée de cigarette, ce qui n'est probablement pas étonnant puisque celle-ci contient des milliers de molécules autres que la nicotine.

La grossesse est un état physiologique qui s'accompagne par une demande métabolique élevée en oxygène dont il résulte une surproduction de ROS et de peroxydation lipidique. Le cerveau est extrêmement vulnérable au stress oxydatif, en partie parce qu'il est riche en fer non hémique impliqué dans la production des ROS. En outre, le cerveau contient un nombre relativement élevé en acides gras polyinsaturés qui représentent un excellent substrat pour les réactions de peroxydation. Dans cette deuxième partie de mon étude, j'ai étudié le stress oxydant associé à l'exposition passive à la fumée de cigarette dans le cerveau de rats exposés in utero. J'ai montré qu'il se manifeste par une augmentation de la peroxydation lipidique et une réduction du statut antioxydant enzymatique causée par l'exposition à la fumée de cigarette.

Après exposition pendant la gestation à la fumée de cigarette, la progéniture présente une masse corporelle inférieure aux contrôles. Il est bien connu que l'exposition prénatale à la cigarette chez les femmes pendant la grossesse réduit le poids corporel, la longueur et la circonférence de la tête des nouveau-nés, ces différences de poids pouvant être dues à la réduction des activités métaboliques ainsi que la diminution de l'appétit induite par la fumée de cigarette. Les cellules astrocytaires sont également compromises à plusieurs niveaux, allant de la mort cellulaire à des modifications plus spécifiques telles que la perturbation du système antioxydant endogène. L'effet stimulant de la cigarette sur la formation des ROS et l'altération du système antioxydant endogène sont probablement des mécanismes clés de l'action neurotoxique de la fumée. C'est ainsi que l'exposition à la fumée de cigarette au cours de la gestation réduit considérablement les activités des enzymes antioxydantes (SOD et catalase). Des études *in vitro* ont montré que les astrocytes isolés à partir de rats exposés au tabac *in utero* présentent une vulnérabilité accrue au stress oxydatif induit par H₂O₂. D'autres données indiquent que l'inhibition de l'activité de la SOD et/ou de la catalase dans les astrocytes en culture est associée à une exacerbation des dommages oxydatifs. Il est maintenant établi que l'exposition prénatale à la fumée de cigarette joue un rôle important dans le développement des maladies neurodégénératives et le déclenchement des accidents vasculaires cérébraux à l'âge adulte. Comme les cellules astrogliales contribuent à la défense des neurones environnants en libérant des facteurs neuroprotecteurs et des molécules antioxydantes telles que les endozépinines et les précurseurs du glutathion, il est probable que la protection contre les agressions oxydatives des astrocytes soit essentielle pour prévenir les lésions neuronales et faciliter la récupération neuronale.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

1. Burton GJ, Jauniaux E. What is the placenta? *Am J Obstet Gynecol*. 2015;213: S6.e1–S6.e4. doi:10.1016/j.ajog.2015.07.050
2. Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology with Student Consult Online Access*, 9th Edition. 9th edition. Philadelphia, PA: Saunders; 2011.
3. Alsat E, Evain-Brion D. Le placenta humain : neuf mois d’une intense activité encore méconnue. *Médecine Thérapeutique Pédiatrie*. 1999;1: 509–16.
4. Wooding P, Burton G. *Comparative Placentation* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2008. Available: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-78797-6>
5. Mossman HW. Comparative morphogenesis of the fetal membranes and accessory uterine structures. *Placenta*. 1991;12: 1–5. doi:10.1016/0143-4004(91)90504-9
6. Burton GJ, Jauniaux E, Charnock-Jones DS. The influence of the intrauterine environment on human placental development. *Int J Dev Biol*. 2010;54: 303–312. doi:10.1387/ijdb.082764gb
7. Spencer TE. Biological Roles of Uterine Glands in Pregnancy. *Semin Reprod Med*. 2014;32: 346–357. doi:10.1055/s-0034-1376354
8. Jauniaux E, Cindrova-Davies T, Johns J, Dunster C, Hempstock J, Kelly FJ, et al. Distribution and transfer pathways of antioxidant molecules inside the first trimester human gestational sac. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89: 1452–1458. doi:10.1210/jc.2003-031332
9. Griffiths SK, Campbell JP. Placental structure, function and drug transfer. *Contin Educ Anaesth Crit Care Pain*. 2015;15: 84–89. doi:10.1093/bjaceaccp/mku013
10. Moffett A, Hiby SE, Sharkey AM. The role of the maternal immune system in the regulation of human birthweight. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2015;370: 20140071. doi:10.1098/rstb.2014.0071
11. Burton GJ, Kaufmann P, Huppertz B. Chapter 5 - Anatomy and Genesis of the Placenta. In: Wassarman JDNMPWPRGCM de KSRM, editor. *Knobil and Neill’s Physiology of Reproduction (Third Edition)*. St Louis: Academic Press; 2006. pp. 189–243. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780125154000500105>
12. Malek A. Role of IgG antibodies in association with placental function and immunologic diseases in human pregnancy. *Expert Rev Clin Immunol*. 2013;9: 235–249. doi:10.1586/eci.12.99
13. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2009;27: 669–692. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132557
14. van Furth R, Cohn ZA. THE ORIGIN AND KINETICS OF MONONUCLEAR PHAGOCYTES. *J Exp Med*. 1968;128: 415–435.
15. Gordon S. The macrophage: past, present and future. *Eur J Immunol*. 2007;37 Suppl 1: S9–17. doi:10.1002/eji.200737638
16. Pinhal-Enfield G, Leibovich J, Vas N. The Role of Macrophages in the Placenta. In: Violin Pereira L, editor. *Embryology - Updates and Highlights on Classic Topics*. InTech; 2012. Available: <http://www.intechopen.com/books/embryology-updates-and-highlights-on-classic-topics/the-role-of-macrophages-in-the-placenta>
17. Belhareth R. Macrophage populations and self-renewal: Changing the paradigm. *World J Immunol*. 2015;5: 131. doi:10.5411/wji.v5.i3.131

18. Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2011;11: 762–774. doi:10.1038/nri3070
19. Ka MB, Gondois-Rey F, Capo C, Textoris J, Million M, Raoult D, et al. Imbalance of circulating monocyte subsets and PD-1 dysregulation in Q fever endocarditis: the role of IL-10 in PD-1 modulation. *PloS One.* 2014;9: e107533. doi:10.1371/journal.pone.0107533
20. Ziegler-Heitbrock L. Monocyte subsets in man and other species. *Cell Immunol.* 2014;289: 135–139. doi:10.1016/j.cellimm.2014.03.019
21. Ben Amara A, Gorvel L, Baulan K, Derain-Court J, Buffat C, Vérollet C, et al. Placental macrophages are impaired in chorioamnionitis, an infectious pathology of the placenta. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2013;191: 5501–5514. doi:10.4049/jimmunol.1300988
22. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol.* 2011;11: 723–737. doi:10.1038/nri3073
23. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol.* 2010;11: 889–896. doi:10.1038/ni.1937
24. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdt S, et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity.* 2014;41: 14–20. doi:10.1016/j.immuni.2014.06.008
25. Ka MB, Daumas A, Textoris J, Mege J-L. Phenotypic diversity and emerging new tools to study macrophage activation in bacterial infectious diseases. *Front Immunol.* 2014;5: 500. doi:10.3389/fimmu.2014.00500
26. Xue J, Schmidt SV, Sander J, Draffehn A, Krebs W, Quester I, et al. Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. *Immunity.* 2014;40: 274–288. doi:10.1016/j.immuni.2014.01.006
27. Gautier EL, Shay T, Miller J, Greter M, Jakubzick C, Ivanov S, et al. Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nat Immunol.* 2012;13: 1118–1128. doi:10.1038/ni.2419
28. Becher B, Schlitzer A, Chen J, Mair F, Sumatoh HR, Teng KWW, et al. High-dimensional analysis of the murine myeloid cell system. *Nat Immunol.* 2014;15: 1181–1189. doi:10.1038/ni.3006
29. Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative Activation of Macrophages: An Immunologic Functional Perspective. *Annu Rev Immunol.* 2009;27: 451–483. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132532
30. Classen A, Lloberas J, Celada A. Macrophage activation: classical versus alternative. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2009;531: 29–43. doi:10.1007/978-1-59745-396-7_3
31. Lawrence T, Natoli G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat Rev Immunol.* 2011;11: 750–761. doi:10.1038/nri3088
32. ter Horst EN, Hakimzadeh N, van der Laan AM, Krijnen PAJ, Niessen HWM, Piek JJ. Modulators of Macrophage Polarization Influence Healing of the Infarcted Myocardium. *Int J Mol Sci.* 2015;16: 29583–29591. doi:10.3390/ijms161226187
33. Xu H, Zhu J, Smith S, Foldi J, Zhao B, Chung AY, et al. Notch-RBP-J signaling regulates the transcription factor IRF8 to promote inflammatory macrophage polarization. *Nat Immunol.* 2012;13: 642–650. doi:10.1038/ni.2304
34. Silvio De Flora FD. Modulation of cigarette smoke-related end-points in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res.* 2003;523-524: 237–52. doi:10.1016/S0027-5107(02)00340-8
35. Shields PG. Tobacco Smoking, Harm Reduction, and Biomarkers. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94: 1435–1444. doi:10.1093/jnci/94.19.1435

36. Sobus SL, Warren GW. The biologic effects of cigarette smoke on cancer cells. *Cancer*. 2014;120: 3617–3626. doi:10.1002/cncr.28904
37. Thorne D, Adamson J. A review of in vitro cigarette smoke exposure systems. *Exp Toxicol Pathol*. 2013;65: 1183–1193. doi:10.1016/j.etp.2013.06.001
38. Faux SP, Tai T, Thorne D, Xu Y, Breheny D, Gaca M. The role of oxidative stress in the biological responses of lung epithelial cells to cigarette smoke. *Biomark Biochem Indic Expo Response Susceptibility Chem*. 2009;14 Suppl 1: 90–96. doi:10.1080/13547500902965047
39. Centers for Disease Control and Prevention (US), National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion (US), Office on Smoking and Health (US). How Tobacco Smoke Causes Disease: The Biology and Behavioral Basis for Smoking-Attributable Disease: A Report of the Surgeon General [Internet]. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention (US); 2010. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53017/>
40. Thun MJ, Carter BD, Feskanich D, Freedman ND, Prentice R, Lopez AD, et al. 50-Year Trends in Smoking-Related Mortality in the United States. *N Engl J Med*. 2013;368: 351–364. doi:10.1056/NEJMsa1211127
41. Bickerstaff M, Beckmann M, Gibbons K, Flenady V. Recent cessation of smoking and its effect on pregnancy outcomes. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 2012;52: 54–58. doi:10.1111/j.1479-828X.2011.01387.x
42. Thäle V, Schlitt A. Folgen von Alkohol und Rauchen in der Schwangerschaft. *Internist*. 2011;52: 1185–1190. doi:10.1007/s00108-011-2826-3
43. Mund M, Louwen F, Klingelhofer D, Gerber A. Smoking and Pregnancy — A Review on the First Major Environmental Risk Factor of the Unborn. *Int J Environ Res Public Health*. 2013;10: 6485–6499. doi:10.3390/ijerph10126485
44. Arnould JP, Verhoest P, Bach V, Libert JP, Belegaud J. Detection of benzo[a]pyrene-DNA adducts in human placenta and umbilical cord blood. *Hum Exp Toxicol*. 1997;16: 716–721.
45. Rogers JM. Tobacco and pregnancy. *Reprod Toxicol*. 2009;28: 152–160. doi:10.1016/j.reprotox.2009.03.012
46. Sastry BVR, Chance MB, Hemontolor ME, Goddijn-Wessel TAW. Formation and Retention of Cotinine during Placental Transfer of Nicotine in Human Placental Cotyledon. *Pharmacology*. 1998;57: 104–116. doi:10.1159/000028231
47. Rua E de AO, Porto ML, Ramos JPL, Nogueira BV, dos Santos Meyrelles S, Vasquez EC, et al. Effects of tobacco smoking during pregnancy on oxidative stress in the umbilical cord and mononuclear blood cells of neonates. *J Biomed Sci*. 2014;21. doi:10.1186/s12929-014-0105-z
48. Jauniaux E, Burton GJ. The effect of smoking in pregnancy on early placental morphology. *Obstet Gynecol*. 1992;79: 645–648.
49. Zdravkovic T, Genbacev O, McMaster MT, Fisher SJ. The adverse effects of maternal smoking on the human placenta: a review. *Placenta*. 2005;26 Suppl A: S81–86. doi:10.1016/j.placenta.2005.02.003
50. Dittrich R, Schibel A, Hoffmann I, Mueller A, Beckmann MW, Cupisti S. Influence of maternal smoking during pregnancy on oxidant status in amniotic fluid. *Vivo Athens Greece*. 2012;26: 813–818.
51. Chelchowska M, Ambroszkiewicz J, Gajewska J, Laskowska-Klita T, Leibschang J. The effect of tobacco smoking during pregnancy on plasma oxidant and antioxidant status in mother and newborn. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2011;155: 132–136. doi:10.1016/j.ejogrb.2010.12.006

52. Genbacev O, McMaster MT, Lazic J, Nedeljkovic S, Cvetkovic M, Joslin R, et al. Concordant in situ and in vitro data show that maternal cigarette smoking negatively regulates placental cytotrophoblast passage through the cell cycle. *Reprod Toxicol* Elmsford N. 2000;14: 495–506.
53. Librach CL, Werb Z, Fitzgerald ML, Chiu K, Corwin NM, Esteves RA, et al. 92-kD type IV collagenase mediates invasion of human cytotrophoblasts. *J Cell Biol.* 1991;113: 437–449. doi:10.1083/jcb.113.2.437
54. Jauniaux E, Burton GJ. Morphological and biological effects of maternal exposure to tobacco smoke on the feto-placental unit. *Early Hum Dev.* 2007;83: 699–706. doi:10.1016/j.earlhumdev.2007.07.016
55. Mian MF, Lauzon NM, Stämpfli MR, Mossman KL, Ashkar AA. Impairment of human NK cell cytotoxic activity and cytokine release by cigarette smoke. *J Leukoc Biol.* 2008;83: 774–784. doi:10.1189/jlb.0707481
56. Prins JR, Hylkema MN, Erwich JJHM, Huitema S, Dekkema GJ, Dijkstra FE, et al. Smoking during pregnancy influences the maternal immune response in mice and humans. *Am J Obstet Gynecol.* 2012;207: 76.e1–14. doi:10.1016/j.ajog.2012.04.017
57. Zuo L, He F, Sergakis GG, Koozehchian MS, Stimpfl JN, Rong Y, et al. Interrelated role of cigarette smoking, oxidative stress, and immune response in COPD and corresponding treatments. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2014;307: L205–218. doi:10.1152/ajplung.00330.2013
58. Benowitz NL, Hukkanen J, Jacob P. Nicotine chemistry, metabolism, kinetics and biomarkers. *Handb Exp Pharmacol.* 2009; 29–60. doi:10.1007/978-3-540-69248-5_2
59. Gori GB, Benowitz NL, Lynch CJ. Mouth versus deep airways absorption of nicotine in cigarette smokers. *Pharmacol Biochem Behav.* 1986;25: 1181–1184.
60. Benowitz NL, Jacob P, Jones RT, Rosenberg J. Interindividual variability in the metabolism and cardiovascular effects of nicotine in man. *J Pharmacol Exp Ther.* 1982;221: 368–372.
61. Breese CR, Marks MJ, Logel J, Adams CE, Sullivan B, Collins AC, et al. Effect of smoking history on [3H]nicotine binding in human postmortem brain. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997;282: 7–13.
62. Perry DC, Dávila-García MI, Stockmeier CA, Kellar KJ. Increased nicotinic receptors in brains from smokers: membrane binding and autoradiography studies. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999;289: 1545–1552.
63. Dahlström A, Lundell B, Curvall M, Thapper L. Nicotine and cotinine concentrations in the nursing mother and her infant. *Acta Paediatr Scand.* 1990;79: 142–147.
64. Dempsey DA, Benowitz NL. Risks and benefits of nicotine to aid smoking cessation in pregnancy. *Drug Saf.* 2001;24: 277–322.
65. Rose JE, Behm FM, Westman EC, Coleman RE. Arterial nicotine kinetics during cigarette smoking and intravenous nicotine administration: implications for addiction. *Drug Alcohol Depend.* 1999;56: 99–107.
66. Hukkanen J, Jacob P, Benowitz NL. Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacol Rev.* 2005;57: 79–115. doi:10.1124/pr.57.1.3
67. Benowitz NL, Jacob P, Fong I, Gupta S. Nicotine metabolic profile in man: comparison of cigarette smoking and transdermal nicotine. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994;268: 296–303.
68. Karlin A. Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nat Rev Neurosci.* 2002;3: 102–114. doi:10.1038/nrn731
69. Arias HR, Bhumireddy P, Bouzat C. Molecular mechanisms and binding site locations for noncompetitive antagonists of nicotinic acetylcholine receptors. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006;38: 1254–1276. doi:10.1016/j.biocel.2006.01.006

70. Gotti C, Clementi F. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog Neurobiol.* 2004;74: 363–396. doi:10.1016/j.pneurobio.2004.09.006
71. Biological and Biophysical Aspects of Ligand-gated Ion Channel Receptor Superfamilies, 2006. Research Signpost; 2006.
72. Arias HR, Richards VE, Ng D, Ghafoori ME, Le V, Mousa SA. Role of non-neuronal nicotinic acetylcholine receptors in angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41: 1441–1451. doi:10.1016/j.biocel.2009.01.013
73. Karlin A. ION CHANNEL STRUCTURE EMERGING STRUCTURE OF THE NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTORS. *Nat Rev Neurosci.* 2002;3: 102–114. doi:10.1038/nrn731
74. Tiesler CMT, Heinrich J. Prenatal nicotine exposure and child behavioural problems. *Eur Child Adolesc Psychiatry.* 2014;23: 913–929. doi:10.1007/s00787-014-0615-y
75. Ain R, Canham LN, Soares MJ. Gestation stage-dependent intrauterine trophoblast cell invasion in the rat and mouse: novel endocrine phenotype and regulation. *Dev Biol.* 2003;260: 176–190.
76. Vercruyse L, Caluwaerts S, Luyten C, Pijnenborg R. Interstitial trophoblast invasion in the decidua and mesometrial triangle during the last third of pregnancy in the rat. *Placenta.* 2006;27: 22–33. doi:10.1016/j.placenta.2004.11.004
77. Holloway AC, Salomon A, Soares MJ, Garnier V, Raha S, Sergent F, et al. Characterization of the adverse effects of nicotine on placental development: in vivo and in vitro studies. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2014;306: E443–456. doi:10.1152/ajpendo.00478.2013
78. Babcock GT. How oxygen is activated and reduced in respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96: 12971–12973.
79. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 2006;141: 312–322. doi:10.1104/pp.106.077073
80. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 2006;160: 1–40. doi:10.1016/j.cbi.2005.12.009
81. Ré DB, Nafia I, Nieoullon A, Le Goff LK, Had-Aissouni L. Stress oxydatif cérébral : les astrocytes sont-ils vulnérables aux faibles concentrations intracellulaires de glutamate ? Implications sur la survie neuronale. *Ann Fr Anesth Réanimation.* 2005;24: 502–509. doi:10.1016/j.annfar.2005.03.004
82. Novo E, Parola M. Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2008;1: 5. doi:10.1186/1755-1536-1-5
83. Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med.* 2000;29: 222–230.
84. Lipinski B, Lipinski B. Hydroxyl Radical and Its Scavengers in Health and Disease, Hydroxyl Radical and Its Scavengers in Health and Disease. *Oxidative Med Cell Longev Oxidative Med Cell Longev.* 2011;2011, 2011: e809696. doi:10.1155/2011/809696, 10.1155/2011/809696
85. Sheu S-S, Nauduri D, Anders MW. Targeting antioxidants to mitochondria: a new therapeutic direction. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1762: 256–265. doi:10.1016/j.bbadis.2005.10.007
86. Halliwell B. Antioxidants: the basics--what they are and how to evaluate them. *Adv Pharmacol San Diego Calif.* 1997;38: 3–20.
87. Matés JM, Pérez-Gómez C, Núñez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem.* 1999;32: 595–603.
88. Landis GN, Tower J. Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mech Ageing Dev.* 2005;126: 365–379. doi:10.1016/j.mad.2004.08.012

89. Virchow R. Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre. 1. Auflage. Berlin: Hirschwald; 1858.
90. Wiley: Glial Neurobiology - Alexei Verkhratsky, Arthur Morgan Butt [Internet]. [cited 21 Jan 2016]. Available: <http://eu.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/productCd-0470015640.html>
91. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2010;119: 7–35. doi:10.1007/s00401-009-0619-8
92. Christian Giaume AK. Giaume C, Koulakoff A, Roux L, Holcman D, Rouach N. Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions. *Nat Rev Neurosci* 11:87-99. *Nat Rev Neurosci*. 2010;11: 87–99. doi:10.1038/nrn2757
93. Scemes E, Spray DC. Extracellular K⁺ and Astrocyte Signaling via Connexin and Pannexin Channels. *Neurochem Res*. 2012;37: 2310–2316. doi:10.1007/s11064-012-0759-4
94. Harris AL. Connexin channel permeability to cytoplasmic molecules. *Prog Biophys Mol Biol*. 2007;94: 120–143. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2007.03.011
95. Bushong EA, Martone ME, Jones YZ, Ellisman MH. Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2002;22: 183–192.
96. Ventura R, Harris KM. Three-Dimensional Relationships between Hippocampal Synapses and Astrocytes. *J Neurosci*. 1999;19: 6897–6906.
97. Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci*. 1999;22: 208–215. doi:10.1016/S0166-2236(98)01349-6
98. Halassa MM, Fellin T, Takano H, Dong J-H, Haydon PG. Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2007;27: 6473–6477. doi:10.1523/JNEUROSCI.1419-07.2007
99. Barat E. Etude des interactions entre neurones et astrocytes au sein de la substance noire réticulée [Internet]. Université de Grenoble. 2012. Available: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00906952/document>
100. Tsacopoulos M, Magistretti PJ. Metabolic coupling between glia and neurons. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 1996;16: 877–885.
101. Pellerin L. Food for thought: the importance of glucose and other energy substrates for sustaining brain function under varying levels of activity. *Diabetes Metab*. 2010;36 Suppl 3: S59–63. doi:10.1016/S1262-3636(10)70469-9
102. Simard M, Nedergaard M. The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience*. 2004;129: 877–896. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.09.053
103. Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM, Cooper MS, Smith SJ. Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science*. 1990;247: 470–473.
104. Rua E de AO, Porto ML, Ramos JPL, Nogueira BV, dos Santos Meyrelles S, Vasquez EC, et al. Effects of tobacco smoking during pregnancy on oxidative stress in the umbilical cord and mononuclear blood cells of neonates. *J Biomed Sci*. 2014;21. doi:10.1186/s12929-014-0105-z
105. Zhang K, Wang X. Maternal smoking and increased risk of sudden infant death syndrome: A meta-analysis. *Leg Med*. 2013;15: 115–121. doi:10.1016/j.legalmed.2012.10.007
106. Cnattingius S. The epidemiology of smoking during pregnancy: Smoking prevalence, maternal characteristics, and pregnancy outcomes. *Nicotine Tob Res*. 2004;6: S125–S140. doi:10.1080/14622200410001669187

107. Ni I, Ji C, Vij N. Second-Hand Cigarette Smoke Impairs Bacterial Phagocytosis in Macrophages by Modulating CFTR Dependent Lipid-Rafts. *PLoS ONE*. 2015;10: e0121200. doi:10.1371/journal.pone.0121200
108. Kong Q, Lin C-LG. Oxidative damage to RNA: mechanisms, consequences, and diseases. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2010;67: 1817–1829. doi:10.1007/s00018-010-0277-y
109. Mazzone P, Tierney W, Hossain M, Puvenna V, Janigro D, Cucullo L. Pathophysiological impact of cigarette smoke exposure on the cerebrovascular system with a focus on the blood-brain barrier: expanding the awareness of smoking toxicity in an underappreciated area. *Int J Environ Res Public Health*. 2010;7: 4111–4126. doi:10.3390/ijerph7124111
110. Bierut LJ, Stitzel JA, Wang JC, Hinrichs AL, Grucza RA, Xuei X, et al. Variants in Nicotinic Receptors and Risk for Nicotine Dependence. *Am J Psychiatry*. 2008;165: 1163–1171. doi:10.1176/appi.ajp.2008.07111711
111. Arnson Y, Shoenfeld Y, Amital H. Effects of tobacco smoke on immunity, inflammation and autoimmunity. *J Autoimmun*. 2010;34: J258–J265. doi:10.1016/j.jaut.2009.12.003
112. Tobin F, Vuillaume G, Talikka M, Diserens G, Diserens G, Peitsch MC, et al. Pre-malignant processes of smoking-induced lung adenocarcinoma development: A conceptual biological model. *Adv Lung Cancer*. 2013;02: 32–53. doi:10.4236/alc.2013.22006
113. Xia J, Zhao J, Shang J, Li M, Zeng Z, Zhao J, et al. Increased IL-33 expression in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2015; ajplung.00305.2014. doi:10.1152/ajplung.00305.2014
114. Stämpfli MR, Anderson GP. How cigarette smoke skews immune responses to promote infection, lung disease and cancer. *Nat Rev Immunol*. 2009;9: 377–384. doi:10.1038/nri2530
115. Vacek TP, Rehman S, Neamtu D, Yu S, Givimani S, Tyagi SC. Matrix metalloproteinases in atherosclerosis: role of nitric oxide, hydrogen sulfide, homocysteine, and polymorphisms. *Vasc Health Risk Manag*. 2015;11: 173–183. doi:10.2147/VHRM.S68415
116. Zhang S, Regnault TRH, Barker PL, Botting KJ, McMillen IC, McMillan CM, et al. Placental adaptations in growth restriction. *Nutrients*. 2015;7: 360–389. doi:10.3390/nu7010360
117. García K, García V, Laspiur JP, Duan F, Meléndez LM. Characterization of the Placental Macrophage Secretome: Implications for Antiviral Activity. *Placenta*. 2009;30: 149–155. doi:10.1016/j.placenta.2008.10.014
118. Bulmer JN, Johnson PM. Macrophage populations in the human placenta and amniochorion. *Clin Exp Immunol*. 1984;57: 393–403.
119. Daley JM, Brancato SK, Thomay AA, Reichner JS, Albina JE. The phenotype of murine wound macrophages. *J Leukoc Biol*. 2010;87: 59–67.
120. Kawashima A, Koide K, Ventura W, Hori K, Takenaka S, Maruyama D, et al. Effects of Maternal Smoking on the Placental Expression of Genes Related to Angiogenesis and Apoptosis during the First Trimester. *PLoS ONE*. 2014;9: e106140. doi:10.1371/journal.pone.0106140
121. Genbacev O, McMaster MT, Lazic J, Nedeljkovic S, Cvetkovic M, Joslin R, et al. Concordant in situ and in vitro data show that maternal cigarette smoking negatively regulates placental cytotrophoblast passage through the cell cycle. *Reprod Toxicol Elmsford N*. 2000;14: 495–506.

122. Eric Jauniaux GJB. Jauniaux E, Burton GJ. Morphological and biological effects of maternal exposure to tobacco smoke on the feto-placental unit. *Early Hum Dev* 83: 699-706. *Early Hum Dev.* 2007;83: 699–706. doi:10.1016/j.earlhumdev.2007.07.016
123. Machaalani R, Say M, Waters KA. Effects of cigarette smoke exposure on nicotinic acetylcholine receptor subunits $\alpha 7$ and $\beta 2$ in the sudden infant death syndrome (SIDS) brainstem. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2011;257: 396–404. doi:10.1016/j.taap.2011.09.023
124. Su Y, Han W, Giraldo C, De Li Y, Block ER. Effect of cigarette smoke extract on nitric oxide synthase in pulmonary artery endothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1998;19: 819–825. doi:10.1165/ajrcmb.19.5.3091
125. Ben Amara A, Ghigo E, Le Priol Y, Lépolard C, Salcedo SP, Lemichez E, et al. Coxiella burnetii, the Agent of Q Fever, Replicates within Trophoblasts and Induces a Unique Transcriptional Response. *PLoS ONE.* 2010;5: e15315. doi:10.1371/journal.pone.0015315
126. Thuny F, Textoris J, Ben Amara A, El Filali A, Capo C, Habib G, et al. The Gene Expression Analysis of Blood Reveals S100A11 and AQP9 as Potential Biomarkers of Infective Endocarditis. *PLoS ONE.* 2012;7: e31490. doi:10.1371/journal.pone.0031490
127. Mehraj V, Textoris J, Ben Amara A, Ghigo E, Raoult D, Capo C, et al. Monocyte responses in the context of Q fever: from a static polarized model to a kinetic model of activation. *J Infect Dis.* 2013;208: 942–951. doi:10.1093/infdis/jit266
128. Thuny F, Habib G, Le Dolley Y, Canault M, Casalta J-P, Verdier M, et al. Circulating Matrix Metalloproteinases in Infective Endocarditis: A Possible Marker of the Embolic Risk. *PLoS ONE.* 2011;6. doi:10.1371/journal.pone.0018830
129. Benoit M, Thuny F, Le Priol Y, Lepidi H, Bastonero S, Casalta J-P, et al. The transcriptional programme of human heart valves reveals the natural history of infective endocarditis. *PloS One.* 2010;5: e8939. doi:10.1371/journal.pone.0008939
130. Delaby A, Gorvel L, Espinosa L, Lépolard C, Raoult D, Ghigo E, et al. Defective monocyte dynamics in Q fever granuloma deficiency. *J Infect Dis.* 2012;205: 1086–1094. doi:10.1093/infdis/jis013
131. MacLauchlan S, Skokos EA, Meznarich N, Zhu DH, Raoof S, Shipley JM, et al. Macrophage fusion, giant cell formation, and the foreign body response require matrix metalloproteinase 9. *J Leukoc Biol.* 2009;85: 617–626. doi:10.1189/jlb.1008588
132. Barbour SE, Nakashima K, Zhang J-B, Tangada S, Hahn C-L, Schenkein HA, et al. Tobacco and Smoking: Environmental Factors That Modify the Host Response (Immune System) and Have an Impact On Periodontal Health. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1997;8: 437–460. doi:10.1177/10454411970080040501
133. Le Cabec V, Cols C, Maridonneau-Parini I. Nonopsonic Phagocytosis of Zymosan and Mycobacterium kansasii by CR3 (CD11b/CD18) Involves Distinct Molecular Determinants and Is or Is Not Coupled with NADPH Oxidase Activation. *Infect Immun.* 2000;68: 4736–4745.
134. Karavitis J, Kovacs EJ. Macrophage phagocytosis: effects of environmental pollutants, alcohol, cigarette smoke, and other external factors. *J Leukoc Biol.* 2011;90: 1065–1078. doi:10.1189/jlb.0311114
135. Renaud SJ, Graham CH. The Role of Macrophages in Utero-placental Interactions During Normal and Pathological Pregnancy. *Immunol Invest.* 2008;37: 535–564. doi:10.1080/08820130802191375
136. Kearley J, Silver JS, Sanden C, Liu Z, Berlin AA, White N, et al. Cigarette smoke silences innate lymphoid cell function and facilitates an exacerbated type I interleukin-33-dependent response to infection. *Immunity.* 2015;42: 566–579. doi:10.1016/j.immuni.2015.02.011

137. Gustafsson C, Mjösberg J, Matussek A, Geffers R, Matthiesen L, Berg G, et al. Gene Expression Profiling of Human Decidual Macrophages: Evidence for Immunosuppressive Phenotype. *PLoS ONE*. 2008;3: e2078. doi:10.1371/journal.pone.0002078
138. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest*. 2012;122: 787–795. doi:10.1172/JCI59643
139. McNally AK, Anderson JM. Multinucleated giant cell formation exhibits features of phagocytosis with participation of the endoplasmic reticulum. *Exp Mol Pathol*. 2005;79: 126–135. doi:10.1016/j.yexmp.2005.06.008
140. Goldklang MP, Marks SM, D’Armiento JM. Second hand smoke and COPD: lessons from animal studies. *Front Physiol*. 2013;4: 30. doi:10.3389/fphys.2013.00030
141. McGarry Houghton A. Matrix metalloproteinases in destructive lung disease. *Matrix Biol*. 2015;44–46: 167–174. doi:10.1016/j.matbio.2015.02.002
142. Russell REK, Thorley A, Culpitt SV, Dodd S, Donnelly LE, Demattos C, et al. Alveolar macrophage-mediated elastolysis: roles of matrix metalloproteinases, cysteine, and serine proteases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002;283: L867–873. doi:10.1152/ajplung.00020.2002
143. Hautamaki RD, Kobayashi DK, Senior RM, Shapiro SD. Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science*. 1997;277: 2002–2004.
144. Churg A, Dai J, Tai H, Xie C, Wright JL. Tumor necrosis factor-alpha is central to acute cigarette smoke-induced inflammation and connective tissue breakdown. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166: 849–854. doi:10.1164/rccm.200202-097OC
145. Eurlings IMJ, Dentener MA, Mercken EM, de Cabo R, Bracke KR, Vernooij JHJ, et al. A comparative study of matrix remodeling in chronic models for COPD; mechanistic insights into the role of TNF- α . *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2014;307: L557–L565. doi:10.1152/ajplung.00116.2014
146. Eurlings IM, Dentener MA, Cleutjens JP, Peutz CJ, Rohde GG, Wouters EF, et al. Similar matrix alterations in alveolar and small airway walls of COPD patients. *BMC Pulm Med*. 2014;14: 90. doi:10.1186/1471-2466-14-90
147. Carty CS, Soloway PD, Kayastha S, Bauer J, Marsan B, Ricotta JJ, et al. Nicotine and cotinine stimulate secretion of basic fibroblast growth factor and affect expression of matrix metalloproteinases in cultured human smooth muscle cells. *J Vasc Surg*. 1996;24: 927–934; discussion 934–935.
148. Zhang S, Day I, Ye S. Nicotine induced changes in gene expression by human coronary artery endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2001;154: 277–283.
149. Thompson LP, Liu H, Evans L, Mong JA. Prenatal Nicotine Increases Matrix Metalloproteinase 2 (MMP-2) Expression in Fetal Guinea Pig Hearts. *Reprod Sci*. 2011;18: 1103–1110. doi:10.1177/1933719111404605
150. Lau PP, Li L, Merched AJ, Zhang AL, Ko KWS, Chan L. Nicotine Induces Proinflammatory Responses in Macrophages and the Aorta Leading to Acceleration of Atherosclerosis in Low-Density Lipoprotein Receptor–/– Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26: 143–149. doi:10.1161/01.ATV.0000193510.19000.10

ANNEXE

Macrophage populations and self-renewal: Changing the paradigm

Rym Belhareth, Jean-Louis Mège

Rym Belhareth, Jean-Louis Mège, URMITE, Faculté de Médecine, 13005 Marseille, France

Rym Belhareth, Laboratoire de Neurophysiologie Fonctionnelle et Pathologies UR/11ES09, FST Campus Universitaire, 2092 El Manar Tunis, Tunisie

Author contributions: Belhareth R and Mège JL contributed to this paper.

Conflict-of-interest statement: Authors declare no conflict of interests for this paper.

Open-Access: This article is an open-access article which was selected by an in-house editor and fully peer-reviewed by external reviewers. It is distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

Correspondence to: Jean-Louis Mège, MD, PhD, URMITE, Faculté de Médecine, 27 Bld. Jean Moulin, 13005 Marseille, France. jean-louis.mège@univ-amu.fr
 Telephone: +33-491-324970
 Fax: +33-491-324306

Received: July 9, 2015
 Peer-review started: July 14, 2015
 First decision: July 31, 2015
 Revised: October 10, 2015
 Accepted: October 23, 2015
 Article in press: October 27, 2015
 Published online: November 27, 2015

Abstract

The origin of macrophages has been considered since several decades to be a continuum from bone marrow (BM) to tissue *via* monocytes as precursors. The development of new tools such as genetic lineage tracing,

parabiosis and BM chimeras changed the paradigm of macrophage origin. In steady state, most resident macrophages are of embryonic origin, whereas a monocyte origin remains prominent in pathological conditions. The findings of a proliferation of mature macrophages will oblige us to reappraise the relationship between proliferation and differentiation in macrophages. This review is based on the recent explosion of high impact articles on macrophage biology. It summarizes new data on the origin of macrophages and their self-renewal potential in steady states. While monocytes are required for intestinal macrophage development, the microglia is independent of monocyte influx and skin macrophages provide an excellent model of the balance between monocyte input and self-renewal. In addition, macrophage proliferation requires intrinsic and extrinsic factors including growth factors and cytokines. It also analyzes the impact of this new paradigm in human diseases such as atherosclerosis, cancer, infectious diseases and neurodegenerative diseases. In atherosclerosis, the finding of macrophage proliferation within the lesions will change our understanding of disease pathophysiology, this new paradigm may have therapeutic impact in the future.

Key words: Macrophages; Self-renewal; Proliferation; Homeostasis; Diseases

© The Author(s) 2015. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Core tip: The emergence of revolutionary technologies in myeloid cell research has deeply changed the paradigm of macrophage activation. It was believed that macrophage derive from myeloid precursors *via* circulating monocytes. Now, we can propose that resident macrophages are of embryonic origin in steady state whereas monocytes are recruited in pathological conditions. The second strong idea was that mature macrophages are unable to proliferate; we have strong evidence that macrophages can proliferate, which is

the basis of self-renewal. The consequences of these new concepts will lead us to reappraise the role of macrophages in pathologies.

Belhareth R, Mège JL. Macrophage populations and self-renewal: Changing the paradigm. *World J Immunol* 2015; 5(3): 131-141 Available from: URL: <http://www.wjgnet.com/2219-2824/full/v5/i3/131.htm> DOI: <http://dx.doi.org/10.5411/wji.v5.i3.131>

INTRODUCTION

Historical point of view

The initial model of macrophage differentiation was proposed by Ralph Van Furth and Zanvil Cohn^[1] in 1968. Tissue macrophages arise from bone marrow (BM) progenitors *via* blood monocytes as intermediates^[2]. However, this popular model is probably insufficient to describe how macrophage populations grow and mature.

The introduction of new methods including genetic lineage tracing, parabiosis and BM chimeras as well as BM transplantations in animals and myelo-ablative irradiation or chemotherapy in patients enable a reappraisal of macrophage origin dynamics^[3]. We will review the diversity of macrophage populations, the contribution of the self-renewal process to macrophage dynamics and the consequences on our understanding of human pathologies.

Macrophage populations

The mononuclear phagocyte system consists of monocytes, macrophages and dendritic cells (DCs), which exhibit different morphologies, phenotypic characteristics and functions. For several years, it was believed that monocytes were released from BM into the circulation and that they were the precursors of macrophages and DCs^[4].

In the past 20 years, use of specific membrane markers has allowed the discrimination of different subpopulations among mononuclear phagocytes. Hence, murine inflammatory monocytes are characterized by the high expression of LY6C, CCR2 and low level of CX₃CR1. In contrast, patrolling monocytes are characterized by the low expression of LY6C and CCR2 and high density of CX₃CR1. A similar heterogeneity has been found in humans; the most prevalent population of so-called classical monocytes expresses high levels of CD14 and is equivalent to LY6C^{hi} in mice.

The level of CD14 and CD16 membrane expression enables the identification of two minor subsets of monocytes, CD14^{hi}CD16^{lo} (also called intermediate monocytes) and CD14^{lo}CD16^{hi} (called non-classical monocytes) respectively, which are the equivalent of LY6C^{lo} monocytes in mice^[5]. It has been recently found that the relative proportion of human monocyte subsets is modulated during inflammatory and infectious diseases^[6,7], although the role of these different

monocyte subsets in these pathologies remains to be elucidated. The situation is even more complex for tissue macrophages. Indeed, macrophages are classified according to the type of tissue: Osteoclasts in bone, alveolar macrophages in lungs, Kupffer cells in liver, intestinal macrophages in the gut, microglia in the nervous system), placenta macrophages and macrophages in secondary lymphoid organs^[8,9]. These macrophages exhibit a diversity of functions from host defense to metabolism and tissue remodeling.

Besides these resident macrophages, macrophages can be locally recruited in response to injuries and their phenotypic and functional characteristics will depend on the type of injury. Using some phenotypic features enables the distinction of recruited macrophages from resident cells. The former exhibit a low expression of F4/80, CD64, MerTK, CD14, are mobile and short-living cells; in contrast, the latter highly express F4/80, CD64, MerTK, CD14, are long-living but can be of yolk sac (YS) or hematopoietic stem cell (HSC) origin (see below). The responses of macrophages to different stimuli have led to the concept of macrophage polarization, which allows a classification of functional macrophage subsets. A reductionist model of activation has resulted in a definition of M1 macrophages that reflects the Th1 immune response and M2 macrophages that reflects the Th2 immune response^[10]. The lack of specific markers of M1 and M2 macrophages, respectively, has made the identification of these functional subsets in *in vivo* conditions difficult^[11]. However, the use of high throughput methods such as microarray permitted the identification of transcriptional signatures that would require functional validation^[12]. Studies of networks based on gene expression profiling have generated a resource data set to assess transcriptional regulation during macrophage activation by comparing diverse sets of agonists on a single microarray platform. Network modeling extends the current M1 vs M2 polarization model to a spectrum model with at least nine distinct macrophage activation programs^[13]. In addition, the InnGen project has enabled the sorting of tissue macrophages from C56BL/6 mice and the analysis of their gene expression program with whole genome microarray. This approach has revealed a considerable diversity among macrophage populations, which is higher than the distance between macrophages and DCs. This diversity is illustrated by the expression of unique transcripts according to each macrophage location. As an example, this bioinformatics approach has revealed that Langerhans cells are close to BM-derived macrophages but surprisingly failed to cluster with macrophages^[14]. The introduction of mass cytometry allowed a more precise analysis of murine myeloid cells. Indeed, alveolar macrophages, microglia and red-pulp macrophages are populations distinct from the other macrophages^[15]. It is likely that new data will profoundly change our understanding of the relationship between the diversity of macrophage populations and their origin.

Table 1 Approaches to dissect the origins of macrophage lineages

Methods and tools	Results
Membrane markers	CX3CR1 ^{hi} /F4/80 ^{hi} /CD11b ^{lo} : YS macrophages CX3CR1 ^{lo} /F4/80 ^{lo} /CD11b ^{hi} : HSC macrophages
Transcription factors	MYB ⁺ : HSC macrophages MYB ⁻ : YS macrophages
Depletion (clodronate, Abs)	Non-specific depletion with clodronate. The CCR2 ^{-/-} mice that are depleted from circulating monocytes exhibit normal tissue macrophage populations
Genetic fate mapping techniques: RUNX1	Early expression of RUNX1 in YS derived macrophages and identification of embryonic macrophages in adulthood (microglia, Langerhans cells)
Genetic fate mapping techniques: FLT3	Identification of a HSC stage in differentiation: + for monocytes and - for tissue macrophages
Genetic fate mapping techniques: CSF1R	Labeling of 30% YS derived macrophages in the embryo and similar persistence in adult microglia
Genetic fate mapping techniques: CX3CR1	Labeling of monocytes and microglia
Parabiosis	Replacement of resident macrophages by chimeric monocytes
Sublethal irradiation and bone marrow transplant	Chimerism in blood monocytes without eradicating resident macrophages. Risk of inflammation and membrane leakage

YS: Yolk sac; HSC: Hematopoietic stem cell. This Table describes the methods to identify the origin of mononuclear phagocytes and the major results. It refers to recent reviews^[16-18].

NEW TOOLS TO DETERMINE THE ORIGIN OF MACROPHAGES: MONOCYTES VS MACROPHAGES

New tools have emerged these latter years to investigate the origin, the homeostasis and the functions of mononuclear phagocytes^[16,17]. We will illustrate these methodological advances with a few examples. The study of mouse embryogenesis enables a chronological dissection of macrophage origin. First, the macrophages appear in YS in which primitive hematopoiesis occurs. Then, fetal liver and BM are populated by HSCs, which represent another source of tissue macrophages^[18]. This dynamic and the dual origin of tissue macrophages (YS vs HSC) have been reported in a growing number of important papers^[18,19]. These results question the role of monocytes in tissue colonization in both homeostasis and situations of danger. Clinical features highlight the new paradigm. Many tissue macrophage populations are not affected in patients with monocytopenia due to leukemia^[20] or immune deficiencies^[21].

The use of the radioelement ⁸⁹Sr which targets monopoiesis does not reduce tissue macrophage content in the lung and liver of mice^[19]. Similarly, the depletion of circulating monocytes in CCR2^{-/-} mice has a limited impact on tissue macrophage populations^[19]. Using genetic fate mapping techniques based on a recombination-induced expression of reporter genes under the control of a constitutive promoter (RUNX1, CSF1R, FLT3) enables identification and tracking of different embryonic macrophage populations into adulthood (Table 1)^[18]. Nevertheless, the specificity and the efficiency of these approaches, such as the labeling of YS-derived macrophages with RUNX1^{CreER} or with Csf1r^{CreER}, are questionable. Although FLT3-Cre labels specifically blood monocytes, FLT3-Cre negative tissue macrophages are also observed in HSC-derived macrophages^[18]. These molecular tools have provided important data and a model was recently proposed in

mice: Primitive macrophages would arise from erythromyeloid progenitors present in YS. These macrophages are the first wave of colonization of the brain and other fetal organs. A second wave would be characterized by the development of fetal monocytes in fetal liver; these latter cells would be the source of resident macrophages with the exception of the brain^[22,23]. These major findings remain limited to murine models and their transposition to humans is an important scientific challenge.

MACROHAGE PROLIFERATION

If tissue macrophage renewal does not result from monocyte influx, their proliferation is necessary. The proliferation of transformed lines of macrophages is well established, but their use is limited by the loss of macrophage functions and their poor differentiation compared with mature macrophages. Michael Sieweke's group recently reviewed the self-renewal mechanisms of mature macrophages and identified extrinsic and intrinsic factors^[3] (Figure 1). Among the extrinsic factors, the macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) occupies a privileged position. The number of tissue macrophages is reduced in animals bearing mutations in M-CSF such as op/op mice and tl/tl rats and in mice deficient for M-CSF receptors (M-CSFR); the efficiency of macrophage depletion is higher in mice deficient for M-CSFR^[24]. M-CSFR binds with not only M-CSF but also interleukin (IL)-34. Produced by neurons and keratinocytes, IL-34 is a good candidate for controlling the homeostasis of microglia and Langerhans cells^[25] but seems more critical in the homeostasis of Langerhans cells than of microglia^[26]. It is likely that the imbalance between M-CSF and IL-34 accounts for the differences in the macrophage replenishment of the skin and nervous system.

Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) is another important cytokine involved in the turnover of tissue macrophages. This has been clearly demonstrated with macrophages derived from

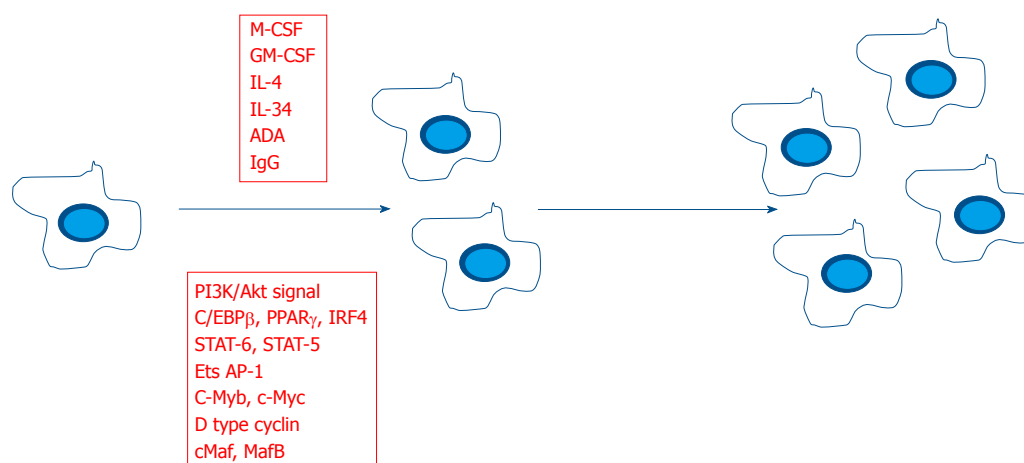


Figure 1 Extrinsic and intrinsic factors involved in macrophage proliferation. M-CSF: Macrophage colony-stimulating factor; GM-CSF: Granulocyte macrophage colony-stimulating factor; IL: Interleukin; PPAR γ : Peroxisome proliferator-activated receptor γ .

fetal liver macrophages with self-renewing potential. These cells are obtained by the culture of fetal liver and grow exponentially in the presence of GM-CSF before differentiation. The removal of GM-CSF blocks their proliferation^[27]. *In vivo*, the peritoneal administration of GM-CSF also induces the proliferation of peritoneal macrophages^[3]. In addition, it is likely that GM-CSF is involved in the control of the alveolar macrophage population^[28].

IL-4 shares with M-CSF the ability to polarize macrophages towards a M2 phenotype and is associated with the self-renewal of macrophages. IL-4 is probably sufficient to induce the proliferative expansion of macrophages in serous cavities, the liver, spleen and lungs^[29]. The administration of IL-4 in mice causes macrophage proliferation and their accumulation in the liver, spleen and BM^[30,31]. In contrast, IL-4 is unable to induce the proliferation of macrophages *in vitro*, suggesting that IL-4 acts in concert with other cytokines. Finally, among the extrinsic factors involved in the self-renewal of mature macrophages, one can evoke adenosine deaminases, known for their role in the regulation of adenosine levels which are associated with monocyte-to-macrophage differentiation and macrophage proliferation^[32].

The intrinsic factors playing a role in the self-renewal of macrophages include the signaling pathways of IL-4, IL-34, M-CSF and GM-CSF. In addition, transcription factors such as c-Myb and c-Myc, known for their role in cell proliferation, play a role in monocyte differentiation. Although their ectopic expression in mature macrophages re-initiates the cell cycle^[3], they are not involved in the proliferation of mature macrophages^[33]. The transcriptional factor Gata6 is specifically expressed by self-renewing peritoneal macrophages but not by monocytes recently recruited into the peritoneum after challenge. Gata6 deficiency impairs peritoneal macrophage renewal during steady state and in response to inflammatory challenge compromising the resolution of inflammation. Gata6 targets genes involved in cell proliferation since their expression is altered in

macrophages from Gata6-deficient mice^[34]. Other transcription factors regulate macrophage proliferation *via* their cooperation. The cooperation of cMyc and Klf4 and MafB and cMaf seems necessary for macrophage self-renewal as described for stem cells^[3]. Hence it has been reported that macrophages isolated from MafB- and cMaf-double deficient mice divide indefinitely; the self-renewal depends on cMyc and Klf4^[19]. Taken together, these results suggest that other tissue-specific mechanisms may be identified in the future to account for the expansion of mature macrophages.

HOMEOSTASIS

Different strategies based on the proliferation of YS- or HSC-derived cells or monocyte influx are used by macrophages to maintain their population in peripheral tissues (Figure 2). It has been clearly shown that monocytes are involved in the control of homeostasis^[35,36]. Experiments using Cre-loxP-based fate mapping methods or parabiotic mice with mice lacking or not CCR2 have shown that circulating monocytes have a minimal contribution to the maintenance of tissue macrophages in the absence of injury^[37,38]. Nevertheless, the sites in contact with microorganisms such as the intestine, skin and spleen are specialized areas in which monocyte input is necessary to maintain macrophage population. Exposure to commensal microorganisms is likely to cause a low grade inflammation also called "primed homeostasis", which is reminiscent of the recruitment of classical monocytes in fully inflammatory conditions^[39]. This seducing hypothesis accounts in part for the homeostatic maintenance of macrophage populations such as intestinal macrophages. In mice, the colons of newborns contain macrophages of embryonic origin (F4/80^{hi}CD11b^{lo}) and hematopoietic origin (F4/80^{lo}CD11b^{hi}); the embryonic population of macrophages is prominent after birth and dramatically decreases thereafter^[40]. Although macrophages in adult mice retain the ability to divide locally, this ability is not sufficient to account for maintaining macrophage populations in the intestine.

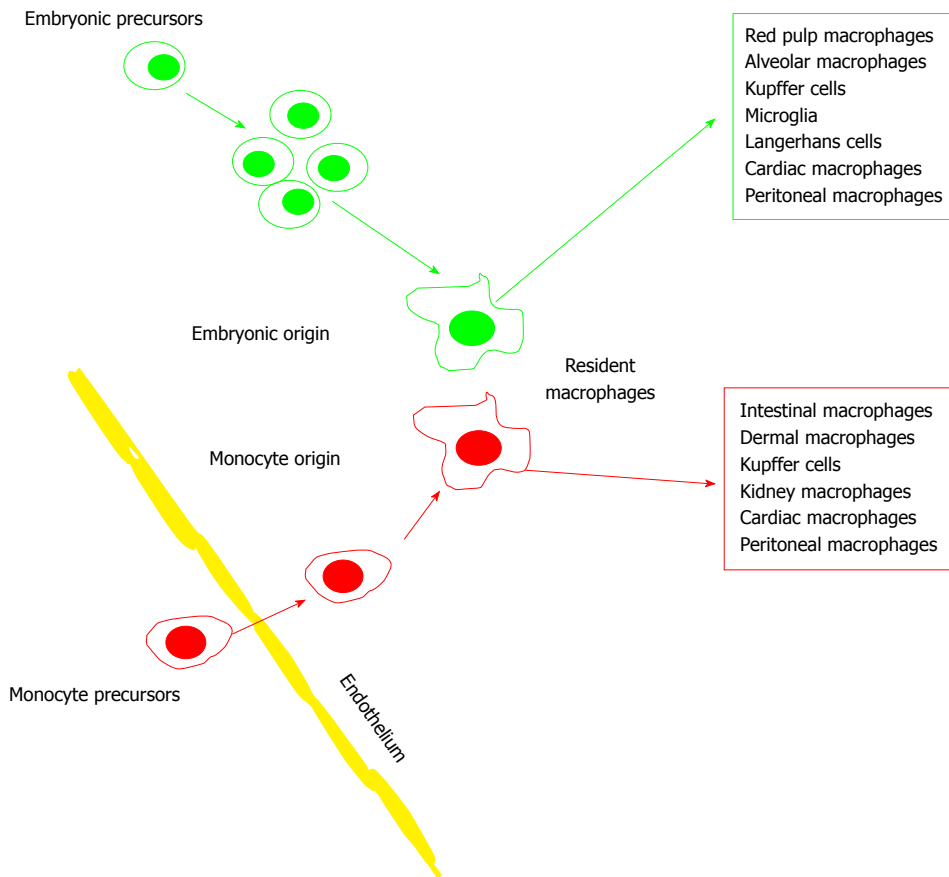


Figure 2 Macrophage origin and homeostasis.

Different studies based on CX₃CR1^{+GFP} mice, the irreversible expression of YPC by CSF1R⁺ and parabiotic mice demonstrated that intestinal macrophages require constant replenishment through CCR2-dependent recruitment of LY6C^{hi} monocytes^[41]. It has also been demonstrated that the constant replenishment of intestine macrophages is related to the microbiota.

Indeed, the administration of broad-spectrum antibiotics for 2 wk in conventional mice results in a small reduction of LY6C^{hi} MHC⁺ macrophages but not in the number of LY6C^{lo} MHC⁺ mature macrophages in the colon. Hence, homeostasis of resident intestinal macrophages requires both the microbiota and the CCR2-dependent recruitment of inflammatory macrophages.

In contrast, the microglia cells are monocyte-independent. They are localized in the central nervous system and exhibit different morphologies according to the type of activation^[42,43]. After birth, the massive expansion of microglia cells that is observed is related to the *in situ* cell proliferation induced by M-CSF and IL-4, but not to monocyte input^[44]. The microglia deletion results in decreased synaptic formation and learning^[18]. Alveolar macrophages are derived from fetal monocytes that colonize the lungs shortly after birth in a process dependent on GM-CSF and peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- γ . Another example of macrophages that do not result from monocyte influx

is provided by alveolar macrophages. They do not differentiate from blood monocytes because CD163-DTR-mediated depletion results in repopulation by *in situ* proliferation^[37,45]. However, when alveolar macrophages are depleted by a genotoxic injury such as a lethal irradiation, recruited monocytes can repopulate the alveolar macrophage niche^[18]. Hence, alveolar macrophages do not require monocyte recruitment but can accommodate such requirement when required.

The skin, which has been well studied in mice in recent years, provides an excellent model of the role of the balance between monocyte input and self-renewal. It contains two major macrophage populations, Langerhans cells in the epidermidis and dermal macrophages. The Langerhans cells originate from YS-derived myeloid precursors and monocytes from fetal liver. They undergo an extensive proliferation after birth and a low rate of *in situ* proliferation that is sufficient to maintain their number in adulthood without further monocyte input. Dermal macrophages probably have a complex origin; they contain a pool of established prenatal macrophages and one postnatal pool derived from blood monocytes expressing high levels of CCR2 and LY6C. The dermal macrophages are clearly distinct from Langerhans cells and other dermal DCs^[46].

Recent studies concern cardiac macrophages in which depletion experiments enable the description of repopulation strategies. There is evidence that

combined mechanisms are required. In steady state, the majority of cardiac macrophages are of embryonic origin and repopulation after depletion is supported by circulating monocytes^[18]. All these findings have been based on murine models and their extrapolation to homeostasis of human macrophages will require original methodological approaches.

MACROPHAGE IN DISEASES

It is well known that macrophages are necessary to fight against microbial pathogens or tumor cells, but they may also contribute to inflammatory and autoimmune diseases and the development of metastasis. While there is evidence that the self-renewal of tissue macrophages seems sufficient to maintain resident cells in steady state, pathological situations require exogenous contribution. Different models of response to injury have provided essential information. The most usual model consists of the injection of microbial or toxic agents inside the mouse peritoneal cavity in which resident macrophages are of embryonic origin. The initial response consists of the recruitment of blood monocytes. During the phase of resolution of inflammation, recruited monocytes mature into macrophages^[38]. In a murine model of acute liver injury induced by N-acetyl-p-aminophenol, the number of resident Kupffer cells first decreases and then starts to increase without requiring LY6C^{hi} monocytes during the resolution phase. In the necroinflammatory phase, LY6C^{hi} monocytes are recruited in a CCR2-dependent manner. In addition, the transcriptional signatures of self-renewed Kupffer cells and recruited monocytes are clearly distinct^[38]. In patients, some examples illustrate the fact that monocyte influx does not explain the response to inflammatory challenge. For instance, the macrophages present in ocular adnexae are polarized and express markers of proliferative activity^[47]. During the acute inflammatory response in which inflammatory macrophages are recruited, tissue macrophages proliferate intensively, suggesting a combination of mechanisms to restore homeostasis after an aggression^[48]. We will briefly describe macrophage renewal in some clinical situations.

Atherosclerosis

Atherosclerosis is characterized by the accumulation of macrophages in atheromatous plaques; they ingest lipids and produce a panel of inflammatory mediators leading to an amplification loop. It has been shown at least in mouse models that lesional macrophages arise predominantly from circulating LY6C^{hi} monocytes^[49]. The introduction of cholesterol in the diet induces an influx of monocytes in atheromatous plaques after two weeks with a difference between monocyte subsets: monocytes expressing LY6C are more efficiently recruited than monocytes which do not express LY6C and it is believed that the latter cells may promote vascular stability and play an atheroprotective role^[50]. Recent

papers suggest that the accumulation of macrophages in atheromatous lesions is not the only consequence of monocyte input. Hence, macrophage proliferation in atheromatous lesions has been reported in humans, rabbits and mice^[50-52]. In apolipoprotein E-deficient mice (ApoE^{-/-}) with a high-cholesterol diet, a rapid turnover of macrophages is observed within the lesions. The monocyte depletion does not affect the turnover of lesion aortic macrophages. In addition, using parabiosis reveals that monocyte recruitment cannot fully account for lesional macrophage accumulation in established atherosclerosis but it cannot be excluded monocyte circulating precursor is involved^[50,53]. Using an adoptive transfer methodology in ApoE^{-/-} mice under a high-cholesterol diet shows that proliferating aortic macrophages derive from non-proliferating circulating monocytes. The contribution of recruited monocytes seems to be prominent in early lesions, but it is likely that less than 20% of macrophages in established atheromatous lesions are due to monocyte influx, with local proliferation of macrophages accounting for the largest part of lesional macrophages^[50]. Recently, the expression of type 1 scavenger receptor class A (Msr1) on lesional macrophages has been reported and seems to be correlated with macrophage proliferation. Hence, lesional macrophages from Msr1^{-/-} mice proliferate poorly compared with wild type macrophages and are less abundant^[53].

The persistence of lesional macrophages also reflects defective cell death. Hence, the lack of macrophage death at early stages of atherosclerosis increases macrophage burden and seems to reduce the progression of the disease in later stages^[50,54].

Myocardial infarction is a complication of atherosclerosis and the heart lesion is characterized by an inflammatory response mediated by recruited neutrophils and monocytes, and the proliferation of local cardiac macrophages^[55]. The expansion of local macrophages is long lasting until healing and these macrophages display heterogeneity of activation states from M1 to reparative M2 macrophages. Healing requires cardiac macrophages whatever their origin (monocyte recruitment vs local proliferation) as assessed by numerous studies including clinical studies^[56,57].

Recently, it has been reported that Osmr^{-/-} (oncostatin M receptor) mice undergoing myocardial infarction exhibit a reduced number of myeloid cells expressing F4/80 and CD11b. In addition, Osm induces the expression of REG3 β , which is a potent chemoattractant for macrophages. In REG3^{-/-} mice with myocardial infarction, the macrophage burden is decreased, suggesting that the macrophages within infarcted lesions are of monocytic origin. Again, the functional activity of lesional macrophages is time dependent. Indeed, the monocytes recruited early within infarcted lesions lead to M1 macrophages whereas macrophages found during tissue remodeling are of M2 type, but these two macrophage functional subsets are controlled by REG3^[58]. The inflammatory reaction seems to be similar

in the brain after a stroke. It is likely that the perivascular macrophages replenished by circulating monocytes, in contrast to microglia, drive the recruitment of inflammatory cells in lesions of cerebral tissue. In contrast, microglia may play a role in post-ischemic inflammation and also in tissue repair^[59]. Finally, another feature of atherosclerosis is its association with obesity in which macrophages accumulate in adipose tissue and it has been recently reported that local macrophage proliferation is related to obesity-associated adipose tissue inflammation^[60].

Cancer

The abundance of tumor-associated macrophages (TAMs) in solid tumors is often correlated with the prognosis of the tumors^[9,61]. TAMs are usually of M2 type and may be considered to be repairing the cancer lesions, but the acquisition of tumorigenic properties may involve a complex dialogue between macrophages, tumor cells and stromal cells^[62]. The pool of TAMs results from circulating monocytes. Monocyte recruitment depends on the tumor microenvironment and occurs mainly in hypoxic regions of the tumors^[63], as demonstrated by different murine tumor models. For instance, in lung adenocarcinoma, two populations of TAMs designated MHCII^{lo} and MHCII^{hi} are present and derive from LY6C^{hi} monocytes^[64]. In addition, the spleen is a reservoir for TAM precursors in a CCR2-dependent way^[65]. Besides the monocyte origin of TAMs, there is growing evidence that they may also result from a self-renewal process of *in situ* macrophages. It has been reported that TAMs proliferate in human breast carcinomas^[66]. Fully differentiated macrophages and not blood-borne precursors drive TAM accumulation in a mouse model of spontaneous mammary carcinogenesis^[67]. The situation seems more complex in gliomas in which microglia and TAMs derived from monocytes are present within and around the tumor cells.

Although they exhibit a M2 phenotype under the influence of glioma cells, their origin remains to be determined^[43]. It has also been shown that cancer can promote extra-medullary monocytopoiesis in spleen red pulp. In murine lung adenocarcinoma, angiotensin is directly involved in the self-renewal of HSCs and macrophage progenitors; the blockade of its production restrains the number of TAMs^[68]. In cancer, the recruitment of monocytes seems to be prominent but understanding of the nature of the dialogue between macrophages and tumoral cells is only in the early stages.

Infectious diseases

The recruitment of monocytes and their maturation in macrophages is essential for defense against microbial pathogens^[5]. Indeed, monocytes enter sites of infection and draining lymph nodes to promote adaptive immunity. For instance, the recruitment of inflammatory monocytes in the lungs in response to *Mycobacterium*

tuberculosis is necessary to T-cell activation and tuberculosis control^[69]. In several infectious diseases, CCR2-mediated monocyte mobilization plays a prominent role. The recruitment of monocytes mediated by CCR2 is required for the control of *Legionella pneumophila* infection in mice^[70]. The protective role of LY6C^{hi} monocytes *via* the CCR2 pathway has been reported in infections with *Plasmodium chabaudi* and *Cryptococcus neoformans*^[5]. Most of these inflammatory monocytes mature in tissue lesions and granulomas into macrophages and DCs, and exhibit a M1 profile^[71]. Cytomegalovirus (CMV) infection is known to reprogram monocytes towards a M1 phenotype^[72]. In a mouse model of congenital CMV infection, the virus is responsible for neurological lesions, disruption of the self-renewal of neural stem/progenitor cells and increased number of activated macrophages (meningeal macrophages and parenchyma microglia) in infection foci. The increased macrophage infiltration may be due to the recruitment of macrophage precursors^[73].

Besides the prominent mechanism related to monocyte influx, M2-polarized macrophages are associated with the self-renewal of macrophages in tissues in some parasitic infections. In experimental filariasis, *Litomosoides sigmodontis* worms are killed in the pleural cavity in resistant C57BL/6 mice; the depletion of blood monocytes does not prevent the expansion of macrophages in the pleural cavity of infected mice. The expansion of resident macrophages can be mimicked by the administration of IL-4^[30]. Nevertheless, M2 macrophages in the intestinal tract of nematode-infected mice are largely monocyte-derived and the macrophages of lamina propria from these mice are able to proliferate, thus demonstrating the complexity of macrophage origin in helminth infections^[29]. It will be important to determine if the self-renewal of macrophages is only a property of helminthiasis infections and what the role of this property of human infectious diseases is.

Neurodegenerative diseases

The pathogenesis of neurodegenerative diseases is critically associated with the neuroinflammation that involves several cell types including microglia. The blood-brain barrier slows down the traffic of monocytes from the blood to the central nervous system and has to be integrated to understand neuroinflammation. Parabiosis and BM transplant studies in mice have revealed the infiltration of monocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis and that this infiltration is related to the progression of the disease and the breakdown of the blood-brain barrier. The recruited monocytes are eliminated over time whereas microglia cells expand locally through proliferation in a persistent manner^[36,74]. While monocyte-derived macrophages may be responsible for demyelination, microglia maybe involved in clearance of cellular debris^[17]. Alzheimer disease is characterized by the deposition of amyloid- β

into parenchyma, the formation of neurofibrillary tangles and neuroinflammation.

Although there is no overall change in microglia cell numbers in the late stages of Alzheimer disease, the chronic stimulation of microglia may result in microglia loss and further replenishment within the brain in the early stages of the disease through the proliferation of tissue-resident microglia^[75]. IL-34 induces the proliferation of microglia which results in the clearance of soluble oligomeric amyloid- β ; co-cultivating primary neurons with microglia in the presence of IL-34 attenuates the neurotoxicity of amyloid- β . The protective effect of IL-34 has been observed in a mouse model of Alzheimer disease in which IL-34 is administered in intra-cerebral ventricles^[76]. Alternatively, macrophages of BM origin may also contribute to Alzheimer disease pathogenesis. It has been proposed that self-renewing microglia produce chemoattractants that may also attract myeloid cells to neuroinflammation sites^[42]. Other studies have reported that CCR2-expressing macrophages are the preferential population recruited to amyloid- β deposits and CCR2 deficiency is associated with impaired amyloid- β clearance^[77]. Finally, Huntington disease is due to the expansion of the trinucleotide CAG in the gene encoding huntingtin, which is associated with microglial activation. A proliferation of microglia seems to be critical in the pathogenesis of the disease. Indeed, experiments based on cultures of microglia and brain slices have revealed the activation of microglia and their proliferation in the vicinity of degenerating neurons expressing mutated huntingtin^[78].

CONCLUSION

The introduction of new molecular tools has greatly modified our vision of the origin of macrophages. The role of circulating monocytes in replenishing macrophage populations seems to be limited in steady state conditions even if they play an important role in pathological conditions. The demonstration of mature macrophages' ability to proliferate has profoundly changed our vision that this proliferation reflects macrophage immaturity. The proliferation of macrophages seems to be associated with macrophage polarization in pathological conditions. These new results open fascinating perspectives in different pathologies. The interference with the recruitment of monocytes with therapeutic monoclonal antibodies is already a means to modify the microenvironment of tumors for instance, but this strategy may be a source of potential complications including infectious complications. Better knowledge of the origin of macrophages in lesions may lead to the reprogramming of macrophages to enhance their beneficial functional properties without promoting deleterious effects.

REFERENCES

- 1 van Furth R, Cohn ZA. The origin and kinetics of mononuclear

- phagocytes. *J Exp Med* 1968; **128**: 415-435 [PMID: 5666958]
- 2 Gordon S. The macrophage: past, present and future. *Eur J Immunol* 2007; **37** Suppl 1: S9-17 [PMID: 17972350 DOI: 10.1002/eji.200737638]
- 3 Gentek R, Molawi K, Sieweke MH. Tissue macrophage identity and self-renewal. *Immunol Rev* 2014; **262**: 56-73 [PMID: 25319327 DOI: 10.1111/imr.12224]
- 4 Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2009; **27**: 669-692 [PMID: 19132917 DOI: 10.1146/annurev.immunol.021908.132557]
- 5 Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2011; **11**: 762-774 [PMID: 21984070 DOI: 10.1038/nri3070]
- 6 Ka MB, Gondo-Rey F, Capo C, Textoris J, Million M, Raoult D, Olive D, Mege JL. Imbalance of circulating monocyte subsets and PD-1 dysregulation in Q fever endocarditis: the role of IL-10 in PD-1 modulation. *PLoS One* 2014; **9**: e107533 [PMID: 25211350 DOI: 10.1371/journal.pone.0107533]
- 7 Ziegler-Heitbrock L. Monocyte subsets in man and other species. *Cell Immunol* 2014; **289**: 135-139 [PMID: 24791698 DOI: 10.1016/j.cellimm.2014.03.019]
- 8 Ben Amara A, Gorvel L, Baulan K, Derain-Court J, Buffat C, Vérolet C, Textoris J, Ghigo E, Bretelle F, Maridonneau-Parini I, Mege JL. Placental macrophages are impaired in chorioamnionitis, an infectious pathology of the placenta. *J Immunol* 2013; **191**: 5501-5514 [PMID: 24163411 DOI: 10.4049/jimmunol.1300988]
- 9 Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* 2011; **11**: 723-737 [PMID: 21997792 DOI: 10.1038/nri3073]
- 10 Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol* 2010; **11**: 889-896 [PMID: 20856220 DOI: 10.1038/ni.1937]
- 11 Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdt S, Gordon S, Hamilton JA, Ivashkiv LB, Lawrence T, Locati M, Mantovani A, Martinez FO, Mege JL, Mosser DM, Natoli G, Saeij JP, Schultze JL, Shirey KA, Sica A, Suttles J, Udalova I, van Ginderachter JA, Vogel SN, Wynn TA. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* 2014; **41**: 14-20 [PMID: 25035950 DOI: 10.1016/j.immuni.2014.06.008]
- 12 Ka MB, Daumas A, Textoris J, Mege JL. Phenotypic diversity and emerging new tools to study macrophage activation in bacterial infectious diseases. *Front Immunol* 2014; **5**: 500 [PMID: 25346736 DOI: 10.3389/fimmu.2014.00500]
- 13 Xue J, Schmidt SV, Sander J, Draffehn A, Krebs W, Quester I, De Nardo D, Gohel TD, Emde M, Schmidleithner L, Ganesan H, Nino-Castro A, Mallmann MR, Labzin L, Theis H, Kraut M, Beyer M, Latz E, Freeman TC, Ulas T, Schultze JL. Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. *Immunity* 2014; **40**: 274-288 [PMID: 24530056 DOI: 10.1016/j.immuni.2014.01.006]
- 14 Gautier EL, Shay T, Miller J, Greter M, Jakubzick C, Ivanov S, Helft J, Chow A, Elpek KG, Gordonov S, Mazloom AR, Ma'ayan A, Chua WJ, Hansen TH, Turley SJ, Merad M, Randolph GJ. Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nat Immunol* 2012; **13**: 1118-1128 [PMID: 23023392 DOI: 10.1038/ni.2419]
- 15 Becher B, Schlitzer A, Chen J, Mair F, Sumatoh HR, Teng KW, Low D, Ruedl C, Riccardi-Castagnoli P, Poidinger M, Greter M, Ginhoux F, Newell EW. High-dimensional analysis of the murine myeloid cell system. *Nat Immunol* 2014; **15**: 1181-1189 [PMID: 25306126 DOI: 10.1038/ni.3006]
- 16 Chow A, Brown BD, Merad M. Studying the mononuclear phagocyte system in the molecular age. *Nat Rev Immunol* 2011; **11**: 788-798 [PMID: 22025056 DOI: 10.1038/nri3087]
- 17 Varol C, Mildner A, Jung S. Macrophages: development and tissue specialization. *Annu Rev Immunol* 2015; **33**: 643-675 [PMID: 25861979 DOI: 10.1146/annurev-immunol-032414-112220]

- 18 **Epelman S**, Lavine KJ, Beaudin AE, Sojka DK, Carrero JA, Calderon B, Brija T, Gautier EL, Ivanov S, Satpathy AT, Schilling JD, Schwendener R, Sergin I, Razani B, Forsberg EC, Yokoyama WM, Unanue ER, Colonna M, Randolph GJ, Mann DL. Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation. *Immunity* 2014; **40**: 91-104 [PMID: 24439267 DOI: 10.1016/j.immuni.2013.11.019]
- 19 **Sieweke MH**, Allen JE. Beyond stem cells: self-renewal of differentiated macrophages. *Science* 2013; **342**: 1242974 [PMID: 24264994 DOI: 10.1126/science.1242974]
- 20 **Golde DW**, Finley TN, Cline MJ. The pulmonary macrophage in acute leukemia. *N Engl J Med* 1974; **290**: 875-878 [PMID: 4522205 DOI: 10.1056/NEJM197404182901603]
- 21 **Hambleton S**, Salem S, Bustamante J, Bigley V, Boisson-Dupuis S, Azevedo J, Fortin A, Haniffa M, Ceron-Gutierrez L, Bacon CM, Menon G, Trouillet C, McDonald D, Carey P, Ginhoux F, Alsina L, Zumwalt TJ, Kong XF, Kumararatne D, Butler K, Hubeau M, Feinberg J, Al-Muhsen S, Cant A, Abel L, Chaussabel D, Doffinger R, Talesnik E, Grumach A, Duarte A, Abarca K, Moraes-Vasconcelos D, Burk D, Berghuis A, Geissmann F, Collin M, Casanova JL, Gros P. IRF8 mutations and human dendritic-cell immunodeficiency. *N Engl J Med* 2011; **365**: 127-138 [PMID: 21524210 DOI: 10.1056/NEJMoa1100066]
- 22 **Gomez Perdiguero E**, Klapproth K, Schulz C, Busch K, Azzoni E, Crozet L, Garner H, Trouillet C, de Bruijn MF, Geissmann F, Rodewald HR. Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature* 2015; **518**: 547-551 [PMID: 25470051 DOI: 10.1038/nature13989]
- 23 **Hoeffel G**, Chen J, Lavin Y, Low D, Almeida FF, See P, Beaudin AE, Lum J, Low I, Forsberg EC, Poidinger M, Zolezzi F, Larbi A, Ng LG, Chan JK, Greter M, Becher B, Samokhvalov IM, Merad M, Ginhoux F. C-Myb(+) erythro-myeloid progenitor-derived fetal monocytes give rise to adult tissue-resident macrophages. *Immunity* 2015; **42**: 665-678 [PMID: 25902481]
- 24 **Ginhoux F**, Tacke F, Angeli V, Bogunovic M, Loubreau M, Dai XM, Stanley ER, Randolph GJ, Merad M. Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nat Immunol* 2006; **7**: 265-273 [PMID: 16444257 DOI: 10.1038/ni1307]
- 25 **Wang Y**, Szretter KJ, Vermi W, Gilfillan S, Rossini C, Cella M, Barrow AD, Diamond MS, Colonna M. IL-34 is a tissue-restricted ligand of CSF1R required for the development of Langerhans cells and microglia. *Nat Immunol* 2012; **13**: 753-760 [PMID: 22729249 DOI: 10.1038/ni.2360]
- 26 **Greter M**, Helft J, Chow A, Hashimoto D, Mortha A, Agudo-Cantero J, Bogunovic M, Gautier EL, Miller J, Leboeuf M, Lu G, Aloman C, Brown BD, Pollard JW, Xiong H, Randolph GJ, Chipuk JE, Frenette PS, Merad M. GM-CSF controls nonlymphoid tissue dendritic cell homeostasis but is dispensable for the differentiation of inflammatory dendritic cells. *Immunity* 2012; **36**: 1031-1046 [PMID: 22749353 DOI: 10.1016/j.immuni.2012.03.027]
- 27 **Fejer G**, Wegner MD, Györy I, Cohen I, Engelhard P, Voronov E, Manke T, Ruzsics Z, Dölken L, Prazeres da Costa O, Branzk N, Huber M, Prasse A, Schneider R, Apte RN, Galanos C, Freudenberg MA. Nontransformed, GM-CSF-dependent macrophage lines are a unique model to study tissue macrophage functions. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; **110**: E2191-E2198 [PMID: 23708119 DOI: 10.1073/pnas.1302877110]
- 28 **Shibata Y**, Berclaz PY, Chronos ZC, Yoshida M, Whitsett JA, Trapnell BC. GM-CSF regulates alveolar macrophage differentiation and innate immunity in the lung through PU.1. *Immunity* 2001; **15**: 557-567 [PMID: 11672538]
- 29 **Rückerl D**, Allen JE. Macrophage proliferation, provenance, and plasticity in macroparasite infection. *Immunol Rev* 2014; **262**: 113-133 [PMID: 25319331 DOI: 10.1111/imr.12221]
- 30 **Jenkins SJ**, Ruckerl D, Cook PC, Jones LH, Finkelman FD, van Rooijen N, MacDonald AS, Allen JE. Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. *Science* 2011; **332**: 1284-1288 [PMID: 21566158 DOI: 10.1126/science.1204351]
- 31 **Milner JD**, Orekov T, Ward JM, Cheng L, Torres-Velez F, Junttila I, Sun G, Buller M, Morris SC, Finkelman FD, Paul WE. Sustained IL-4 exposure leads to a novel pathway for hemophagocytosis, inflammation, and tissue macrophage accumulation. *Blood* 2010; **116**: 2476-2483 [PMID: 20570861 DOI: 10.1182/blood-2009-11-255174]
- 32 **Zavialov AV**, Gracia E, Glaichenhaus N, Franco R, Zavialov AV, Lauvau G. Human adenosine deaminase 2 induces differentiation of monocytes into macrophages and stimulates proliferation of T helper cells and macrophages. *J Leukoc Biol* 2010; **88**: 279-290 [PMID: 20453107 DOI: 10.1189/jlb.1109764]
- 33 **Molawi K**, Sieweke MH. Transcriptional control of macrophage identity, self-renewal, and function. *Adv Immunol* 2013; **120**: 269-300 [PMID: 24070388 DOI: 10.1016/B978-0-12-417028-5.00010-7]
- 34 **Rosas M**, Davies LC, Giles PJ, Liao CT, Kharfan B, Stone TC, O'Donnell VB, Fraser DJ, Jones SA, Taylor PR. The transcription factor Gata6 links tissue macrophage phenotype and proliferative renewal. *Science* 2014; **344**: 645-648 [PMID: 24762537 DOI: 10.1126/science.1251414]
- 35 **Auffray C**, Fogg D, Garfa M, Elain G, Join-Lambert O, Kayal S, Sarnacki S, Cumano A, Lauvau G, Geissmann F. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* 2007; **317**: 666-670 [PMID: 17673663 DOI: 10.1126/science.1142883]
- 36 **Ginhoux F**, Jung S. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2014; **14**: 392-404 [PMID: 24854589 DOI: 10.1038/nri3671]
- 37 **Hashimoto D**, Chow A, Noizat C, Teo P, Beasley MB, Leboeuf M, Becker CD, See P, Price J, Lucas D, Greter M, Mortha A, Boyer SW, Forsberg EC, Tanaka M, van Rooijen N, García-Sastre A, Stanley ER, Ginhoux F, Frenette PS, Merad M. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity* 2013; **38**: 792-804 [PMID: 23601688 DOI: 10.1016/j.immuni.2013.04.004]
- 38 **Yona S**, Kim KW, Wolf Y, Mildner A, Varol D, Breker M, Strauss-Ayali D, Viukov S, Guillemins M, Misharin A, Hume DA, Perlman H, Malissen B, Zelzer E, Jung S. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity* 2013; **38**: 79-91 [PMID: 23273845 DOI: 10.1016/j.immuni.2012.12.001]
- 39 **Zigmond E**, Jung S. Intestinal macrophages: well educated exceptions from the rule. *Trends Immunol* 2013; **34**: 162-168 [PMID: 23477922 DOI: 10.1016/j.it.2013.02.001]
- 40 **Bain CC**, Scott CL, Uronen-Hansson H, Gudjonsson S, Jansson O, Grip O, Guillemins M, Malissen B, Agace WW, Mowat AM. Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6Chi monocyte precursors. *Mucosal Immunol* 2013; **6**: 498-510 [PMID: 22990622 DOI: 10.1038/mi.2012.89]
- 41 **Bain CC**, Bravo-Blas A, Scott CL, Gomez Perdiguero E, Geissmann F, Henri S, Malissen B, Osborne LC, Artis D, Mowat AM. Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. *Nat Immunol* 2014; **15**: 929-937 [PMID: 25151491 DOI: 10.1038/ni.2967]
- 42 **Heneka MT**, Kummer MP, Latz E. Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nat Rev Immunol* 2014; **14**: 463-477 [PMID: 24962261 DOI: 10.1038/nri3705]
- 43 **Saijo K**, Glass CK. Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2011; **11**: 775-787 [PMID: 22025055 DOI: 10.1038/nri3086]
- 44 **Ajami B**, Bennett JL, Krieger C, Tetzlaff W, Rossi FM. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci* 2007; **10**: 1538-1543 [PMID: 18026097 DOI: 10.1038/nn2014]
- 45 **Guillemins M**, De Kleer I, Henri S, Post S, Vanhoutte L, De Prijck S, Deswarte K, Malissen B, Hammad H, Lambrecht BN. Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *J Exp*

- Med* 2013; **210**: 1977-1992 [PMID: 24043763 DOI: 10.1084/jem.20131199]
- 46 **Malissen B**, Grégoire C, Malissen M, Roncagalli R. Integrative biology of T cell activation. *Nat Immunol* 2014; **15**: 790-797 [PMID: 25137453 DOI: 10.1038/ni.2959]
 - 47 **Herwig MC**, Holz FG, Loeffler KU. Distribution and presumed proliferation of macrophages in inflammatory diseases of the ocular adnexae. *Curr Eye Res* 2015; **40**: 604-610 [PMID: 25111002 DOI: 10.3109/02713683.2014.943909]
 - 48 **Davies LC**, Rosas M, Smith PJ, Fraser DJ, Jones SA, Taylor PR. A quantifiable proliferative burst of tissue macrophages restores homeostatic macrophage populations after acute inflammation. *Eur J Immunol* 2011; **41**: 2155-2164 [PMID: 21710478 DOI: 10.1002/eji.201141817]
 - 49 **Swirski FK**, Libby P, Aikawa E, Alcaide P, Luscinskas FW, Weissleder R, Pittet MJ. Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata. *J Clin Invest* 2007; **117**: 195-205 [PMID: 17200719 DOI: 10.1172/JCI29950]
 - 50 **Randolph GJ**. Mechanisms that regulate macrophage burden in atherosclerosis. *Circ Res* 2014; **114**: 1757-1771 [PMID: 24855200 DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.114.301174]
 - 51 **Gordon D**, Reidy MA, Benditt EP, Schwartz SM. Cell proliferation in human coronary arteries. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 4600-4604 [PMID: 1972277]
 - 52 **Rosenfeld ME**, Ross R. Macrophage and smooth muscle cell proliferation in atherosclerotic lesions of WHHL and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits. *Arteriosclerosis* 1990; **10**: 680-687 [PMID: 2403295]
 - 53 **Robbins CS**, Hilgendorf I, Weber GF, Theurl I, Iwamoto Y, Figueiredo JL, Gorbato R, Sukhova GK, Gerhardt LM, Smyth D, Zavitz CC, Shikata EA, Parsons M, van Rooijen N, Lin HY, Husain M, Libby P, Nahrendorf M, Weissleder R, Swirski FK. Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis. *Nat Med* 2013; **19**: 1166-1172 [PMID: 23933982 DOI: 10.1038/nm.3258]
 - 54 **Gautier EL**, Huby T, Witztum JL, Ouzilleau B, Miller ER, Saint-Charles F, Aucouturier P, Chapman MJ, Lesnik P. Macrophage apoptosis exerts divergent effects on atherogenesis as a function of lesion stage. *Circulation* 2009; **119**: 1795-1804 [PMID: 19307478 DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.806158]
 - 55 **Lambert JM**, Lopez EF, Lindsey ML. Macrophage roles following myocardial infarction. *Int J Cardiol* 2008; **130**: 147-158 [PMID: 18656272 DOI: 10.1016/j.ijcard.2008.04.059]
 - 56 **van Amerongen MJ**, Harmsen MC, van Rooijen N, Petersen AH, van Luyn MJ. Macrophage depletion impairs wound healing and increases left ventricular remodeling after myocardial injury in mice. *Am J Pathol* 2007; **170**: 818-829 [PMID: 17322368 DOI: 10.2353/ajpath.2007.060547]
 - 57 **Leuschner F**, Rauch PJ, Ueno T, Gorbato R, Marinelli B, Lee WW, Dutta P, Wei Y, Robbins C, Iwamoto Y, Sena B, Chudnovskiy A, Panizzi P, Keliher E, Higgins JM, Libby P, Moskowitz MA, Pittet MJ, Swirski FK, Weissleder R, Nahrendorf M. Rapid monocyte kinetics in acute myocardial infarction are sustained by extramedullary monocytopoiesis. *J Exp Med* 2012; **209**: 123-137 [PMID: 22213805 DOI: 10.1084/jem.20111009]
 - 58 **Lörchner H**, Pöling J, Gajawada P, Hou Y, Polyakova V, Kostin S, Adrian-Segarra JM, Boettger T, Wietelmann A, Warnecke H, Richter M, Kubin T, Braun T. Myocardial healing requires Reg3 β -dependent accumulation of macrophages in the ischemic heart. *Nat Med* 2015; **21**: 353-362 [PMID: 25751817 DOI: 10.1038/nm.3816]
 - 59 **Iadecola C**, Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med* 2011; **17**: 796-808 [PMID: 21738161 DOI: 10.1038/nm.2399]
 - 60 **Amano SU**, Cohen JL, Vangala P, Tencerova M, Nicoloso SM, Yawe JC, Shen Y, Czech MP, Aouadi M. Local proliferation of macrophages contributes to obesity-associated adipose tissue inflammation. *Cell Metab* 2014; **19**: 162-171 [PMID: 24374218 DOI: 10.1016/j.cmet.2013.11.017]
 - 61 **Bingle L**, Brown NJ, Lewis CE. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol* 2002; **196**: 254-265 [PMID: 11857487 DOI: 10.1002/path.1027]
 - 62 **Ostuni R**, Kratochvill F, Murray PJ, Natoli G. Macrophages and cancer: from mechanisms to therapeutic implications. *Trends Immunol* 2015; **36**: 229-239 [PMID: 25770924 DOI: 10.1016/j.it.2015.02.004]
 - 63 **Raggi C**, Mousa HS, Correnti M, Sica A, Invernizzi P. Cancer stem cells and tumor-associated macrophages: a roadmap for multitargeting strategies. *Oncogene* 2015; **132**: Epub ahead of print [PMID: 25961921 DOI: 10.1038/onc.2015.132]
 - 64 **Laoui D**, Van Overmeire E, Di Conza G, Aldeni C, Keirsse J, Morias Y, Movahedi K, Houbracken I, Schoupe E, Elkrim Y, Karroum O, Jordan B, Carmeliet P, Gysemans C, De Baetselier P, Mazzone M, Van Ginderachter JA. Tumor hypoxia does not drive differentiation of tumor-associated macrophages but rather fine-tunes the M2-like macrophage population. *Cancer Res* 2014; **74**: 24-30 [PMID: 24220244 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1196]
 - 65 **Cortez-Retamozo V**, Etzrodt M, Newton A, Rauch PJ, Chudnovskiy A, Berger C, Ryan RJ, Iwamoto Y, Marinelli B, Gorbato R, Forghani R, Novobrantseva TI, Kotliansky V, Figueiredo JL, Chen JW, Anderson DG, Nahrendorf M, Swirski FK, Weissleder R, Pittet MJ. Origins of tumor-associated macrophages and neutrophils. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; **109**: 2491-2496 [PMID: 22308361 DOI: 10.1073/pnas.1113744109]
 - 66 **Campbell MJ**, Tonlaar NY, Garwood ER, Huo D, Moore DH, Khramtsov AI, Au A, Baehner F, Chen Y, Malaka DO, Lin A, Adeyanju OO, Li S, Gong C, McGrath M, Olopade OI, Esserman LJ. Proliferating macrophages associated with high grade, hormone receptor negative breast cancer and poor clinical outcome. *Breast Cancer Res Treat* 2011; **128**: 703-711 [PMID: 20842526 DOI: 10.1007/s10549-010-1154-y]
 - 67 **Tymoszek P**, Evens H, Marzola V, Wachowicz K, Wasmer MH, Datta S, Müller-Holzner E, Fiegl H, Böck G, van Rooijen N, Theurl I, Doppler W. In situ proliferation contributes to accumulation of tumor-associated macrophages in spontaneous mammary tumors. *Eur J Immunol* 2014; **44**: 2247-2262 [PMID: 24796276 DOI: 10.1002/eji.201344304]
 - 68 **Cortez-Retamozo V**, Etzrodt M, Newton A, Ryan R, Pucci F, Sio SW, Kuswanto W, Rauch PJ, Chudnovskiy A, Iwamoto Y, Kohler R, Marinelli B, Gorbato R, Wojtkiewicz G, Panizzi P, Mino-Kenudson M, Forghani R, Figueiredo JL, Chen JW, Xavier R, Swirski FK, Nahrendorf M, Weissleder R, Pittet MJ. Angiotensin II drives the production of tumor-promoting macrophages. *Immunity* 2013; **38**: 296-308 [PMID: 23333075 DOI: 10.1016/j.immuni.2012.10.015]
 - 69 **Peters W**, Scott HM, Chambers HF, Flynn JL, Charo IF, Ernst JD. Chemokine receptor 2 serves an early and essential role in resistance to Mycobacterium tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 7958-7963 [PMID: 11438742 DOI: 10.1073/pnas.131207398]
 - 70 **Serbina NV**, Pamer EG. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat Immunol* 2006; **7**: 311-317 [PMID: 16462739 DOI: 10.1038/ni1309]
 - 71 **Benoit M**, Desnues B, Mege JL. Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol* 2008; **181**: 3733-3739 [PMID: 18768823 DOI: 10.4049/jimmunol.181.6.3733]
 - 72 **Chan G**, Bivins-Smith ER, Smith MS, Smith PM, Yurochko AD. Transcriptome analysis reveals human cytomegalovirus reprograms monocyte differentiation toward an M1 macrophage. *J Immunol* 2008; **181**: 698-711 [PMID: 18566437 DOI: 10.4049/jimmunol.181.1.698]
 - 73 **Sakao-Suzuki M**, Kawasaki H, Akamatsu T, Meguro S, Miyajima H, Iwashita T, Tsutsui Y, Inoue N, Kosugi I. Aberrant fetal macrophage/microglial reactions to cytomegalovirus infection. *Ann Clin Transl Neurol* 2014; **1**: 570-588 [PMID: 25356429 DOI: 10.1002/acn3.88]
 - 74 **Ajami B**, Bennett JL, Krieger C, McNagny KM, Rossi FM. Infiltrating monocytes trigger EAE progression, but do not contribute to the resident microglia pool. *Nat Neurosci* 2011; **14**: 1142-1149 [PMID: 21804537 DOI: 10.1038/nn.2887]

- 75 **Serrano-Pozo A**, Gómez-Isla T, Growdon JH, Frosch MP, Hyman BT. A phenotypic change but not proliferation underlies glial responses in Alzheimer disease. *Am J Pathol* 2013; **182**: 2332-2344 [PMID: 23602650 DOI: 10.1016/j.ajpath.2013.02.031]
- 76 **Mizuno T**, Doi Y, Mizoguchi H, Jin S, Noda M, Sonobe Y, Takeuchi H, Suzumura A. Interleukin-34 selectively enhances the neuroprotective effects of microglia to attenuate oligomeric amyloid- β neurotoxicity. *Am J Pathol* 2011; **179**: 2016-2027 [PMID: 21872563 DOI: 10.1016/j.ajpath.2011.06.011]
- 77 **Mildner A**, Schlevogt B, Kierdorf K, Böttcher C, Erny D, Kummer MP, Quinn M, Brück W, Bechmann I, Heneka MT, Priller J, Prinz M. Distinct and non-redundant roles of microglia and myeloid subsets in mouse models of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2011; **31**: 11159-11171 [PMID: 21813677]
- 78 **Kraft AD**, Kaltenbach LS, Lo DC, Harry GJ. Activated microglia proliferate at neurites of mutant huntingtin-expressing neurons. *Neurobiol Aging* 2012; **33**: 621.e17-621.e33 [PMID: 21482444 DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2011.02.015]

P- Reviewer: Capasso R, Ferrante A, Kwon HJ
S- Editor: Qiu S **L- Editor:** A **E- Editor:** Jiao XK





Published by **Baishideng Publishing Group Inc**

8226 Regency Drive, Pleasanton, CA 94588, USA

Telephone: +1-925-223-8242

Fax: +1-925-223-8243

E-mail: bpgoffice@wjgnet.com

Help Desk: <http://www.wjgnet.com/esps/helpdesk.aspx>

<http://www.wjgnet.com>

