

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

Discipline : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Spécialité : IMMUNOLOGIE

Présentée et soutenue publiquement par

ALEXANDRE PIERRE

Le 11 décembre 2017

**ROLE DU VIEILLISSEMENT ET DES PEPTIDES D'ELASTINE SUR LA REPONSE
INFLAMMATOIRE ET IMMUNITAIRE AU COURS DE LA BRONCHO-PNEUMOPATHIE
CHRONIQUE OBSTRUCTIVE (BPCO)**

Thèse dirigée par **RICHARD LE NAOUR**

JURY

M. Philippe BILLIALD,	Professeur des Universités,	Université Paris-Sud,	Rapporteur, Président du jury
M. Stéphane BIRKLE,	Professeur des Universités,	Université de Nantes,	Rapporteur
Mme Jeanne MOREAU,	Maître de Conférences,	Université de Limoges,	Examineur
M. Valerian DORMOY,	Maître de Conférences,	Université de Reims Champagne-Ardenne,	Examineur
M. Richard LE NAOUR,	Professeur des Universités,	Université de Reims Champagne-Ardenne,	Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Pr Philippe Billiald ainsi que le Pr Stéphane Birklé d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail de thèse, ainsi que le Dr Valérian Dormoy et le Dr Jeanne Moreau d'avoir également accepté de juger ce travail en tant qu'examineurs.

Je remercie le Pr Richard Le Naour de m'avoir accepté comme étudiant en thèse, et accueilli au sein de son laboratoire, l'unité EA4683, en me fournissant tous les moyens nécessaires afin de mener à bien ce travail de thèse. Vous avez su être présent lorsque j'en ai eu le plus besoin, particulièrement dans les derniers moments de la rédaction du manuscrit et de la préparation de mon exposé final, et je vous en remercie infiniment. J'ai été très heureux d'avoir travaillé sous votre direction.

Merci au Dr Aïda Meghraoui-Kheddar et au Dr Mehdi Sellami de m'avoir montré toutes les techniques qu'ils ont eux-même mises au point et sur lesquelles je me suis appuyé, ainsi qu'au Dr Sandra Audonnet du plateau technique URCACyt pour son expertise en cytométrie en flux.

Merci à Flora qui a su s'accomoder comme elle le pouvait des odeurs de pizza 4 fromages du début d'après-midi, à Jérémy mon partenaire de galère toujours présent, ainsi qu'à toutes les personnes du troisième étage qui ont animé les couloirs la journée.

Et enfin, merci à ma famille, à mes parents, et à Amandine qui occupe la place la plus importante dans ma vie. Je vous aime.

Table des matières

Table des matières	1
Liste des figures.....	4
Liste des tableaux.....	6
Liste des abréviations.....	7
Contexte Scientifique & Présentation du manuscrit.....	11

INTRODUCTION..... 15

1. La réponse immunitaire	16
1.1 <i>Le système immunitaire inné</i>	16
1.1.1 La reconnaissance des pathogènes	16
1.1.2 Les composants de l'immunité innée.....	17
1.1.2.1 <i>Les cellules épithéliales</i>	17
1.1.2.2 <i>Les neutrophiles et les monocytes/macrophages</i>	18
1.1.2.3 <i>Les autres composants</i>	19
1.1.3 Transition vers le système immunitaire adaptatif.....	21
1.2 <i>Le système immunitaire adaptatif</i>	22
1.2.1 Les différents types d'immunité adaptative	23
1.2.1.1 <i>L'immunité à médiation humorale</i>	23
1.2.1.2 <i>L'immunité à médiation cellulaire</i>	24
1.2.2 Les cellules T dans l'immunité cellulaire	25
1.2.2.1 <i>Reconnaissance des antigènes par les lymphocytes T</i>	26
1.2.2.2 <i>La maturation des lymphocytes T</i>	32
1.2.2.3 <i>Les phases de la réponse des lymphocytes T</i>	37
1.2.2.4 <i>L'activation des lymphocytes T</i>	39
1.2.2.5 <i>Les sous-populations de lymphocytes T CD4⁺</i>	41
2. La Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive	46
2.1 <i>Epidémiologie</i>	46
2.2 <i>Définitions clinique et fonctionnelle</i>	47
2.3 <i>Physiopathologie de la BPCO</i>	48
2.3.1 BPCO et immunité innée.....	49

2.3.1.1	Les cellules épithéliales.....	49
2.3.1.2	Les macrophages alvéolaires.....	49
2.3.1.3	Les polynucléaires neutrophiles.....	51
2.3.2	BPCO et immunité adaptative.....	54
2.3.2.1	Lymphocytes T CD8 ⁺	54
2.3.2.1	Lymphocytes T CD4 ⁺	56
2.4	BPCO et phases d'exacerbations.....	57
2.4.1	Exacerbations infectieuses.....	58
2.4.2	Exacerbations non infectieuses.....	58
2.5	Genèse de la BPCO.....	59
3.	Elastine et peptides d'élastine (PE).....	61
3.1	La matrice extracellulaire.....	61
3.2	Les fibres élastiques.....	61
3.2.1	Généralités.....	61
3.2.2	La biosynthèse de l'élastine.....	62
3.3	Les peptides d'élastine (PE).....	64
3.3.1	Les "Matrikines".....	64
3.3.2	La genèse des peptides d'élastine.....	64
3.3.3	Le complexe récepteur de l'élastine (CRE).....	65
3.3.4	Propriétés biologiques des PE.....	67
3.3.4.1	Propriétés pro-angiogénique et pro-tumorale.....	68
3.3.4.2	Régulation de la réponse inflammatoire.....	68
3.3.4.3	Polarisation de la réponse T.....	69
3.4	Peptides d'élastine et BPCO.....	70
4.	Le vieillissement cellulaire.....	72
4.1	Généralités.....	72
4.2	La sénescence cellulaire.....	73
4.3	Vieillesse et fonctions pulmonaires.....	74
4.4	Elastine et vieillissement.....	75
4.5	Immunosénescence et inflammaging.....	75
4.5.1	Définition de l'immunosénescence.....	75
4.5.2	Le concept d'"inflammaging".....	76
4.5.3	Immunosénescence et système immunitaire inné.....	77
4.5.4	Immunosénescence et système immunitaire adaptatif.....	79
4.5.4.1	Résistance à l'apoptose.....	79

4.5.4.2	Perte du corécepteur CD28.....	79
4.5.4.3	Diminution de la fréquence des cellules T naïves.....	81
4.6	BPCO et Vieillessement.....	81
<u>BUT DU TRAVAIL</u>.....		84
<u>MATERIELS & METHODES</u>.....		86
1.	Rappels de cytométrie en flux.....	87
2.	Description du cytomètre en flux utilisé.....	89
3.	Construction des panels multicolore et stratégies de "gating".....	92
3.1.	Principes généraux.....	92
3.2.	Panels de vérification des trix cellulaires.....	93
3.2.1.	Tri des lymphocytes T CD4 ⁺	93
3.2.2.	Tri des leucocytes CD45 ⁺	94
3.2.3.	Phénotypage des LBA.....	95
3.2.4.	Phénotypage des cellules CD45 ⁺ , CD4 ⁺ et CD8 ⁺ après stimulation.....	96
4.	Dosage multiplexe par la technique de CBA.....	100
4.1.	Principe.....	100
4.2.	Etapas de marquage.....	101
4.3.	Analyse des résultats.....	102
<u>RESULTATS</u>.....		105
	Elastin receptor (S-gal) occupancy by elastin peptides modulates T cell response during murine emphysema.....	106
	Impact of aging on inflammatory and immune responses during elastine-peptide-induced murine emphysema.....	146
<u>DISCUSSION, CONCLUSION ET PERSPECTIVES</u>.....		189
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>.....		195

Liste des figures

Figure 1 : Les différents PAMP et leurs PRRs correspondants	17
Figure 2 : Les différents Toll-like Receptors associés à leurs ligands	18
Figure 3 : L'immunité à médiation humorale.....	24
Figure 4 : L'immunité à médiation cellulaire.....	25
Figure 5 : Les molécules de classe I et de classe II du CMH	27
Figure 6 : Le complexe TCR/CD3	28
Figure 7 : Les molécules CD4 et CD8	29
Figure 8 : Interactions entre TCR et CMH à la surface des cellules T CD4 ⁺ et T CD8 ⁺	30
Figure 9 : La synapse immunologique	32
Figure 10 : Maturation des thymocytes au sein du thymus	33
Figure 11 : Les sélections positive et négative des thymocytes	35
Figure 12 : Les mécanismes d'apprêtement des antigènes.....	39
Figure 13 : Les différentes sous-populations de lymphocytes Th.....	42
Figure 14 : La différenciation des cellules Th naïves en Th1 ou Th2.....	43
Figure 15 : Le rôle des Lymphocytes Th1 et Th2 dans l'immunité.....	44
Figure 16 : Plasticité des différentes sous-populations de lymphocytes T CD8 ⁺	45
Figure 17 : Obstruction centro-lobulaire et emphysème au cours de la BPCO	48
Figure 18 : Le rôle central des macrophages alvéolaires au cours de la BPCO.....	50
Figure 19 : Le rôle délétère des polynucléaires neutrophiles au cours de la BPCO	52
Figure 20 : Orientation Th1 et Tc1 au cours de la BPCO	55
Figure 21 : Action de l'Elastase dans le poumon	59
Figure 22 : Peptides d'élastine et BPCO	60
Figure 23 : Processus de réticulation de l'Elastine.....	63
Figure 24 : Représentation schématique du complexe récepteur de l'élastine	65
Figure 25 : Epissage alternatif de la β -galactosidase	66
Figure 26 : Les séquences VGVAPG au sein de la Tropoélastine humaine	67
Figure 27 : PE et polarisation de la réponse T.....	69

Figure 28 : Les principaux facteurs du vieillissement physiologique.	73
Figure 29 : Principe de fonctionnement d'un cytomètre en flux.....	87
Figure 30 : Les différents filtres utilisés en cytométrie en flux.....	88
Figure 31 : Configuration du BD LSR-Fortessa.....	91
Figure 32 : Exemple de fluorochromes ayant une longueur d'onde d'émission semblable, mais d'excitation différente.	91
Figure 33 : Stratégie de "gating" pour la vérification du tri des lymphocytes T CD4 ⁺	94
Figure 34 : Expression du CD45 sur un broyat de poumon avant et après tri.....	95
Figure 35 : Stratégie de "gating" pour le phénotypage des LBA.....	96
Figure 36 : Stratégie de "gating" pour le phénotypage des CD45 ⁺ stimulés et l'analyse des cytokines intra-cellulaires des cellules Th.....	98
Figure 37 : Stratégie de "gating" pour le phénotypage des CD45 ⁺ stimulés et l'analyse des facteurs de transcription.....	98
Figure 38 : Stratégie de "gating" pour le phénotypage des lymphocytes T CD4 ⁺ stimulés et l'analyse des cytokines.....	99
Figure 39 : Stratégie de "gating" pour le phénotypage des LT CD4 ⁺ stimulés et l'analyse des facteurs de transcription.....	100
Figure 40 : Différentes étapes de la technique CBA (Flex Set, BD biosciences)	101
Figure 41 : Identification des populations de billes spécifiques des cytokines à des concentrations différentes.....	102
Figure 42 : Courbes d'étalonnage des cytokines	103

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les 13 paramètres de couleurs du BD LSR-Fortessa	90
Tableau 2 : Classement des fluorochromes en fonction de leur intensité de fluorescence ...	92
Tableau 3 : Panel utilisé pour vérifier l'efficacité du tri des lymphocytes T CD4 ⁺	93
Tableau 4 : Panel utilisé pour le phénotypage des LBA	96
Tableau 5 : Panels utilisés pour le phénotypage des Leucocytes et des LT CD4 ⁺	97

Liste des abréviations

µL : microlitre

Ac : Anticorps

Acm : Anticorps monoclonal

AIRE : Auto-Immune-Regulator-Element

Akt : protéine kinase B

AMPC : Adénosine Monophosphate cyclique

ARNm : Acide Ribonucléique messenger

BCR : Récepteur des Cellules B

BPCO : Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive

BSF-1 : B cell Stimulatory Factor 1

CCL- : CC chemokine Ligand

CD : Cluster de Différenciation

CDR : Complementary Determining Region

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CMV : Cytomegalovirus

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène

CRE : Complexe Récepteur à l'Elastine

CRF : Capacité Résiduelle Fonctionnelle

CTGF : Connective Tissue Growth Factor

CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4

CXCL- : C-X-C motif chemokine –

DC : Cellules Dendritiques

DN : thymocytes Doubles Négatifs

DP : thymocytes Doubles Positifs

EBP : Elastin Binding Protein

EGF : Epidermal Growth Factor

FcR : récepteurs des parties constantes des immunoglobulines

FEV₁ : Forced Expiratory Volume per second

FGF : Fibroblast Growth Factor

fMLP : N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine

FoxP3 : Forkhead box P3

FVC : Forced Vital Capacity

Fyn : Proto-oncogene tyrosine-protein kinase

GATA3 : Trans-acting T-cell-specific transcription factor

GMPc : Guanosine Monophosphate cyclique

GOLD : Global Initiative for chronic Obstructive Lung Disease

HIF-1 α : Hypoxia Inducible Factor 1 α

hsp70 : Heat Shock Protein 70

ICAM- : InterCellular Adhesion Molecule

IFN-(α,β,γ) : Interféron α,β,γ

Ig : Immunoglobuline

IL- : Interleukine -

IMC : Indice de Masse Corporelle

IP-10 : Interferon-inducible protein 10 (équivalent à CXCL10)

ITAM : Immunoreceptor Tyrosine based Activation Motif

kDa : kilodalton

KO : Knock Out

LBA : Lavages Broncho-Alvéolaires

Lck : lymphocyte-specific protein tyrosine kinase

LFA-1 : Lymphocyte function-associated antigen 1

LPS : Lipopolysaccharide

LTB4 : Leucotriène B4

MEC : Matrice Extra-cellulaire

MIG : monokine induced by interferon γ

miRNA : micro acides ribonucléiques

mL : millilitre

mLN : mediastinal Lymph Nodes

MMP- : Matrix Metalloproteinase

MT1-MMP : membrane type-1 matrix metalloproteinase

mTOR : mechanistic Target Of Rapamycin

NADPH : Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NE : Neutrophil Elastase

Neu-1 : Neuraminidase 1

NF- κ B : Nuclear Factor-kappa B

NK : Natural Killer

NKT : Lymphocyte T Natural Killer

NLRP3 : NOD-Like Receptor family 3

nm : nanomètre

Nrf2 : Trans-acting T-cell-specific transcription factor

OH : hydroxyde

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PAMP : Pathogen-Associated Molecular Patterns

PDGF : Platelet-derived growth factor

PE : Peptide d'Elastine

PI3K : phosphoinositide 3-kinase

PMN : Polymorphonucléaire Neutrophile
PMT : Photomultiplicateurs
PPCA : Protective Protein Cathepsin A
PPE : Pancratice Porcine Elastase
PRR : Pattern Recognition Receptor
ROR- γ T : RAR-related orphan receptor gamma
ROS : Reactive Oxygen Species
SASP : Senescence-Associated Secretory Phenotype
SA- β -gal : Senescence-Associated β -galactosidase
S-Gal : Spliced-Galactosidase
SP : thymocytes Simples Positifs
Src : Proto-oncogene tyrosine-protein kinase
T-bet : T-box transcription factor
TCR : Récepteur des Cellules T
TEMRA : T Effector Memory cell CD45RA+
TfH : Lymphocyte T Folliculaire
TGF- β : Tumor Growth Factor β
Th : Lymphocyte T helper
TIMP-2 : Tissue Inhibitor of Metalloproteinases
TLR : Toll-like Receptor
TNF- α : Tumor Necrosis Factor α
Treg : Lymphocyte T régulateur
VEMS : Volume Expiratoire Maximal par Seconde
VIH : Virus d'Immunodéficience acquise Humain
VRS : Virus Respiratoire Syncitial

Contexte Scientifique & Présentation du manuscrit

La réponse immunitaire représente une arme de défense que l'organisme humain utilise pour se protéger des agressions. Toutefois, cette arme peut se révéler à double tranchant car elle peut devenir délétère lorsque cette réponse perdure et/ou conduit à des dégradations locales non contrôlées. La réponse immunitaire s'organise autour de deux phases complémentaires, la réponse innée avec son processus inflammatoire non spécifique, et la réponse adaptative qui aboutit à la mise en place d'une mémoire immunologique. Les acteurs de ces deux réponses peuvent intervenir au niveau de tous les tissus de l'organisme avec cependant une action plus focalisée au niveau des muqueuses et des barrières biologiques qui constituent les premières lignes de contact avec l'environnement extérieur.

L'appareil respiratoire est le siège des échanges gazeux nécessaires à l'homéostasie d'un organisme vertébré. Le déclenchement d'une réponse inflammatoire au niveau pulmonaire représente la première ligne de défense de l'organisme contre des agents microbiens aéroportés (bactéries, virus, spores,...) ou contre des polluants inhalés tels que la fumée de cigarette qui contient plusieurs centaines de composants chimiques plus ou moins irritants. Le maintien d'une réponse inflammatoire dans le temps, ou son échappement aux mécanismes de contrôle, peut conduire à l'installation d'une pathologie inflammatoire chronique respiratoire, qui peut parfois être irréversible. C'est le cas de la Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO).

La BPCO est une affection de l'appareil respiratoire, associée à une réponse inflammatoire chronique accrue au niveau des voies aériennes et du parenchyme pulmonaire, et caractérisée par une diminution progressive et irréversible des capacités respiratoires. Ainsi, les mécanismes de défense et de réparation tissulaire sont perturbés, ce qui génère, dans les petites voies aériennes, des obstructions et des bronchites chroniques amenant l'apparition d'une fibrose, et conduit au niveau alvéolaire à la destruction du parenchyme pulmonaire responsable de l'emphysème.

L'accumulation de cellules inflammatoires dans les poumons entraîne une production massive de protéases à l'origine du déséquilibre de la balance protéases/anti-protéases au

niveau pulmonaire. Ce déséquilibre, qui représente une des hypothèses étiologiques de la BPCO, provoque l'altération du parenchyme pulmonaire, causée par la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC), et en particulier des fibres élastiques qui assurent le maintien de l'intégrité fonctionnelle du poumon. Par ailleurs, au cours de la BPCO chez l'homme, un nombre élevé de lymphocytes T "helper" (Th) et de lymphocytes T cytotoxiques (Tc) est retrouvé dans les voies respiratoires et le parenchyme pulmonaire, et cette augmentation est corrélée avec l'aggravation de la maladie.

Si l'exposition au tabac est le facteur de risque majoritaire du déséquilibre de la balance protéases/anti-protéases et de l'accumulation de cellules inflammatoires activées dans les poumons de patients atteints de BPCO, il semble que le vieillissement soit également un facteur important. En effet, la prévalence de la maladie augmente en fonction de l'âge, et le vieillissement du tissu pulmonaire est accéléré par l'exposition à la fumée de cigarette ainsi que par la maladie elle-même, suggérant que ces différents phénomènes partagent des mécanismes communs. De plus, l'émergence au cours de la BPCO de clones lymphocytaires T CD4⁺ et T CD8⁺ n'exprimant plus ou exprimant peu le marqueur d'activation CD28, dont l'absence est un marqueur de sénescence, suggère un peu plus que cette maladie puisse s'apparenter à une maladie du vieillissement.

Le vieillissement physiologique s'accompagne d'une altération du système immunitaire appelé "immunosénescence". L'immunosénescence fait référence aux modifications générales du système immunitaire, tant au niveau cellulaire que systémique, causées par le vieillissement physiologique de l'organisme. Les cellules immunitaires qui sont le plus sensibles à ce mécanisme de vieillissement sont les lymphocytes T. Les multiples stimulations antigéniques qui surviennent tout au long de la vie activent les lymphocytes T qui se différencient en cellules effectrices et prolifèrent (expansion clonale). Cette prolifération engendre de nombreux clones qui sécrètent des enzymes, des cytokines pro-inflammatoires et des enzymes cytotoxiques qui permettent de se débarrasser des micro-organismes pathogènes. A la suite de réactivations répétées par le même antigène, les cellules T clonales mémoires deviennent à chaque fois plus réactives et leur prolifération s'accompagne d'un raccourcissement inéluctable de leurs télomères engendrant un vieillissement cellulaire irréversible. Par ailleurs, la multiplication de ces clones mémoires associée à une taille limitée et invariable de l'espace immunologique se fait au dépend de l'espace dévolu aux cellules T naïves et donc au dépend de la capacité du système immunitaire à s'adapter à de nouveaux agents pathogènes : le système immunitaire devient par conséquent moins efficace.

La diminution de la veille immunologique par les cellules T, causée par les modifications immunologiques liées à la sénescence, a pour conséquence la mise en place d'un mécanisme de compensation par les cellules de l'immunité innée qui deviennent plus agressives en sécrétant de grandes quantités d'agents pro-inflammatoires et de protéases dans les tissus, et notamment dans les muqueuses (dont la muqueuse respiratoire). Ceci génère alors une inflammation chronique liée à l'âge, appelée "inflammaging", qui peut être à l'origine d'une susceptibilité accrue à développer des pathologies infectieuses et chroniques inflammatoires comme la BPCO.

L'élastolyse, qui correspond à la destruction des fibres élastiques, et qui est responsable de l'apparition de l'emphysème au cours de la BPCO, est un phénomène qui se produit naturellement avec l'âge. Ce phénomène est accéléré au cours de la BPCO sous l'effet de protéases à activité élastinolytique produites par les cellules inflammatoires (polynucléaires neutrophiles et macrophages principalement). Sous l'effet de ces protéases, la dégradation des fibres élastiques génère des peptides solubles d'élastine (PE) retrouvés à des taux élevés dans les différents liquides biologiques des patients atteints de BPCO. Par ailleurs, le niveau de protéases élastinolytiques dans les LBA de patients atteints d'emphysème est corrélé avec le niveau de PE dans ces mêmes fluides. De même, le taux élevé de peptides d'élastine au niveau sérique chez les patients BPCO est corrélé avec la sévérité de la maladie.

Les PE exercent leurs activités biologiques via leur interaction avec un récepteur spécifique qui comporte une sous-unité appelée "Elastin Binding Protein" (EBP), elle-même dotée d'un site de fixation spécifique des peptides d'élastine, le site "S-gal". Le peptide d'élastine VGVAPG représente la séquence la plus répétée dans chaque molécule de tropoélastine constituant les fibres d'élastine. Les données récentes du laboratoire montrent que l'instillation intra-trachéale d'une dose unique du peptide VGVAPG à des souris permet d'obtenir, en 21 jours, un emphysème caractérisé par une inflammation chronique et une dégradation du parenchyme pulmonaire. Dans ces deux modèles, nous avons montré que la réponse lymphocytaire est une réponse de type Th1 et Th17 associée à une réponse Tc1.

Sur la base des données de la littérature et des travaux du laboratoire, nous avons émis l'hypothèse que le vieillissement pouvait accélérer le développement de l'emphysème et moduler la polarisation de la réponse Th et Tc, et que ces effets liés au vieillissement pouvaient impliquer les peptides solubles d'élastine. Le travail de thèse présenté dans ce manuscrit a porté sur l'étude comparative des paramètres biologiques liés à l'emphysème et à l'orientation de la réponse lymphocytaire dans un modèle murin de souris jeunes de 6

semaines et de souris âgées de 15 mois instillées soit par le peptide d'élastine VGVAPG soit par de l'élastase pancréatique porcine.

Le manuscrit est organisé en quatre parties :

La première partie est une introduction qui présente l'état actuel des connaissances sur *i)* la réponse immunitaire et le rôle des lymphocytes T, *ii)* la physiopathologie de la BPCO, *iii)* l'élastine et les propriétés biologiques des peptides d'élastine, et *iv)* les mécanismes cellulaires mis en jeu au cours du vieillissement.

La deuxième partie consiste en un "Matériels et méthodes" venant en complément de la partie "Materials and methods" décrite dans les deux articles intégrés au manuscrit, et détaillant plus largement les approches de cytométrie en flux utilisées dans ce travail de thèse.

La troisième partie présente, d'une part les résultats obtenus lors de l'étude de la polarisation de la réponse Th et Tc dans un modèle murin d'emphysème induit par l'instillation du peptide d'élastine VGVAPG et qui ont été publiés en juin 2017 dans la revue "*American Journal of Physiology, Lung Cellular and Molecular Physiology*", et, d'autre part l'ensemble des résultats obtenus lors de l'étude du rôle du vieillissement sur la mise en place du processus emphysémateux et sur la modulation de la réponse Th et Tc au cours de l'emphysème induit par les peptides d'élastine et qui ont fait l'objet de la rédaction d'un article que nous allons soumettre pour publication dans "*The American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*" avec le titre "*Impact of aging on inflammatory and immune responses during elastin peptide-induced murine emphysema*".

Enfin, la quatrième partie du manuscrit fait la synthèse de l'ensemble du travail effectué au cours de la thèse au travers d'une discussion/conclusion et de perspectives.

L'ensemble du travail présenté dans ce manuscrit a été réalisé à l'UFR de Pharmacie de Reims (Université de Reims Champagne-Ardenne) au sein de l'EA 4683 "Immunité adaptative et fonctionnalité des barrières biologiques" (Directeur : Pr R. Le Naour). Ce travail s'intègre dans l'axe II "Infection et Immunité" de la SFR-CAPSanté.

INTRODUCTION

1. La réponse immunitaire

Le système immunitaire est un système de défense contre les organismes étrangers s'introduisant à l'intérieur d'un individu. C'est un ensemble de mécanismes de défense présents dès la naissance, capable de discriminer entre ce qui appartient au soi et ce qui doit être détruit, et qui protège donc l'organisme contre les agents infectieux extérieurs comme par exemple les virus, les parasites et les bactéries. Ces mécanismes de défense de l'hôte se composent d'une immunité naturelle responsable de la protection initiale contre les infections, et d'une immunité adaptative qui se développe plus lentement et met en œuvre une défense tardive mais plus efficace contre les infections.

1.1 Le système immunitaire inné

Le terme d'immunité innée fait référence au fait que ce type de défense développé par l'hôte est toujours présent chez les individus sains. Elle constitue la première ligne de défense de l'organisme, prête à bloquer l'entrée des microorganismes et à éliminer rapidement ceux qui ont réussi à pénétrer dans les tissus de l'hôte.

1.1.1 La reconnaissance des pathogènes

La base de l'immunité est la reconnaissance et la détection des agents infectieux qu'il faut combattre. Ainsi, les composants de l'immunité innée reconnaissent des structures qui sont partagées par différentes classes de microorganismes, et qui ne sont pas présentes sur les cellules de l'hôte. Ces molécules microbiennes sont des motifs moléculaires désignées sous le terme de "Pathogen associated molecular pattern" (PAMP) (Janeway 1989). Le plus connu d'entre eux est le Lipopolysaccharide (LPS ou endotoxine) que l'on retrouve à la surface des bactéries à gram négatif. Les récepteurs de l'immunité innée qui reconnaissent les PAMP sont des récepteurs avec des structures très conservées (qui ne sont pas soumis à des phénomènes de recombinaison) appelés "Pattern recognition receptor" (PRR) (Janeway 1989). Ces reconnaissances spécifiques sont possibles car le système immunitaire inné a évolué afin de

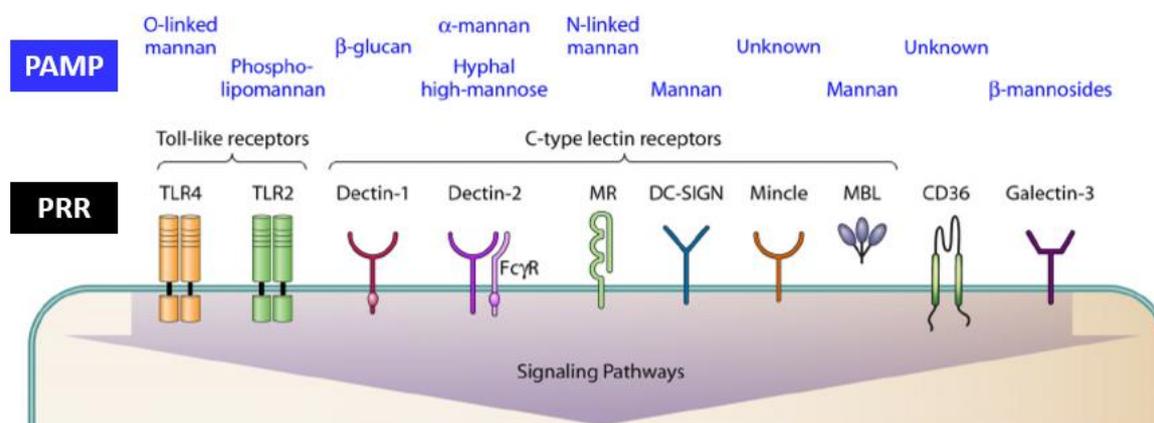


Figure 1 : Les différents PAMP et leurs PRRs correspondants

(d'après Cheng *et al.* 2012)

reconnaitre les PAMP qui sont des structures essentielles à la survie et au pouvoir infectieux des agents pathogènes (**Figure 1**). Les PRR sont exprimés par les cellules immunitaires, mais également les cellules épithéliales et endothéliales, qui sont autant d'éléments qui participent à la défense contre les microorganismes. Leur activation permet aux cellules les exprimant de produire des signaux pro-inflammatoires informant les autres cellules d'une infection, ce qui permet la mise en place rapide d'une réponse immunitaire. Parmi les PRR les plus connus, on trouve la famille des "Toll-like Receptor" (TLR) (Rock *et al.* 1998). Les TLR sont exprimés sur les membranes plasmiques et dans les endosomes de nombreux types cellulaires et constituent une classe importante de récepteurs du système immunitaire inné qui reconnaissent les composants de la paroi bactérienne et les acides nucléiques viraux (**Figure 2**).

1.1.2 Les composants de l'immunité innée

1.1.2.1 Les cellules épithéliales

Les cellules épithéliales sont les constituants principaux de l'épithélium de la peau et des muqueuses gastro-intestinale et respiratoire ; ce sont les premières lignes de défenses contre les infections, car elles constituent une barrière physique naturelle contre les microorganismes, et les empêche de pénétrer dans l'organisme hôte. Il arrive toutefois que la

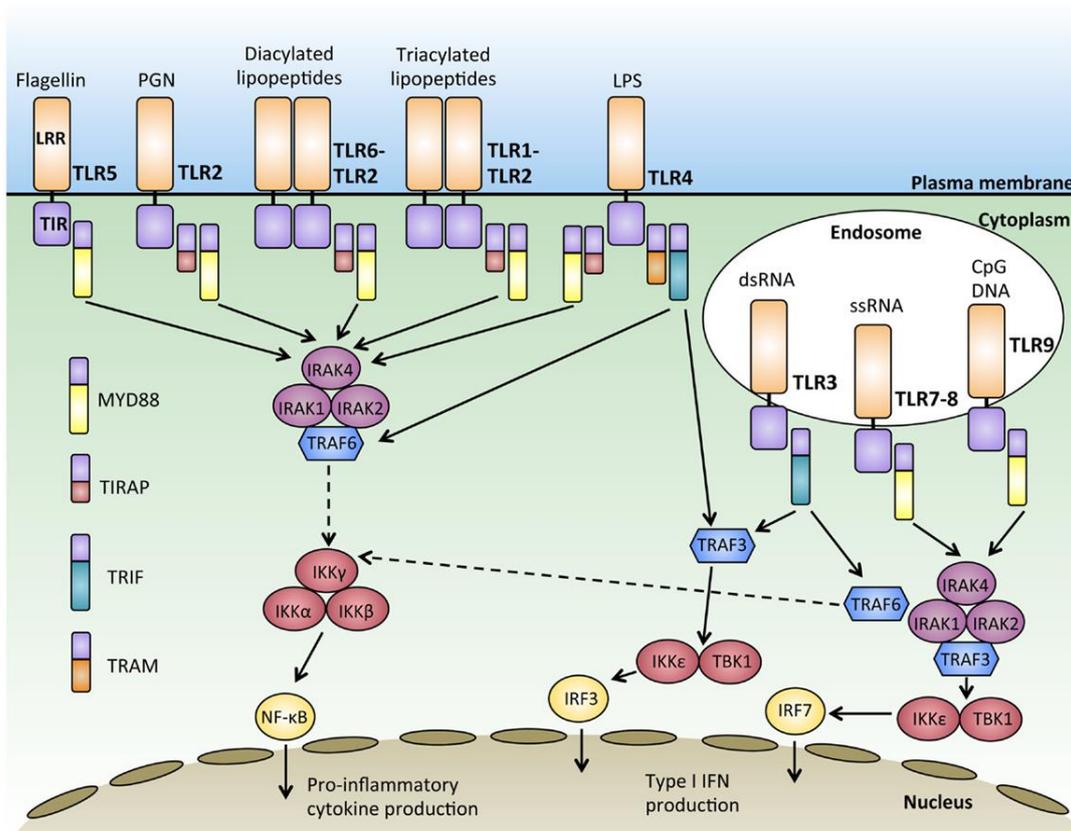


Figure 2 : Les différents Toll-like Receptors associés à leurs ligands (Wang *et al.* 2014)

barrière physique se rompt, et à ce moment-là, les microbes activent les PRR des cellules qui veillent. Celles-ci envoient des signaux activateurs aux cellules endothéliales, ainsi que des signaux chimiotactiques afin de permettre aux cellules immunitaires, qui constituent la deuxième ligne de défense, d'être recrutées.

1.1.2.2 Les neutrophiles et les monocytes/macrophages

Les polynucléaires neutrophiles et les monocytes/macrophages sont les principales cellules phagocytaires. Ce sont des cellules sanguines capables d'ingérer les microorganismes dans le sang ou les tissus où ils sont recrutés (foyers infectieux), afin de les détruire dans leurs vésicules intracellulaires. Les polynucléaires neutrophiles sont les leucocytes les plus nombreux dans le sang (entre $4 \cdot 10^6$ et $10 \cdot 10^6$ par mL de sang). Ce sont les premières cellules à être mises en jeu dans les infections, en particulier dans les infections bactériennes et fongiques. Les monocytes, quant à eux, sont moins nombreux dans le sang (entre $0,5 \cdot 10^6$ et

1.10^6 par mL de sang), et se différencient en macrophages lorsqu'ils pénètrent dans les tissus où, contrairement aux polynucléaires neutrophiles, ils y survivent pendant des périodes prolongées.

Les phagocytes migrent dans les tissus, vers les foyers infectieux, en se liant à des molécules d'adhésion présentes à la surface des cellules endothéliales (P-Sélectine, E-Sélectine, L-Sélectine, ICAM...) (Bosse & Vestweber. 1994 ; Tedder *et al.* 1995 ; Crockett-Torabi & Fantone 1995), et en réponse à des agents chimiotactiques solubles produits par les cellules en veille. L'adhésion à l'endothélium active la mobilisation des vésicules de sécrétion des phagocytes entraînant ainsi l'expression de nouveaux récepteurs de surface nécessaires à la migration des cellules phagocytaires au travers de l'endothélium. Cette étape a lieu le plus souvent dans les veinules post-capillaires où l'endothélium est fin, et où le diamètre du vaisseau est suffisamment petit pour permettre le ralentissement des phagocytes. Une fois passée la barrière endothéliale, les phagocytes doivent encore traverser la membrane basale et ceci grâce à des protéases libérées par l'exocytose des vésicules de sécrétion (Cougoule *et al.* 2010 ; Van Goethem *et al.* 2010 ; Le Cabec *et al.* 2011). Les phagocytes migrants dans les tissus sont alors fortement activés ce qui leur permet, après ingestion des microorganismes pathogènes au niveau du foyer infectieux, de libérer leur arsenal de défense contenu dans leurs granules (radicaux libres, protéases, substances bactéricides : défensines, lactoferrine, lysozyme...) (Lacy & Eitzen 2008 ; Nauseef 2014). Ces cellules sont également capables de recruter d'autres cellules immunitaires en générant des cytokines chimiotactiques amplifiant ainsi la réponse inflammatoire. Une fois l'agent pathogène éliminé, les cellules phagocytaires peuvent participer à la réparation des tissus endommagés.

1.1.2.3 Les autres composants

1.1.2.3.1 Les cellules Natural Killer (NK)

Les cellules NK sont des lymphocytes qui interviennent selon deux mécanismes au cours de l'immunité innée : ils sont capables de détruire directement les cellules de l'hôte infectées par des microorganismes intracellulaires en reconnaissant les antigènes du pathogène ré-exprimés à leur surface, mais ils peuvent également soutenir les macrophages en stimulant la phagocytose.

1.1.2.3.2 Les cytokines de l'immunité innée

Les cytokines sont des facteurs solubles synthétisés par les cellules de l'immunité afin de recruter ou activer d'autres cellules immunitaires, et participent ainsi pleinement à l'élaboration et l'organisation d'une réponse immunitaire efficace. La source majeure des cytokines au cours de la réponse innée est représentée par les macrophages activés (via leur PRR). La réponse inflammatoire commence avec la synthèse du TNF- α et de l'IL-1 qui participent activement au recrutement des polynucléaires neutrophiles et des monocytes. L'IFN- γ joue également un rôle important puisque c'est la cytokine qui active majoritairement les macrophages (Fidler 1975 ; North 1978 ; Rocklin *et al.* 1980). Elle est produite par les cellules NK et les Lymphocytes T. En réponse à cette activation par l'IFN- γ , les macrophages produisent en retour de l'IL-12 qui participe au recrutement cellules T cytotoxiques, de l'IL-15 qui favorise la prolifération de cellules NK, et de l'IL-18 qui active les lymphocytes T et NK.

A l'inverse, les cytokines sont également capable d'organiser la fin de l'inflammation lorsque celle-ci n'est plus nécessaire. L'IL-10 est l'une des cytokines anti-inflammatoires sécrétées lorsque que le pathogène a disparu, et elle permet à l'inflammation de se résorber pour laisser place aux mécanismes de réparation tissulaire (Zizzo *et al.* 2012 ; Spiller *et al.* 2014 ; Jetten *et al.* 2014).

1.1.2.3.3 Les cellules dendritiques

L'interface entre l'immunité innée et l'immunité adaptative est étroite. Elle met en jeu des médiateurs solubles tels que des cytokines, mais également des contacts cellule à cellule spécifiques. Ces derniers contacts impliquent notamment les cellules dendritiques (DC). Les DC ne sont pas à proprement parler des cellules qui protègent l'organisme contre les agressions par des pathogènes exogènes, au même titre que les polynucléaires neutrophiles et les monocytes/macrophages. En revanche, elles possèdent une fonction primordiale pour une réponse immunitaire efficace et performante : il s'agit de la fonction de présentation des antigènes à la branche adaptative de l'immunité. La présentation de l'antigène, ainsi que son rôle dans l'immunité seront détaillés dans le chapitre relatif au système immunitaire adaptatif.

Il existe deux types de cellules dendritiques : les DC conventionnelles, et les DC plasmacytoïdes (Satpathy *et al.* 2012 ; Collin *et al.* 2013 ; Merad *et al.* 2013). Les DC conventionnelles (également appelées DC myéloïdes) représentent un groupe large de cellules dendritiques. En effet, certaines sont résidentes et localisées dans les organes lymphoïdes

primaires et secondaires (rate, ganglions), alors que d'autres sont migratoires et résident dans les tissus périphériques (comme la peau ou les muqueuses) où elles jouent le rôle de sentinelle, avant de migrer vers les organes lymphoïdes secondaires suite à la reconnaissance de signaux de danger. Ils peuvent internaliser des particules ou des bactéries par phagocytose ou des antigènes solubles par macro-pinocytose, mais également capturer des antigènes par endocytose à l'aide de récepteurs spécifiques, ou enfin fixer des complexes immuns grâce aux récepteurs des parties constantes des immunoglobulines (FcR). Les DC plasmacytoïdes constituent quant à elles un groupe plus homogène qui doit son nom à la ressemblance de ses DC avec les plasmocytes. En effet, ce sont de petites cellules rondes de 8 à 10 μm de diamètre présentant un cytoplasme volumineux du fait de l'hypertrophie de leur réticulum endoplasmique et de leur appareil de Golgi. A l'état immature, ces cellules circulent dans le sang périphérique, et elles sont capables de changer de morphologie après stimulation. Elles ressemblent alors à des DC matures typiques, c'est-à-dire présentant des dendrites, exprimant des molécules de CMH et de co-stimulation et capables de sécréter de cytokines. Comme les DC conventionnelles, les DC plasmacytoïdes sont également capables de migrer vers les sites d'infection ou les organes lymphoïdes secondaires, et de capturer des antigènes microbiens, tumoraux ou de cellules en nécrose grâce à différents récepteurs. L'étude de l'expression de leurs TLR et des cytokines produites suite à leur engagement par leurs ligands respectifs, suggère une spécialisation fonctionnelle des DC plasmacytoïdes dans les réponses antivirales, nécessitant la production d'Interférons (Baranek & Dalod. 2008 ; Agod *et al.* 2017).

1.1.3 Transition vers le système immunitaire adaptatif

Le système immunitaire inné, grâce à ses cellules phagocytaires, agit rapidement mais sans organisation efficace pour permettre l'élimination systématique des agents pathogènes. Le plus souvent, son intervention précoce permet de contenir les agents infectieux avant qu'ils n'aient eu le temps de se développer, mais il arrive toutefois qu'il se fasse déborder. C'est pourquoi, ce système a développé une autre fonction immune en parallèle de son rôle de première ligne de défense : alerter et initier l'activation de la réponse immunitaire adaptative (ou acquise). Comme cela a été évoqué précédemment, c'est grâce aux CPA que se fait la transition entre les systèmes immunitaires inné et adaptatif. Bien que les cellules dendritiques se soient spécialisées dans la présentation des antigènes à la branche adaptative de l'immunité, les macrophages sont également, dans une moindre mesure, capables de présenter des

antigènes. Les CPA, grâce à l'expression d'une large gamme de TLR, peuvent reconnaître, capturer, et dégrader des antigènes, et ainsi répondre à la majeure partie des signaux de danger afin de mettre en place une réponse immunitaire adaptée. En effet, les antigènes qu'elles présentent sont reconnus par des Lymphocytes T naïfs, qui les attendent dans les organes lymphoïdes secondaires, et qui peuvent à la suite de cela se différencier en cellules effectrices et par conséquent initier la réponse immunitaire adaptative.

La réponse immune adaptative est, *a contrario* de la réponse innée, une réponse d'installation lente et progressive, mais qui permet de mettre en place une immunité efficace, durable et spécifique. Ainsi, les immunités innée et adaptative se complètent en termes de temporalité, de spécificité et d'efficacité, et l'alerte du système immunitaire adaptatif, de même que l'initiation de sa mise en place, constitue donc le second rôle majeur du système immunitaire inné.

1.2 Le système immunitaire adaptatif

Le système immunitaire adaptatif base sa stratégie de défense sur la reconnaissance spécifique de tous les antigènes exogènes, c'est-à-dire du non soi. Ceci lui permet donc une très forte spécificité et efficacité, mais nécessite une période de mise en place plus longue que l'immunité innée. Les principaux acteurs de la réponse immunitaire adaptative sont les Lymphocytes. Il existe deux grands types de lymphocytes, et qui définissent les deux grands types de stratégie adaptative à employer pour lutter au mieux contre les agents pathogènes. Ainsi, les lymphocytes B sont responsables de l'immunité humorale basée sur la production d'anticorps marquant et neutralisant les antigènes d'agents pathogènes en circulation, et les lymphocytes T de l'immunité cellulaire basée sur la cytotoxicité envers les cellules de l'hôte infectées et exprimant à leur surface les antigènes des agents pathogènes intracellulaires.

1.2.1 Les différents types d'immunité adaptative

1.2.1.1 L'immunité à médiation humorale

L'immunité humorale est assurée par les anticorps qui neutralisent et contribuent à l'élimination des agents pathogènes extracellulaires et de leurs toxines. Ils les neutralisent et/ou les préparent à leur destruction par les phagocytes et/ou le système du complément. Ce sont les lymphocytes B qui sont les principales cellules de l'immunité humorale et qui sécrètent les anticorps solubles. Les lymphocytes B se développent dans la moelle osseuse, et une fois matures, ils gagnent la circulation sanguine puis colonisent les follicules lymphoïdes des tissus lymphoïdes secondaires.

Les cellules B naïves peuvent s'activer grâce à une simple reconnaissance de l'antigène, soit par leur récepteur immunoglobuline spécifique, appelé B-Cell Receptor (BCR) (Perelson & Wiegel. 1981 ; Dintzis *et al.* 1983 ; Bachmann *et al.* 1993), soit par l'intermédiaire de leur TLRs (Krieg *et al.* 1995 ; Mond *et al.* 1995 ; Vos *et al.* 2000). La grande majorité des antigènes ne permet pas une activation directe des lymphocytes B, et nécessite la coopération des lymphocytes T helper : la réponse humorale est alors T-dépendante (Katz & Benacerraf 1972 ; Burnstein & Abbas 1991). La réponse humorale T-dépendante est induite par la liaison de l'antigène aux récepteurs immunoglobulines spécifiques des cellules B naïves dans les follicules lymphoïdes, générant des signaux qui les préparent à interagir avec des lymphocytes T helper. Dans le même temps, les antigènes sont ingérés par endocytose, apprêtés dans les vésicules endosomales, puis les structures peptidiques ainsi obtenues sont associés à des molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de classe II afin d'être présentés aux lymphocytes T helper spécifiques. Les lymphocytes T qui reconnaissent le peptide présenté par le lymphocyte B, prolifèrent et se différencient en sécrétant des cytokines qui agissent comme des facteurs de croissance, et en activant des signaux intracellulaires qui rendent les lymphocytes B capables de répondre aux cytokines sécrétées. Une fois activés, les lymphocytes B se différencient en plasmocytes capables de sécréter des Ig solubles qui participent à l'immunité humorale soit par le biais de leurs fonctions de neutralisation, soit en recouvrant l'agent pathogène afin de faciliter sa phagocytose (opsonisation) (**Figure 3**).

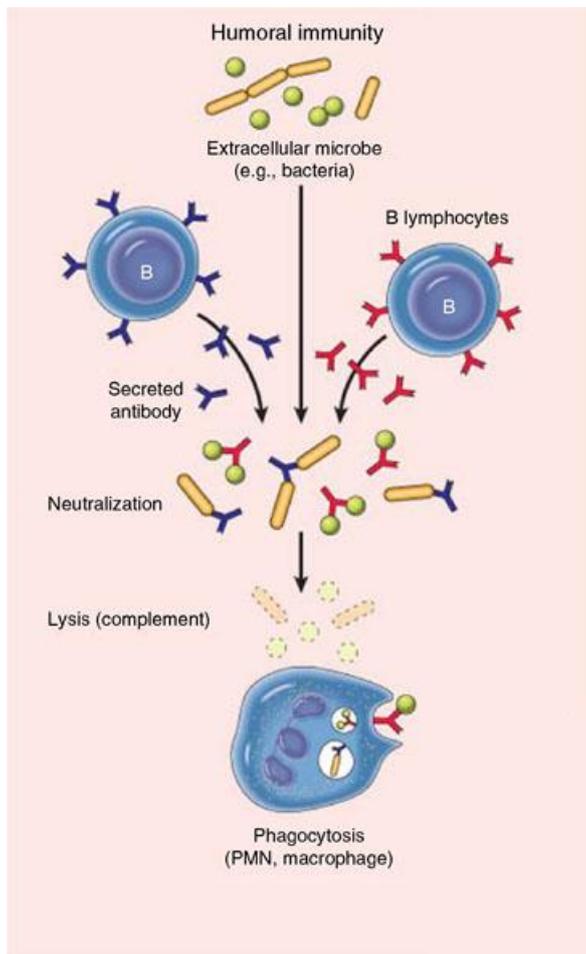


Figure 3 : L'immunité à médiation humorale (d'après Kumar *et al.* 2007)

1.2.1.2 L'immunité à médiation cellulaire

L'immunité cellulaire est la branche du système immunitaire adaptatif qui lutte contre les germes intracellulaires. Les lymphocytes T en sont les principales cellules, et les CPA les principales cellules accessoires.

1.2.2 Les cellules T dans l'immunité cellulaire

Les cellules T sont les cellules principales de l'immunité cellulaire. On distingue deux sous-populations de lymphocytes T ; les lymphocytes T helper (portant le CD4 à leur surface, et également appelés Lymphocytes T auxiliaires) qui activent les phagocytes afin qu'ils détruisent les microorganismes résidant dans les vacuoles intra-phagocytaires, et les lymphocytes T cytotoxiques (portant le CD8) qui peuvent détruire toutes les cellules contenant des microorganismes et repérées par l'expression à la surface membranaire d'antigènes microbiens sous une forme spécifique (**Figure 4**). A l'état mature, un lymphocyte T ne peut porter les deux types de cluster : ils ne peuvent être que CD4+ auxiliaire, ou CD8+ cytotoxique.

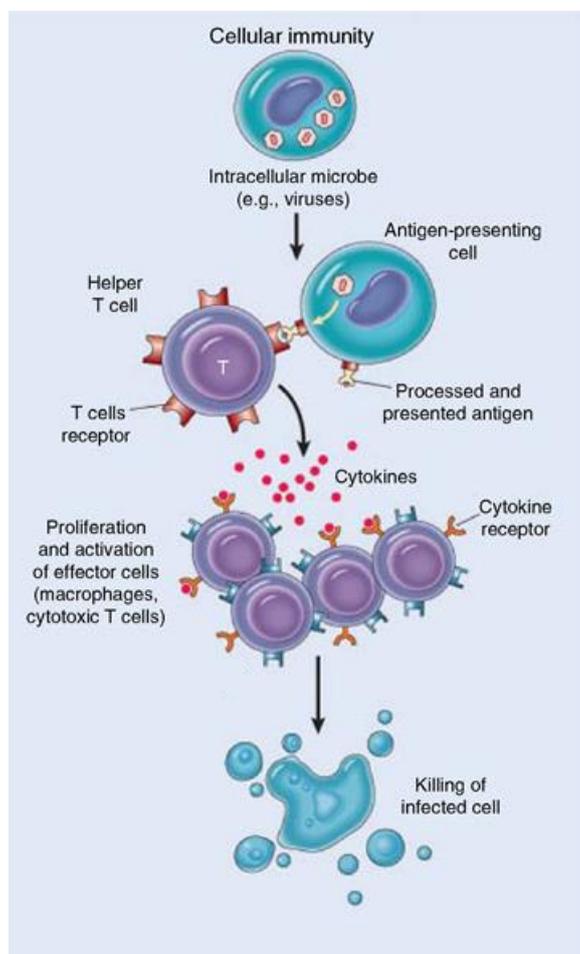


Figure 4 : L'immunité à médiation cellulaire (d'après Kumar *et al.* 2007)

1.2.2.1 Reconnaissance des antigènes par les lymphocytes T

Les cellules T reconnaissent très précisément les motifs peptidiques via leur récepteur des cellules T (ou TCR). Toutefois, il est nécessaire que ces motifs peptidiques soient spécifiquement portés par des cellules et qu'ils y soient associés à des molécules appartenant à la famille du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH). Les cellules qui portent ces molécules de CMH présentant un antigène peuvent être des CPA dans le cas de l'activation des lymphocytes T CD4⁺, mais également n'importe quelle autre cellule nucléée dans le cas de l'activation des lymphocytes T CD8⁺.

1.2.2.1.1 Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)

On distingue deux classes de gènes qui s'assemblent pour former les molécules de classe I et II du CMH. Ces gènes sont pour la plupart des gènes hautement polymorphiques et chaque allèle s'exprime en co-dominance ce qui permet une grande disparité entre les individus d'une même espèce.

Les molécules de CMH de classe I sont des glycoprotéines hétérodimériques transmembranaires composées d'une chaîne α de 44 kDa et d'une chaîne légère appelée β 2-microglobuline de 12 kDa. La partie extracellulaire de la chaîne α est divisée en trois domaines globulaires : α 1, α 2 et α 3. Les domaines α 1 et α 2 servent à la liaison d'un antigène et sont des régions variables, tandis que le domaine α 3 est essentiellement conservé (**Figure 5**). Les CMH de classe I sont exprimés sur toutes les cellules somatiques nucléées et leur reconnaissance est restreinte aux lymphocytes T CD8⁺ (Rosenstein *et al.* 1989).

Les molécules de CMH de classe II sont composées de deux chaînes polypeptidiques non-covalentes : une chaîne glycoprotéique α de 30-34 kDa, et une chaîne glycoprotéique β de 26-29 kDa. Le domaine de liaison du peptide présenté est formé par les hélices α 1 et β 1 (**Figure 5**). Les molécules de classe II s'expriment de manière constitutive seulement sur les APC, et leur reconnaissance est restreinte aux lymphocytes T CD4⁺ (Kappler *et al.* 1987 ; MacDonald *et al.* 1988).

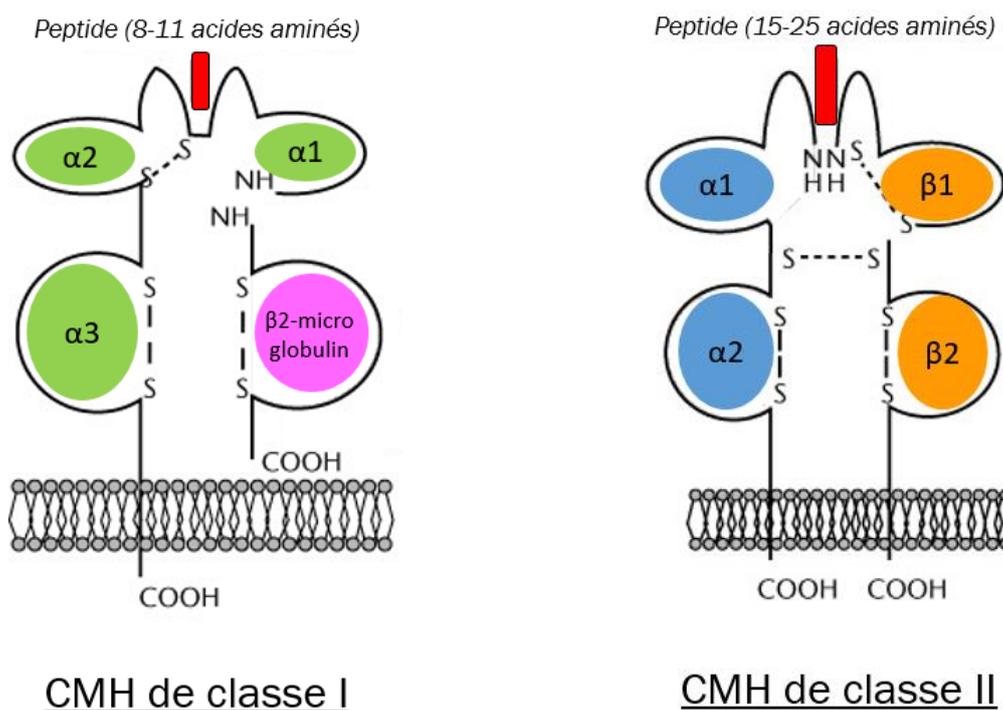


Figure 5 : Les molécules de classe I et de classe II du CMH

(d'après Kulski & Inoko 2005)

1.2.2.1.2 Le récepteur des cellules T (TCR)

Le TCR, qui reconnaît des antigènes peptidiques présentés en association avec des molécules du CMH à la surface des CPA, est une protéine membranaire composée de deux chaînes, chaque chaîne contenant une région variable V et une région constante C. La diversité de reconnaissance de motifs peptidiques distincts définit la notion de répertoire TCR ou de polymorphisme TCR (Becker *et al.* 1985). Le TCR ne reconnaît que des séquences peptidiques très courtes, composées au plus d'une vingtaine d'acides aminés. On estime qu'il existerait environ 10^9 possibilités antigéniques de reconnaissance par le TCR. Chaque récepteur TCR présent à la surface d'une même cellule est strictement identique, et il ne reconnaît qu'un seul motif peptidique. En revanche, chaque TCR n'est porté que par quelques cellules T différentes. C'est la raison pour laquelle, les phénomènes de présentation de l'antigène, de sélection et d'expansion clonales sont essentiels dans la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative effective et efficace.

1.2.2.1.2.1 Structure du TCR, et association aux CD3 et CD4/8

Le TCR est un hétérodimère composé de deux chaînes polypeptidiques parmi 4 chaînes différentes, et fortement polymorphique au sein de l'individu. Il n'existe que deux assemblages possibles de ces chaînes, qui sont liées de manière covalente par des ponts disulfures (Abbas *et al.* 1991) : les hétéromères α et β qui sont majoritairement retrouvés, et les hétérodimères γ et δ qui sont plus marginaux. Au sein de ces chaînes, il existe des domaines constants communs à tous les TCR, et des domaines variables qui vont être à l'origine du polymorphisme des TCR, lui conférant ainsi son caractère unique de reconnaissance d'une seule structure peptidique spécifique. Les régions variables possèdent elles-mêmes des régions hypervariables dénommées "Complementary Determining Region" (CDR) qui sont les zones de contact avec l'antigène. Les chaînes du TCR possèdent une région intra-cytoplasmique très courte qui ne leur permet pas de transmettre le signal secondaire au sein de la cellule une fois la liaison faite avec le complexe CMH-antigène. La transmission du signal est donc réalisée par d'autres chaînes possédant des segments intra-cytoplasmiques plus longs. Ces chaînes sont présentes au niveau du complexe CD3 (**Figure**

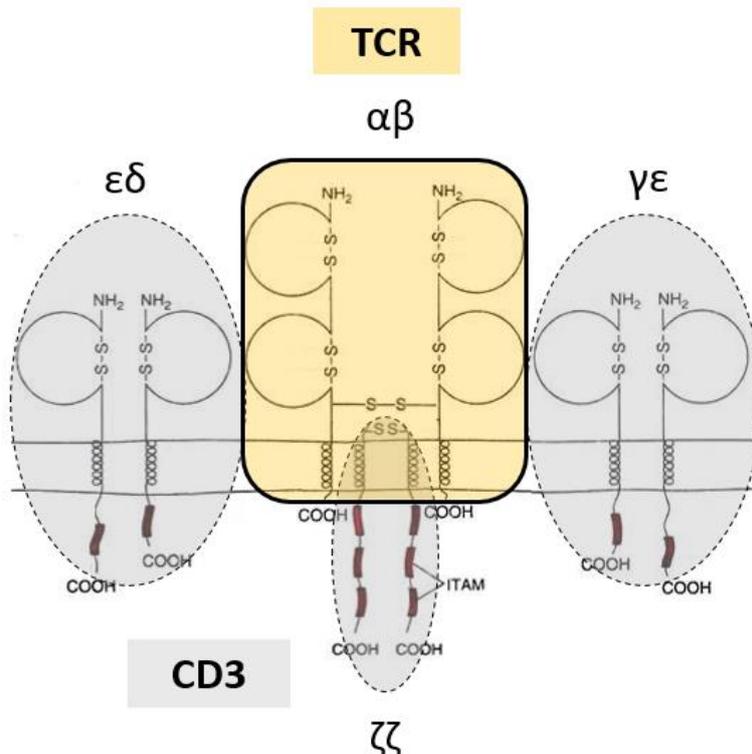


Figure 6 : Le complexe TCR/CD3 (d'après Kuhns *et al.* 2012)

6) Par ailleurs, à elle seule l'affinité de la liaison du TCR avec le CMH est insuffisante pour générer une activation du lymphocyte T. Il existe donc des molécules sur les lymphocytes qui viennent stabiliser et renforcer la liaison TCR-CMH : il s'agit des molécules CD4 et CD8.

Le complexe CD3 est une structure protéique formée par trois dimères obtenus à partir de 5 chaînes différentes : les chaînes γ , δ , ϵ , ζ et η . Le complexe est constitué d'un hétérodimère $\gamma\epsilon$, d'un hétérodimère $\delta\epsilon$ et soit d'un homodimère $\zeta\zeta$ soit d'un hétérodimère $\zeta\eta$ (Abbas *et al.* 1991) (**Figure 6**). Chacune des chaînes du CD3 possède des sites Tyrosine de phosphorylation au niveau intracellulaire également nommés "Immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM). Ces ITAM possèdent des tyrosines qui servent de substrat pour des kinases de la famille Src (Lck et Fyn), et leur phosphorylation permet d'enclencher une cascade complexe servant à transmettre le signal d'activation du lymphocyte T.

La molécule CD4 est une protéine membranaire monomérique présentant 4 domaines immunoglobuline-like (**Figure 7**). Elle possède une forte affinité avec les molécules du CMH de classe II, plus particulièrement au niveau de la région immunoglobuline-like formée par les domaines $\alpha 2$ et $\beta 2$ (**Figure 8**). Contrairement aux TCR, le CD4 n'est pas exprimé exclusivement au niveau des lymphocytes mais également au niveau des monocytes, des macrophages, des cellules microgliales et des cellules dendritiques.

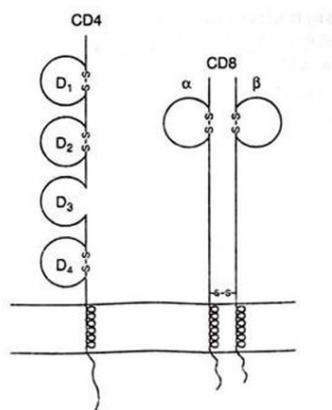


Figure 7 : Les molécules CD4 et CD8 (d'après Leahy 1995)

La molécule CD8 est une protéine membranaire hétéro-dimérique associée au TCR et dont les deux chaînes α et β sont associées par un pont disulfure (**Figure 7**). La molécule CD8 présente un domaine immunoglobuline-like et une forte affinité pour les molécules du CMH

de classe I au niveau de la région immunoglobuline-like formée par les domaines $\alpha 3$ et $\beta 2$ -microglobuline (**Figure 8**).

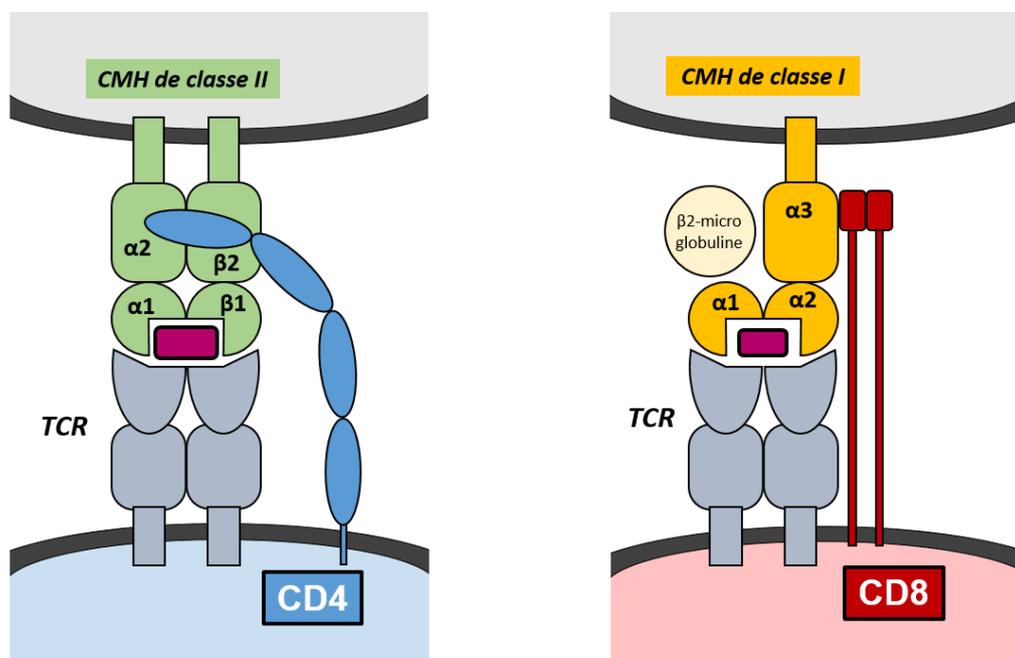


Figure 8 : Interactions entre TCR et CMH à la surface des cellules T CD4⁺ et T CD8⁺
(d'après Leahy 1995)

1.2.2.1.2.2 Les facteurs de co-stimulation associés au TCR

L'engagement d'un TCR après reconnaissance d'un peptide immunogène associé à une molécule du CMH à la surface d'une CPA, constitue le premier signal d'activation du lymphocyte T. Ce premier signal d'activation, initié par le complexe peptide-CMH-TCR-CD3 associé à une molécule CD4 ou CD8, est un signal de faible intensité et de faible amplitude qui doit être renforcé pour permettre une activation complète du lymphocyte T et le déclenchement consécutif de ses fonctions effectrices. C'est le rôle de différentes molécules exprimées à la surface du lymphocyte T, que d'assurer cette fonction de renforcement du premier signal d'activation. Ces molécules, associées à leurs ligands respectifs sur la CPA, et le complexe peptide-CMH-TCR-CD3-CD4/CD8 définissent la notion de synapse immunologique (Frooskman *et al.* 2010) (**Figure 8**).

L'activation complète des lymphocytes T nécessite donc un second signal, appelé signal de co-stimulation. Ce signal doit être reçu au moment de la reconnaissance de l'antigène par le TCR. La molécule CD28, exprimée à la surface des lymphocytes T, est une molécule clé du déclenchement du signal de co-stimulation (Lenschow *et al.* 1996 ; Riley & June. 2005). La molécule CD28 est exprimée constitutivement sur les lymphocytes T et reconnaît les molécules B7-1 (CD80) et/ou B7-2 (CD86) appartenant à la superfamille des immunoglobulines et exprimées à la surface des CPA. Lorsque la molécule CD28 se lie à la molécule B7, il s'ensuit une activation des cellules T via les voies de signalisation Akt et/ou NF- κ B (Schmitz *et al.* 2003). Cette activation module d'importantes fonctions telles que la formation de radeaux lipidiques, la transcription du gène de l'IL-2, l'apoptose, la stabilisation de l'ARNm codant pour des cytokines, le métabolisme du glucose et l'adhérence cellulaire (Thompson *et al.* 1989). Cette liaison permet également l'expression de plusieurs protéines qui contribuent au maintien du signal de co-stimulation et permettent l'expansion et la différenciation cellulaire. Une de ces protéines est la molécule CD154 (ou CD40L) qui appartient à la famille des récepteurs au "Tumor Necrosis Factor" (TNF) et qui va se lier à la molécule CD40 exprimée à la surface de la CPA. L'interaction ainsi réalisée active définitivement le lymphocyte T naïf et active également la CPA qui surexprime la molécule B7 ce qui renforce l'intensité du signal (**Figure 9**). Plusieurs molécules d'adhésion participent également au maintien du signal de co-stimulation. C'est le cas en particulier de l'intégrine LFA-1 ("lymphocyte function-associated antigen-1"), qui est un hétérodimère composé d'une sous-unité α (parmi 4 : CD11a, CD11b, CD11c ou CD11d) et d'une sous-unité β (CD18). Lorsqu'un lymphocyte T naïf reconnaît le peptide présenté par une CPA, il y a changement de conformation du LFA-1, ce qui augmente grandement son affinité pour ses ligands ICAM-1 (CD54) et ICAM-2 (CD102) (Dubey *et al.* 1995).

La régulation dans le temps du signal de co-stimulation est exercée par la molécule de surface CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4, CD152) que le lymphocyte exprime tardivement après l'activation. En effet, cette molécule se lie aux dimères B7 avec une avidité 20 fois plus forte que celle de la molécule CD28 (Linsley & Ledbetter 1993). L'interaction CTLA-4/B7 induit un signal négatif indirect au niveau du lymphocyte T ce qui diminue sa production d'IL-2 et donc sa prolifération (Walunas *et al.* 1996).

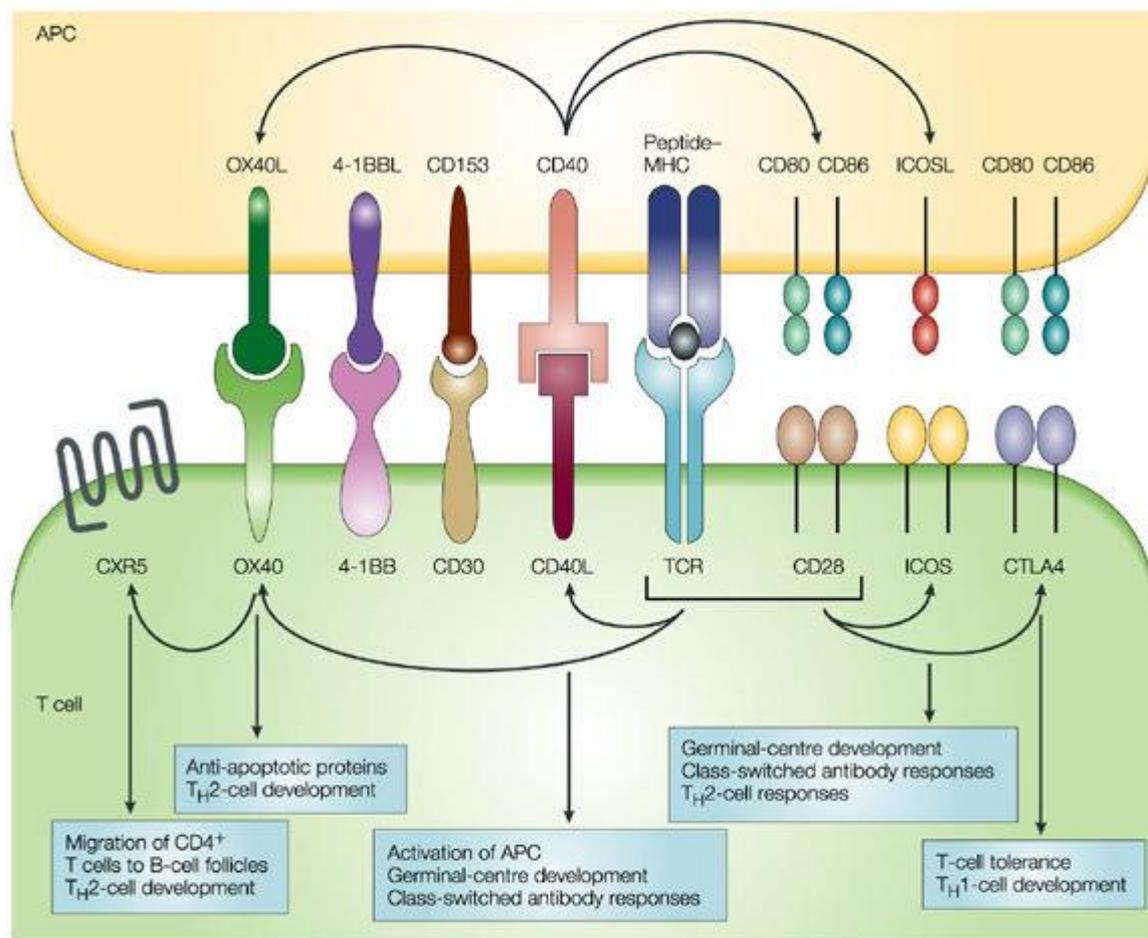


Figure 9 : La synapse immunologique (Acuto & Michel 2003)

1.2.2.2 La maturation des lymphocytes T

L'ontogénie des lymphocytes T correspond aux différentes étapes de leur maturation et à l'acquisition de la compétence de tolérance au soi. Schématiquement, on peut considérer que la maturation des lymphocytes T correspond à l'acquisition du TCR associé au complexe CD3 puis à la molécule CD4 ou à la molécule CD8. C'est également au cours de la maturation que les lymphocytes T sont sélectionnés au regard de la spécificité de leur TCR et que se fait l'acquisition de la tolérance au soi, processus indispensable au développement d'une immunité cellulaire compétente et sans danger direct contre l'organisme hôte.

1.2.2.2.1 Les organes lymphoïdes des lymphocytes T

Les organes lymphoïdes sont des tissus organisés contenant un grand nombre de lymphocytes T. Ils se divisent en organes lymphoïdes primaires ou centraux (moelle osseuse et thymus) et secondaires ou périphériques (rate, ganglions lymphatiques,...). La maturation des lymphocytes T se fait dans les organes lymphoïdes primaires, tandis que les réponses immunes spécifiques de ces lymphocytes sont initiées dans les organes lymphoïdes secondaires.

Les progéniteurs, ou pro-thymocytes, sont générés dans la moelle osseuse et vont gagner le thymus par la circulation sanguine. Les pro-thymocytes qui colonisent le thymus sont au stade "double négatif" (DN) : ils n'expriment pas encore de TCR ni les molécules CD4, CD8 ou CD3. Les pro-thymocytes dans le thymus vont subir différentes étapes de maturation et de différenciation, ce qui va permettre de sélectionner au final des lymphocytes T ayant une affinité optimale pour les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) tout en évitant de reconnaître tous les antigènes du soi (Starr *et al.* 2003) (**Figure 10**). Les cellules qui survivent à ce processus de sélection sont appelées cellules T matures naïves. Elles sont alors exportées vers la circulation sanguine avant d'aller coloniser les sites lymphoïdes secondaires où elles pourront interagir avec des antigènes étrangers qui leurs seront présentés par des CPA (Reiner 2007 ; Cui & Kaech. 2010 ; Zhu *et al.* 2010).

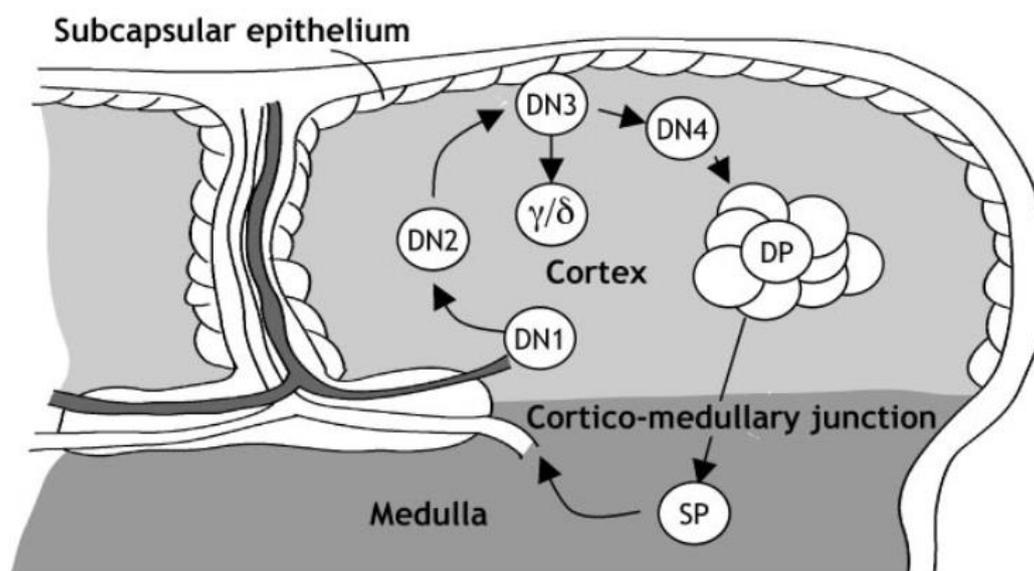


Figure 10 : Maturation des thymocytes au sein du thymus (Starr *et al.* 2003)

1.2.2.2.2 Le choix du lignage

Le choix du lignage correspond à un réarrangement de gènes. Ainsi, 60% des lymphocytes T matures naïfs deviendront des lymphocytes T $\alpha\beta$ conventionnels (avec un TCR $\alpha\beta$) exprimant la molécule CD4 et/ou la molécule CD8 (MacDonald *et al.* 2001). Ce sont les gènes codant pour la chaîne β du TCR qui subissent en premier un réarrangement. A l'issue de ce réarrangement, la chaîne β est exprimée à la surface du lymphocyte T et est associée à une partie constante de la chaîne α . A ce stade, le TCR est incomplet. Si ce réarrangement est productif, le lymphocyte T reçoit un signal de survie et se met à proliférer. C'est alors au tour des gènes codant pour la chaîne α du TCR de subir des réarrangements. A l'issue de ces réarrangements, le TCR est constitué d'une chaîne α et d'une chaîne β , et associé à la molécule CD3 puis aux deux molécules CD4 et CD8 : c'est la double présence des marqueurs CD4 et CD8 qui caractérise les thymocytes appelés "doubles positifs" (DP). Les TCR qui sont alors constitués à la surface des lymphocytes T ont la capacité de reconnaître n'importe quel peptide du soi ou du non-soi en association avec n'importe quelle molécule du CMH (de classe I ou II, du soi ou du non soi). A ces processus de réarrangement des gènes de TCR vont alors succéder des mécanismes de "sélections" qui généreront des thymocytes capables d'identifier des peptides du non-soi présentés en association avec des molécules du CMH du soi.

Enfin, à côté des 60% de lymphocytes T $\alpha\beta$, 40% des lymphocytes n'exprimeront ni la molécule CD4, ni la molécule CD8, et constitueront les lymphocytes T $\gamma\delta$, ou lymphocytes T-NK (NKT) c'est-à-dire exprimant des marqueurs de cellules NK (MacDonald *et al.* 2001).

1.2.2.2.3 Le principe de sélection du TCR

La grande diversité de reconnaissance des antigènes des lymphocytes T leur permet de réagir contre la majorité des agents pathogènes rencontrés tout au long de la vie d'un individu. Toutefois, cela peut également englober la possibilité de réagir contre des antigènes du soi ; c'est pourquoi le système immunitaire élimine, par un principe de sélection, les lymphocytes réagissant trop fortement à la présentation d'antigènes du soi au cours de leur maturation. Les lymphocytes sélectionnés positivement reconnaissent le CMH et permettent la défense contre les antigènes reconnus, tandis que la sélection négative est essentielle pour éviter les réactions auto-immunitaires, c'est-à-dire dirigées contre des antigènes du soi (Starr *et al.* 2003) (**Figure 11**).

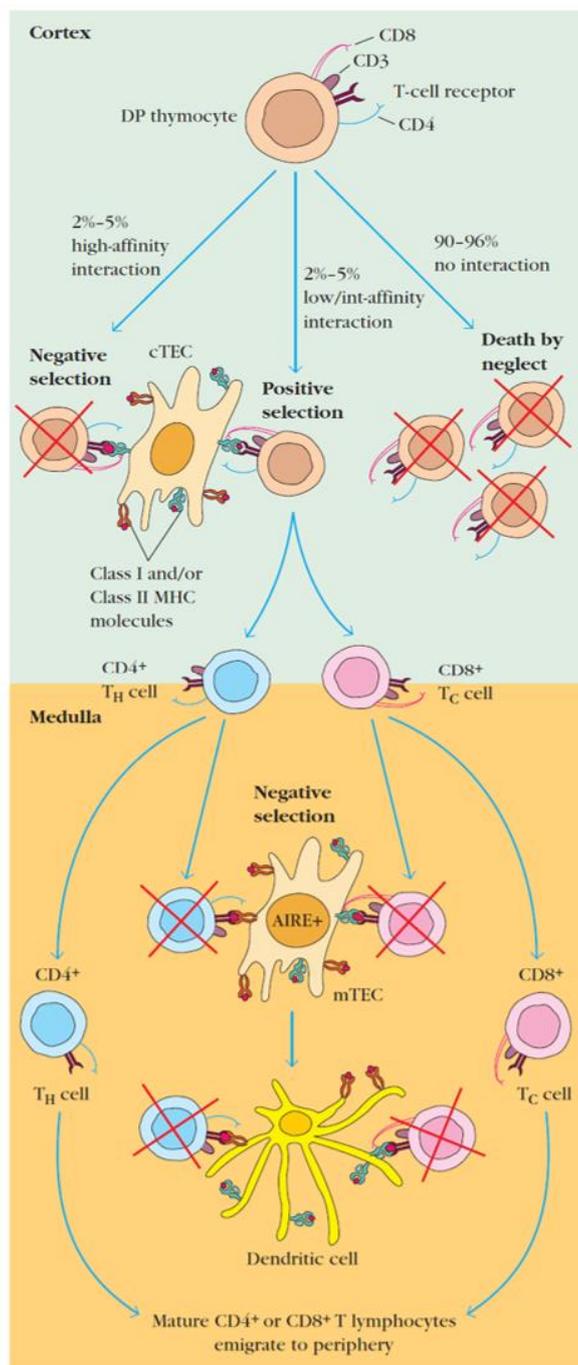


Figure 11 : Les sélections positive et négative des thymocytes (Owen *et al.* 2013)

1.2.2.2.3.1 La sélection positive

La sélection positive se déroule dans la partie corticale du thymus, et permet la survie des thymocytes qui possèdent une bonne affinité de liaison avec les molécules de CMH de classe I et de classe II exprimées à la surface des cellules épithéliales du cortex thymique en présence d'un peptide du soi. Seuls les thymocytes qui se lient aux CMH survivront et

continueront la sélection, les autres mourront par apoptose dans les jours suivants la sélection (environ 95% des thymocytes ne survivront pas) (Starr *et al.* 2003). A ce stade, les thymocytes qui sont CD4⁺ et CD8⁺ sont des lymphocytes "doubles positifs". Toutefois, l'une des deux molécules, CD4 ou CD8, est toujours plus exprimée que l'autre molécule à la surface du thymocyte, et ceci procure à la cellule une plus forte affinité pour la classe de CMH en relation avec la molécule surexprimée. Ainsi, si la molécule CD8 est préférentiellement exprimée à la surface le thymocyte, cela confère au thymocyte une plus forte affinité pour interagir avec des molécules de classe I du CMH à la surface des CPA (Hogquist *et al.* 1993). Le gène codant pour la molécule CD8 sera activée ce qui permet d'orienter la cellule vers un lymphocyte T CD8⁺. Le mécanisme est le même pour les lymphocytes T CD4⁺. A ce stade, les thymocytes sont appelés simples positifs (SP) car ils n'expriment plus qu'exclusivement la molécule CD4 ou la molécule CD8, et ne reconnaissent qu'une seule classe de CMH. En revanche, les thymocytes reconnaissant les antigènes du soi ne sont pas éliminés. C'est la sélection négative, qui fait suite à la sélection positive, qui éliminera les thymocytes auto-réactifs dans la partie médullaire du thymus.

1.2.2.2.3.2 La sélection négative

A ce stade, les thymocytes simples positifs reconnaissent à la fois les molécules du soi et les molécules du non soi. C'est par la sélection négative au niveau de la médulla du thymus que sont éliminés les thymocytes qui interagissent fortement avec des molécules du CMH présentant un peptide du soi. Au sein de la médulla, différents types cellulaires sont capables d'exposer aux TCR des thymocytes les CMH (de classe I et II) qu'ils expriment à leur surface associés à un antigène du soi. Les affinités entre les TCR et les CMH peuvent varier de faible à fort et si les thymocytes réagissent fortement à la présentation d'antigènes issus du soi ils entrent alors en apoptose (Sebzda *et al.* 1999). Ainsi, seuls les thymocytes de faible affinité pour un antigène du soi peuvent survivre.

A l'issue de ces deux sélections, les lymphocytes T sont de petites tailles et en état de repos. Ils se retrouvent dans le système immunitaire périphérique et migrent dans les organes lymphoïdes secondaires où ils pourront effectuer leur tâche de reconnaissance des antigènes étrangers.

1.2.2.3 Les phases de la réponse des lymphocytes T

1.2.2.3.1 La phase de primo-infection

La phase de rencontre d'un lymphocyte T naïf avec un nouvel antigène se fait dans les tissus lymphoïdes. C'est dans ces tissus que se retrouvent concentrées les cellules T naïves en attente de la présentation d'antigènes étrangers par des CPA. Après présentation et reconnaissance d'un antigène étranger, les lymphocytes T prolifèrent puis ils se différencient en cellules effectrices (Sprent & Surh 2002 ; Harty & Badovinac 2008).

1.2.2.3.2 La phase d'expansion clonale

La prolifération induite par l'IL-2 des lymphocytes T activés entraîne une expansion des clones spécifiques de l'antigène. L'amplitude de cette expansion est plus importante pour les lymphocytes T CD8⁺ qu'elle ne l'est pour les lymphocytes T CD4⁺ avec un facteur de proportionnalité de l'ordre de 100 à 1000 (Whitmire *et al.* 1999 ; Homann *et al.* 2001). Cette différence s'explique par le nombre important de lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques nécessaire pour éliminer un grand nombre de cellules cibles infectées par un agent pathogène. A l'opposé, un faible nombre de lymphocytes T CD4⁺ peut suffire pour sécréter les cytokines régulatrices de la réponse immunitaire adaptative.

1.2.2.3.3 La différenciation des cellules naïves en cellules effectrices

Les cellules filles issues des lymphocytes T qui prolifèrent après un contact antigénique se différencient en cellules effectrices de la réponse immune. Ce processus de différenciation est le résultat de changements dans l'expression des gènes codant pour des cytokines et leurs récepteurs (Huang *et al.* 2015). Les lymphocytes T effecteurs apparaissent dans un délai de 3 à 4 jours après l'exposition aux microorganismes. Ils quittent alors les organes lymphoïdes secondaires et se rendent sur le site de l'infection pour y détruire les agents pathogènes exprimant à leur surface les mêmes antigènes que ceux ayant servis à leur différenciation.

1.2.2.3.4 Le développement des lymphocytes T mémoires

Après le pic d'expansion cellulaire et la clairance de l'agent pathogène, 90 à 95% des cellules T issues de l'expansion clonale spécifique de l'agent pathogène entrent en apoptose (Kaech *et al.* 2002 ; Garrod *et al.* 2012). Les 5 à 10% de clones T restant se différencient en un pool de cellules T mémoires à longue vie, persistant à faible nombre mais doué d'un fort pouvoir prolifératif. Ces cellules T mémoires exercent une immunosurveillance constante dans le but de prévenir et de contrôler rapidement une réinfection (Wherry & Ahmed 2004 ; Bachman *et al.* 1999). En effet, les cellules T mémoires peuvent redevenir des cellules T effectrices lors d'un second contact avec l'antigène, et ont la particularité de s'activer beaucoup plus rapidement que les cellules naïves puisque ceci peut se faire en l'absence de molécules ou de cytokines de co-stimulation. La mise en jeu de ces cellules mémoires définit la notion de réponse immunitaire secondaire dont l'intensité et l'amplitude sont supérieures à celles de la réponse immunitaire primaire (Kaech *et al.* 2002). Ainsi, les lymphocytes T effecteurs circulants sont mobilisés en 24 à 48 heures au niveau du site inflammatoire et infectieux lors d'une réponse secondaire alors qu'il faut 3 à 4 jours pour obtenir le même effet lors d'une primo-infection. Afin de survivre en l'absence d'antigène, les cellules T mémoires peuvent continuer de se diviser, et ce sont les cytokines IL-7 et IL-15 qui sont essentielles à cette homéostasie (Schluns & Lefrançois 2003 ; Fry & Mackall 2005 ; Kim *et al.* 2008). Enfin, on distingue deux sous-populations principales de cellules T mémoires (Sallusto *et al.* 1999) : les cellules T mémoires centrales qui peuplent les organes lymphoïdes et qui sont responsables d'une expansion clonale rapide après un nouveau contact avec l'antigène, et les cellules T mémoires effectrices ou périphériques qui sont présentes dans les muqueuses et qui exerceront rapidement des fonctions effectrices lors de la réintroduction de l'antigène dans ces muqueuses.

1.2.2.3.5 Le déclin de la réponse immunitaire

Au cours de la réponse immune dirigée contre un agent pathogène, la survie et la prolifération des lymphocytes T sont soutenues par la présence de l'antigène, l'existence de signaux de co-stimulation, et la production d'IL-2. Lorsque l'agent infectieux est éliminé, ces facteurs de survie disparaissent, ce qui enclenche des mécanismes d'activation de l'apoptose et la mort des lymphocytes T proliférant : ce phénomène est appelé contraction de la réponse

immunitaire adaptative (Schluns & Lefrançois 2003). Toutefois, un pool de lymphocytes T mémoires à très longue durée de vie persiste (Kaech *et al.* 2002).

1.2.2.4 L'activation des lymphocytes T

1.2.2.4.1 L'activation des lymphocytes T CD4⁺

Le TCR et la molécule CD4 reconnaissent conjointement les antigènes peptidiques apprêtés et formant un complexe avec les molécules de CMH de classe II à la surface des CPA. Ces antigènes ne peuvent être qu'exogènes : ils sont donc issus de vacuoles intracellulaires générées à la suite de leur phagocytose, et liés à des molécules du CMH de classe II (**Figure 12**) (Bevan 1995 ; Banchereau & Steinman 1998 ; Watts & Powis 1999 ; Villadangos & Schnorrer 2007). Cette reconnaissance peptidique constitue le premier signal (signal de déclenchement) impliqué dans l'activation des lymphocytes T, les signaux secondaires étant apportés par les molécules d'adhésion et les molécules de co-stimulation mises en jeu au cours de l'interaction lymphocytes T/CPA. Afin de générer des signaux

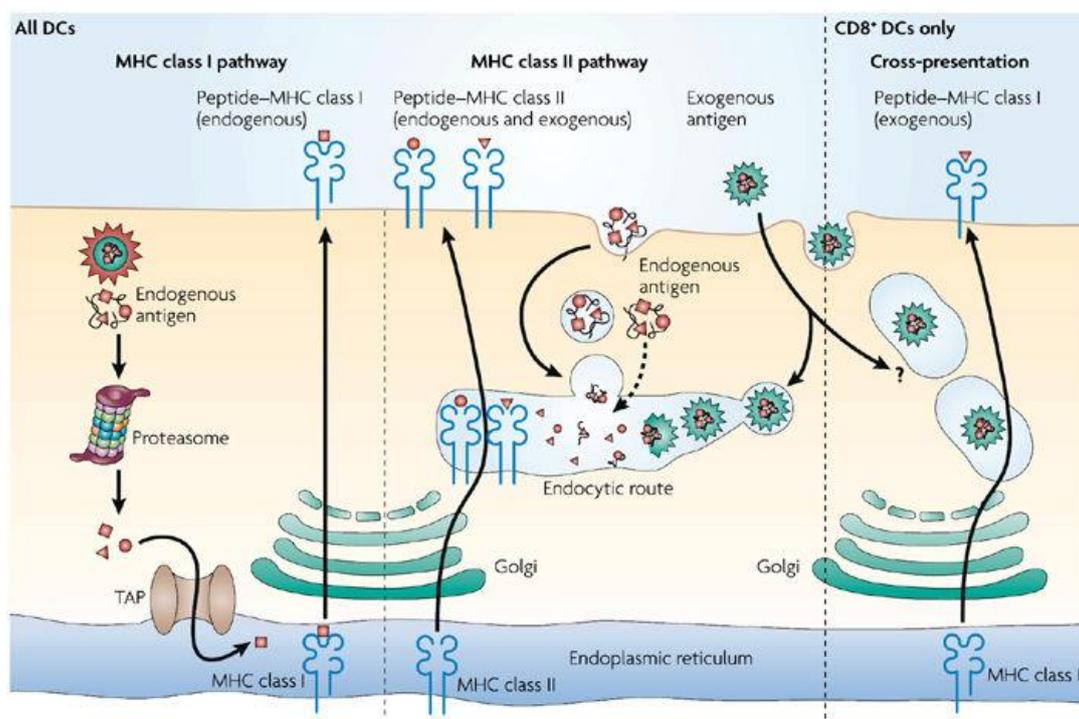


Figure 12 : Les mécanismes d'apprêtement des antigènes (Villadangos & Schnorrer 2007)

biochimiques suffisamment puissants pour induire une réponse activatrice, l'interaction entre les lymphocytes T et les CPA doit se faire pendant une période prolongée, au moins plusieurs minutes, ou à plusieurs reprises.

En réponse à l'antigène et aux signaux de co-stimulation, les lymphocytes T CD4⁺ sécrètent rapidement des cytokines et en particulier de l'IL-2, qui est produite dans un délai de 1 à 2 heures après l'activation, et qui stimule la prolifération des lymphocytes. Lorsque les lymphocytes T sont au repos, sur les trois chaînes (α , β et γ) constituant le récepteur à l'IL-2 (la molécule CD25), seules les chaînes β et γ sont exprimées. Après activation des lymphocytes, le gène codant pour la chaîne α est activé et le récepteur à l'IL-2 devient fonctionnel. Ceci permet à l'IL-2 sécrétée d'avoir une action autocrine sur le lymphocyte et de favoriser sa prolifération (Levine *et al.* 1995).

1.2.2.4.2 L'activation des lymphocytes T CD8⁺

Les cellules T CD8⁺ sont essentielles pour la protection contre les infections intracellulaires et les tumeurs, et sont activées uniquement par présentation de l'antigène spécifique couplé à une molécule du CMH de classe I par les CPA. A l'instar de l'activation des lymphocytes T CD4⁺, l'activation des lymphocytes T CD8⁺ nécessite des signaux de co-stimulation et en particulier ceux initiés par l'interaction d'une molécule B7 à la surface de la CPA avec la molécule CD28 à la surface du lymphocyte T CD8⁺ (Harding & Allison 1993).

En revanche, au contraire des cellules T CD4⁺ qui ne reconnaissent que des antigènes exclusivement exogènes issus de la phagocytose par les CPA et présentés par les molécules de CMH de classe II, l'origine des peptides couplés aux molécules de CMH de classe I et reconnus par les cellules T CD8⁺ peut être endogène ou exogène. Si pendant longtemps il a été suggéré que seuls les peptides générés endogéniquement dans le cytosol par la machinerie cellulaire infectée pouvaient être couplés au CMH de classe I (Bevan 1995 ; Rock & Goldberg 1999), on sait aujourd'hui que les CPA sont capables également de présenter des antigènes exogènes associés à des molécules du CMH de classe I même lorsque ceux-ci ne rejoignent pas le cytosol, c'est-à-dire qu'ils ne sont pas issus de l'infection directe de l'APC : c'est la cross-présentation (Banchereau & Steinman 1998 ; Rock & Shen 2005) (**Figure 12**). Ce cross-priming a souvent lieu après phagocytose d'une particule ou d'une cellule apoptotique (Kovacs-Bankowski *et al.* 1993) et est rendue possible par la communication entre la voie endosomale, responsable de l'internalisation de l'antigène

exogène, et le réticulum endoplasmique. Les macrophages et les DC sont tous les deux capables de cross-présenter, mais seules les DC peuvent activer les lymphocytes T CD8⁺ naïfs (Yewdell *et al.* 1999 ; Jung *et al.* 2002).

1.2.2.5 Les sous-populations de lymphocytes T CD4⁺

La fonction des lymphocytes T CD4⁺ activés, également appelés lymphocytes T helper (Th), est d'organiser la réponse inflammatoire pour que celle-ci soit rapide et efficace. C'est par la sécrétion de différentes cytokines que les lymphocytes Th assurent cette fonction. Or, il existe une multitude de cytokines, avec des rôles différents, pouvant être complémentaires ou antagonistes. En général, les lymphocytes Th sécrètent plusieurs cytokines en même temps, et c'est cette combinaison particulière (appartenant le plus souvent à une même famille fonctionnelle) qui leur permet d'organiser la réponse inflammatoire en activant certains types de cellules effectrices ; c'est la reconnaissance de la nature de pathogène qui est primordiale pour orienter les Lymphocytes T vers le profil cytokinique approprié, et ce sont les cellules immunitaires en veille (les premières à prendre en charge le pathogène), qui remplissent cette fonction. En effet, les antigènes sont la signature du pathogène et ils sont reconnus par les cellules de l'immunité innée qui veillent, et qui sécrètent en réponse différents signaux paracrines dans l'environnement des lymphocytes T en cours d'activation. Ainsi, ce sont ces signaux paracrines qui sont déterminants dans l'orientation des lymphocytes T activés, car ils induisent des facteurs de transcription capables de prédisposer les cellules T à sécréter par la suite tel ou tel type de cytokine (Russ *et al.* 2013 ; Raphael *et al.* 2015). Il existe ainsi différentes sous-populations de lymphocytes Th (Th1, Th2, Th17, Treg, Th9, Tfh) qui sont classées en fonction des cytokines qui les ont induites et en fonction des cytokines et des facteurs de transcription qu'elles expriment (**Figure 13**).

1.2.2.5.1 Les lymphocytes Th1 et les lymphocytes Th2

Les lymphocytes T CD4⁺ naïfs expriment constitutivement les récepteurs de l'IFN- γ et de l'IL-4, mais pas ceux de l'IL-12. Au moment de l'interaction des lymphocytes T CD4⁺ naïfs (également appelés lymphocytes Th0) avec les CPA, le récepteur à l'IL-12 (IL-12R) apparaît à la surface du lymphocyte et le niveau d'expression du récepteur à l'IL-4 (IL-4R) est

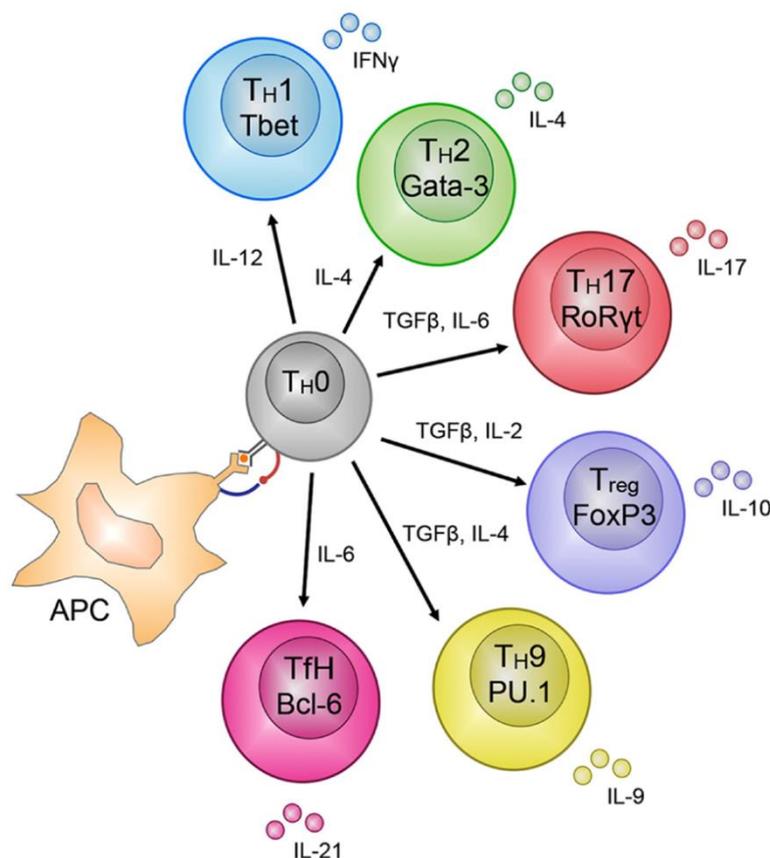


Figure 13 : Les différentes sous-populations de lymphocytes Th (Russ *et al.* 2013)

augmenté. C'est l'activation préférentielle de l'un ou l'autre de ces deux types de récepteurs qui oriente les lymphocytes Th0 vers des lymphocytes Th1 ou vers des lymphocytes Th2.

Les lymphocytes Th1 sont induits par l'IL-12 et l'IFN- γ produites par les cellules dendritiques, les macrophages et les cellules NK (**Figure 14**), et ces deux cytokines favorisent l'expression du facteur de transcription "T-box expressed in T cells" (T-bet) chez les lymphocytes. Une fois orientées, les cellules Th-1 stimulent l'ingestion et la lyse des microorganismes par les phagocytes, deux processus essentiels de l'immunité innée grâce à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ , le TNF- α et l'IL-2 (Raphael *et al.* 2015 ; Mosmann & Sad 1996). Ces cytokines sont impliquées dans la coopération entre les lymphocytes T activés et les précurseurs des lymphocytes T cytotoxiques (Yeo & Feron 2011), ainsi que dans l'activation des cellules NK (Ostensen & Førre 1988) (**Figure 15**).

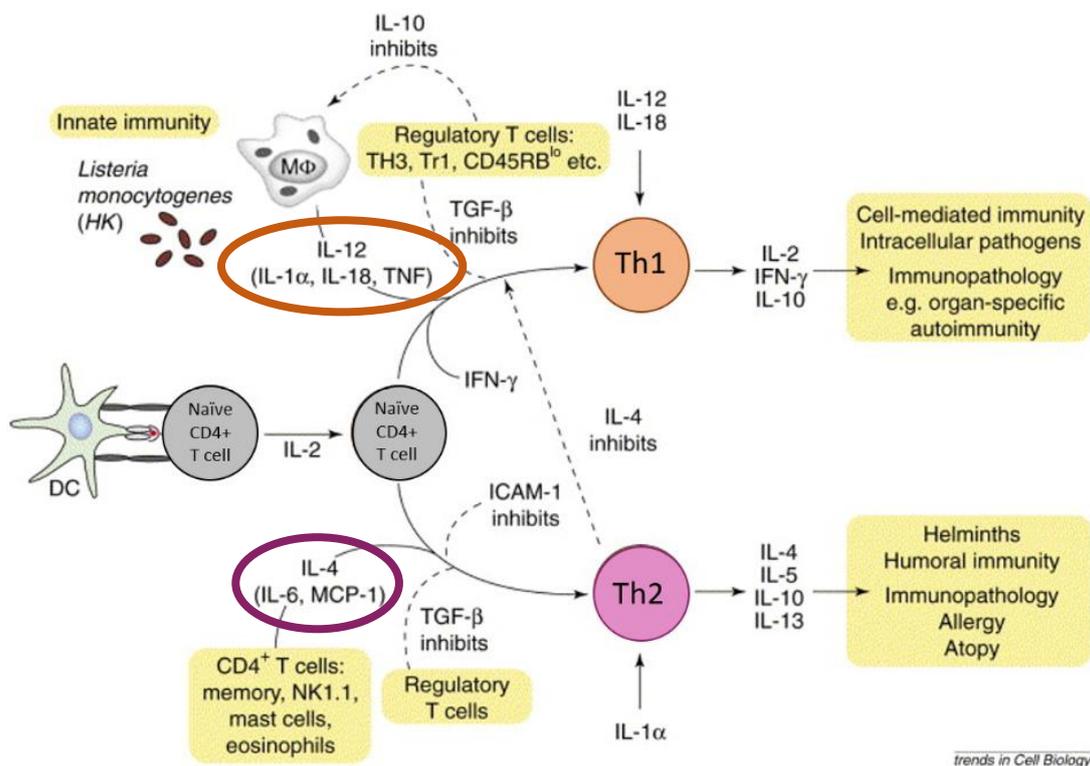


Figure 14 : La différenciation des cellules Th naïves en Th1 ou Th2

(d'après O'Garra & Arai 2000)

Les lymphocytes Th2 sont stimulés par la production d'IL-4, d'IL-5, d'IL-6, d'IL-10 et d'IL-13 qui active le facteur de transcription "GATA-binding protein-3" (GATA-3) (**Figure 14**). Les lymphocytes Th-2 activent les réponses des éosinophiles, des basophiles et des mastocytes au cours des réactions allergiques. En outre, l'autre nom de l'IL-4 est B cell stimulatory factor 1 (BSF-1) : elle agit donc comme facteur de survie des lymphocytes B, et est fortement impliquée dans le développement de la réponse humorale (Rabin *et al.* 1986 ; Simons & Zharhary 1989) (**Figure 15**).

1.2.2.5.2 Les lymphocytes Th17

Les lymphocytes Th17 sont induits par la présence, entre autre, des cytokines TGF-β, IL-6 et IL-23 dans leur environnement, et ces cytokines favorisent l'expression du facteur de transcription "Retinoid-related orphan receptor gamma t" (ROR-γt), et de l'IL-17A et IL-22. Les lymphocytes Th17 favorisent le recrutement des neutrophiles et des monocytes au site

inflammatoire et infectieux, et jouent un rôle dans l'induction des dommages tissulaires au cours de pathologies inflammatoires ou auto-immunes (Kolls & Lindén 2004 ; Kubawara *et al.* 2017).

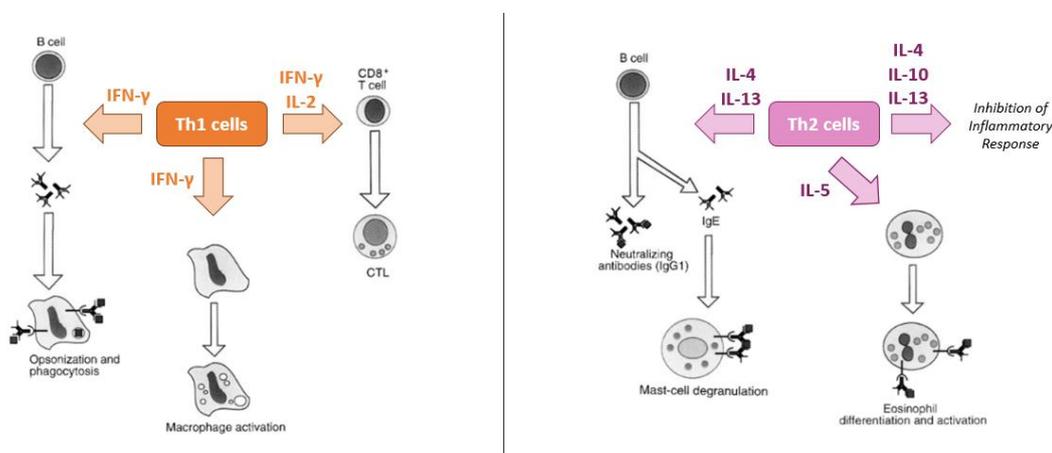


Figure 15 : Le rôle des Lymphocytes Th1 et Th2 dans l'immunité

(d'après Abbas *et al.* 1996)

1.2.2.6 Les sous-populations de lymphocytes T $CD8^+$

A l'image des différentes sous-populations de lymphocytes T helper ($CD4^+$) caractérisées par des signatures cytokinique et transcriptionnelle différentes, différentes sous-populations de lymphocytes T cytotoxiques ($CD8^+$) coexistent (**Figure 16**).

La sous-population de lymphocytes T $CD8^+$, la mieux caractérisée et la plus représentée physiologiquement, est appelée Tc1. Comme les cellules Th1, la différenciation des cellules T $CD8^+$ naïves en cellules effectrices Tc1 est favorisée par l'IFN- γ et l'IL-12 (Carter & Murphy 1999 ; Joshi *et al.* 2007 ; Kalia *et al.* 2010 ; Pipkin *et al.* 2010) et met en jeu le facteur de transcription T-bet (Glimcher *et al.* 2004). Les Tc1 représentent les lymphocytes T cytotoxiques classiques, c'est-à-dire ceux qui jouent un rôle clé dans la clairance des pathogènes intracellulaires. Ces cellules éliminent les cellules portant l'antigène cible en relargant des molécules cytotoxiques (granzymes et perforines), et en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ et TNF- α qui accélèrent la réponse immunitaire contre les pathogènes intracellulaires (Kaech & Cui 2012).

Les cellules Tc2 sont également le pendant des cellules Th2 sur le plan cytokinique, puisqu'elles sont induites par l'IL-4 et qu'elles produisent de l'IL-5 et de l'IL-13 (Croft *et al.* 1994) en mobilisant le facteur de transcription GATA-3. Cependant, leur niveau d'activation est plus faible que celui des lymphocytes Th2 (Croft *et al.* 1994, Omori *et al.* 2003). Les cellules Tc2 montrent ainsi une cytotoxicité le plus souvent amoindrie par rapport à celle exercée par les cellules Tc1 (Chrysofakis *et al.* 2004). Elles semblent également capables d'aider à la production d'immunoglobulines par les cellules B dans le cadre d'une réponse humorale (Maggi *et al.* 1994), mais là encore cette activité est moins importante que celle exercée par les cellules Th2 (Sad *et al.* 1997).

Les cellules Tc17, quant à elles, sont induites sous l'effet de l'IL-6 ou de l'IL-21 en présence de TGF- β (Hamada *et al.* 2009 ; Huber *et al.* 2009 ; Yen *et al.* 2009). Ces cellules expriment les cytokines IL-17A, IL-21 et IL-22 et mobilisent le facteur de transcription spécifique ROR γ t (Intlekofer *et al.* 2008). Les cellules Tc17 sont proches des cellules Tc1 tout en produisant moins d'IFN- γ , de granzymes et de perforines : elles sont donc également moins cytotoxiques (Huber *et al.* 2009). En revanche, il existe une forte plasticité entre Tc1 et Tc17 (Yen *et al.* 2009), et les Tc17 peuvent produire de l'IFN- γ en plus de l'IL-17A, sous l'influence d'IL-12 (Tajima *et al.* 2011 ; Xu *et al.* 2016).

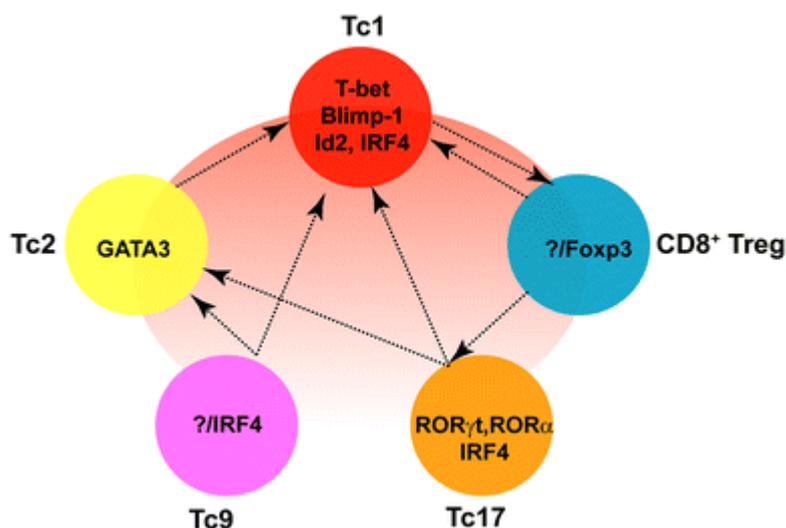


Figure 16 : Plasticité des différentes sous-populations de lymphocytes T CD8+ (Mittrücker 2014)

2. La Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive

2.1 Epidémiologie

La broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) est définie par la "Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease" (GOLD) comme une pathologie caractérisée par une diminution progressive et irréversible des capacités respiratoires associée à une réponse inflammatoire chronique anormalement élevée au niveau des voies respiratoires. La BPCO est devenue l'un des plus importants problèmes de santé publique dans le monde, et son impact sur la société progresse inexorablement à mesure que les années passent puisque, selon un rapport de l'OMS ([Pauwels et al. 2001](#)), elle est passée de la quatrième cause de mortalité dans le monde en 2000 à la troisième cause en 2010 ([Burney et al. 2015](#)).

La BPCO est une pathologie dont le diagnostic est difficile à établir. Elle peut se manifester de plusieurs façons, et avec une multitude de symptômes qui peuvent être présents ou non en fonction de différents critères tels que l'âge, l'état général du patient, l'état d'avancement de la maladie, la récurrence des infections. Toutefois, dans les pays disposant d'un système de santé efficace, le non diagnostic de la maladie est rare, ce qui n'est pas le cas dans la plupart des pays en voie de développement. Dans ces pays, de nombreux patients restent non-diagnostiqués et la BPCO est pratiquement absente des statistiques de mortalité ([Menezes et al. 2008](#) ; [Ko et al. 2008](#)). C'est la raison pour laquelle la BPCO a longtemps été considérée comme une maladie touchant essentiellement les pays développés. Le facteur étiologique principal de la BPCO est le tabagisme et plusieurs études montrent que 20% ([Tashkin et al. 1984](#)) et peut être même 50% ([Lundbäck et al. 2003](#)) des fumeurs développent une BPCO. Or, le tabagisme n'est pas un phénomène retreint aux pays riches puisque sur le milliard de fumeurs dans le monde, 80% d'entre eux vivent dans des pays en voie de développement ([Laniado-Laborín 2009](#)). Par ailleurs, on estime selon les études qu'entre 25% ([Lamprecht et al. 2011](#)) et 50% ([Eisner et al. 2010](#)) des cas de BPCO ne sont pas liés au tabagisme, et qu'environ 10 à 12% des malades n'ont jamais fumé ([Lamprecht et al. 2011](#)). Ainsi, d'autres facteurs tels que l'exposition à divers polluants (professionnels ou environnementaux), l'existence de maladies respiratoires ou chroniques antérieures, mais

également l'âge, la sédentarité, l'obésité, ou l'alcoolisme, peuvent altérer la fonction et la structure pulmonaire.

2.2 Définitions clinique et fonctionnelle

Lorsque l'on parle de BPCO, on fait référence à un ensemble de maladies respiratoires chroniques, lentement progressives, que l'on peut caractériser aux niveaux clinique et fonctionnel.

Les symptômes cliniques sont principalement une bronchite chronique, c'est-à-dire une toux régulière (surtout due à l'exposition au tabac, à l'hypersécrétion et à l'inflammation des voies aériennes), des expectorations (hypersécrétions muqueuses), ainsi qu'une dyspnée. Chronologiquement, la BPCO touche d'abord les grosses bronches, avec une diminution du nombre des cellules ciliées, une prolifération des cellules à mucus, et une hypertrophie des glandes séro-muqueuses : ce remodelage des voies aériennes supérieures est responsable de la toux et des expectorations. Puis dans un second temps, la maladie évolue et atteint les petites bronches conduisant à une sténose inflammatoire et à une obstruction centro-lobulaire (**Figure 17**) ; c'est à ce moment-là qu'apparaît la dyspnée. Ceci explique que la toux et les expectorations chroniques apparaissent plusieurs années avant la diminution des capacités respiratoires ; cependant, dans certains cas la dyspnée apparaît sans qu'il n'y ait eu de symptômes de bronchite chronique.

D'un point de vue fonctionnel, la BPCO est principalement caractérisée par une diminution du volume expiratoire maximal par seconde (VEMS, ou FEV₁ en anglais : Forced Expiratory Volume per second), et dans une moindre mesure par une augmentation de la capacité résiduelle fonctionnelle (CRF, définie comme le volume de gaz restant dans le poumon à la fin d'une expiration normale). Ces symptômes fonctionnels sont causés par une destruction progressive et irréversible du parenchyme pulmonaire qui aboutit à un élargissement anormal et permanent des espaces aériens définissant la notion d'emphysème (**Figure 17**).

Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD)

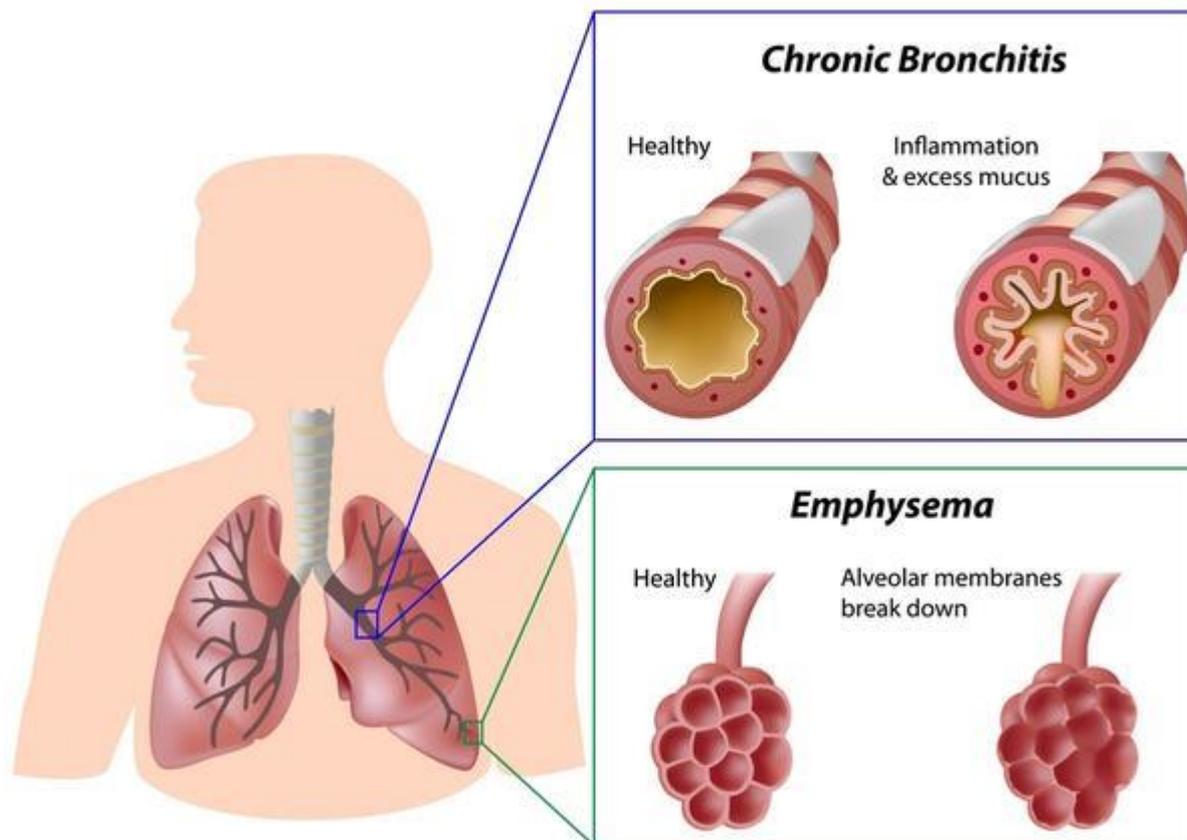


Figure 17 : Obstruction centro-lobulaire et emphyseme au cours de la BPCO

(Marieb *et al.* 2014)

2.3 Physiopathologie de la BPCO

La BPCO est caractérisée par un état inflammatoire chronique au niveau pulmonaire mais dont l'origine est systémique. L'inflammation des voies aériennes est la conséquence d'une infiltration massive du poumon par les cellules inflammatoires et immunitaires. La présence de cellules de l'immunité innée et adaptative dans le tissu pulmonaire des patients développant une BPCO a été observée depuis plusieurs années. Cette infiltration persiste des années après l'arrêt du tabac (Hogg *et al.* 2004). Cela suggère que chez des sujets prédisposés, la fumée de cigarette, qui active les cellules de l'immunité innée (cellules épithéliales,

macrophages alvéolaires, neutrophiles), stimule également les cellules de l'immunité adaptative (Lymphocytes T et B), induisant ainsi une inflammation pulmonaire chronique dont l'amplitude est corrélée avec la gravité de la maladie chez les patients BPCO et dont le développement permet de reproduire la pathologie dans les modèles animaux expérimentaux.

2.3.1 BPCO et immunité innée

2.3.1.1 Les cellules épithéliales

La fumée de cigarette cause des modifications de l'architecture de l'épithélium comme une métaplasie squameuse, c'est-à-dire un remplacement des cellules ciliées par des cellules squameuses normalement absentes, ainsi qu'une hyperplasie des cellules caliciformes avec surproduction de mucus et obstruction des voies aériennes (Auerbach *et al.* 1957). Ainsi, le nombre de cellules ciliées diminue, mais la taille et la fréquence des battements sont également diminuées, ce qui signifie que l'efficacité à éliminer les pathogènes est altérée (Leopold *et al.* 2009). L'hyperplasie des cellules caliciformes dans les petites voies aériennes est accompagnée par une diminution du nombre de cellules de Clara (ou cellules Club) responsables de la production de secretoglobine, de protéines du surfactant et d'autres facteurs de défense (Lumsden *et al.* 1984). La diminution de l'expression de récepteurs polymériques à l'immunoglobuline (composant sécrété qui transporte normalement l'immunoglobuline A vers le mucus pour sonder les pathogènes présents dans la lumière) corrèle avec le degré d'obstruction des voies aériennes chez les fumeurs BPCO (Pillette *et al.* 2001). De plus, l'activation du facteur NF- κ B est altérée par la fumée de cigarette (Manzel *et al.* 2011), ce qui contribue à la diminution de l'efficacité des défenses antimicrobiennes générées au niveau de l'épithélium et notamment la production d'IFN- γ en réponse aux infections virales. Enfin, la fumée de cigarette augmente la perméabilité de l'épithélium (Kennedy *et al.* 1984) en dérégulant la transcription des protéines nécessaires à l'intégrité des jonctions serrées (Shaykhiev *et al.* 2011 ; Heijink *et al.* 2012).

2.3.1.2 Les macrophages alvéolaires

Le nombre de macrophages alvéolaires augmente significativement dans les poumons de patients BPCO. En effet, dans le parenchyme pulmonaire, dans les lavages broncho-

alvéolaires (LBA), et dans les expectorations de patients atteints de BPCO, le nombre de macrophages retrouvés est multiplié par 25 chez les fumeurs BPCO comparé aux fumeurs non BPCO (Retamales *et al.* 2001). De plus, ils s'accumulent dans les zones de destruction emphysémateuse avec une corrélation entre leur nombre et le degré de sévérité de la maladie (Barnes 2004). Cette augmentation des macrophages alvéolaires est accompagnée d'une suppression de leurs fonctions défensives : les macrophages isolés de patients BPCO montrent une diminution de leur capacité à phagocyter spécifiquement des bactéries trouvées communément dans les poumons alors qu'ils sont capables de phagocyter normalement des billes de polystyrène *in vitro* (Taylor *et al.* 2010 ; Berenson *et al.* 2013).

En outre, les macrophages alvéolaires sécrètent de nombreux facteurs qui vont orchestrer la réponse inflammatoire au cours de la BPCO (**Figure 18**). Ainsi, ils sont responsables de l'attraction des neutrophiles (via CXCL8, CXCL1, et LTB4) et des monocytes

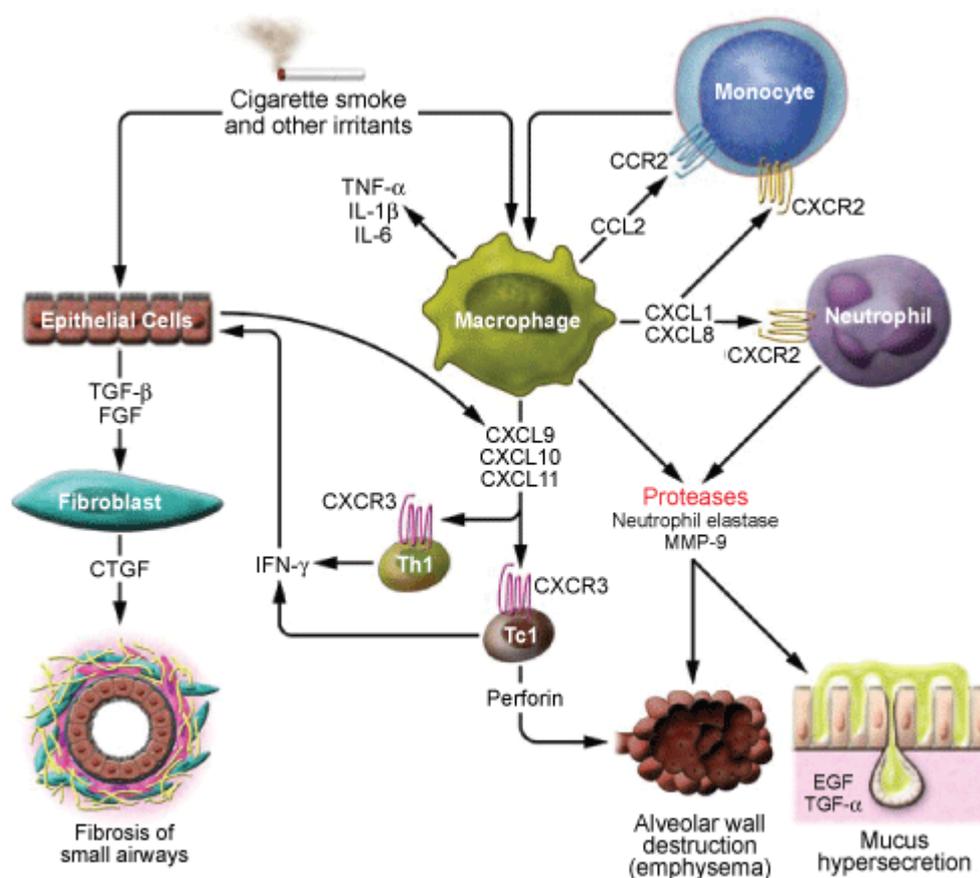


Figure 18 : Le rôle central des macrophages alvéolaires au cours de la BPCO

(d'après Belchamber & Donnelly 2017)

(via CCL2) au niveau du site inflammatoire. Ils activent également les lymphocytes Th1 et Tc1 (via CXCL10, CXCL11, et CXCL12) qui à leur tour vont sécréter de l'IFN- γ qui favorise la production, par les cellules épithéliales, de médiateurs fibroblastiques qui participent à la fibrose des petites voies aériennes. Ils sécrètent également des enzymes protéolytiques qui contribuent au développement de l'emphysème (Wallace *et al.* 2008 ; Ishii *et al.* 2014) et du TGF- β qui favorise l'hypersécrétion bronchique et la fibrose des petites voies aériennes (Chung 2001).

Sous l'effet de la fumée de cigarette, les macrophages alvéolaires subissent aussi une dérégulation de leur capacité d'efférocytose, c'est-à-dire de prise en charge des corps apoptotiques, et notamment ceux des neutrophiles (qui ont une durée de vie très courte après leur dégranulation lors d'une inflammation) (Richens *et al.* 2009). *In vitro*, l'administration de TNF- α , une cytokine pro-inflammatoire largement présente au cours de la BPCO, diminue le pouvoir efférocytotique des macrophages alvéolaires dans un modèle d'inflammation pulmonaire causé par le recrutement de neutrophiles induit par le LPS (Borges *et al.* 2009). Les corps apoptotiques qui ne sont pas pris en charge par les macrophages alvéolaires subissent une seconde nécrose, libérant davantage de composants pro-inflammatoires dans l'environnement proche, ce qui contribue à entretenir une l'inflammation chronique (Fadok *et al.* 2001), et parfois même à engendrer des phénomènes d'auto-immunité (Gaipl *et al.* 2006).

2.3.1.3 Les polynucléaires neutrophiles

A l'inverse des macrophages alvéolaires, les polynucléaires neutrophiles ne résident pas dans le tissu pulmonaire, mais ils peuvent rapidement migrer aux sites inflammatoires et infectieux grâce aux cytokines pro-inflammatoires et aux facteurs chimio-attractants produits par les cellules épithéliales et les macrophages alvéolaires. Une fois dans le parenchyme pulmonaire, les polynucléaires neutrophiles peuvent phagocyter les bactéries et sécréter des facteurs antimicrobiens et/ou des espèces radicalaires réactives de l'oxygène (ROS) capables d'inactiver les pathogènes et de maintenir l'intégrité de l'épithélium bronchique (**Figure 19**).

Dans les voies aériennes des patients BPCO, le tabagisme favorise la sécrétion de protéines chimio-attractantes par les cellules épithéliales et les macrophages alvéolaires résidents, ce qui majore le recrutement de polynucléaires neutrophiles (Barnes 2009). Peu d'études se sont intéressées aux capacités des neutrophiles à ingérer et tuer les bactéries au cours de la BPCO. Il existe toutefois quelques données qui ne sont pas en accord puisque

certaines montrent une altération (Fietta *et al.* 1988 ; Prieto *et al.* 2001) tandis que d'autres ne montrent aucune modification claire (Müns *et al.* 1995 ; McGovern *et al.* 2011) de la phagocytose *in vitro* des neutrophiles circulants issus de patients BPCO. En revanche, les extraits de fumée de cigarette diminuent la clairance de *Pseudomonas aeruginosa* par les neutrophiles dans un modèle murin d'infection (Drannik *et al.* 2004) et altèrent leur capacité de phagocytose *in vitro* (Stringer *et al.* 2007). Ceci conduit alors à des colonisations bactériennes récurrentes du parenchyme pulmonaire et à l'apparition des phases d'exacerbation de la BPCO (**Figure 19**).

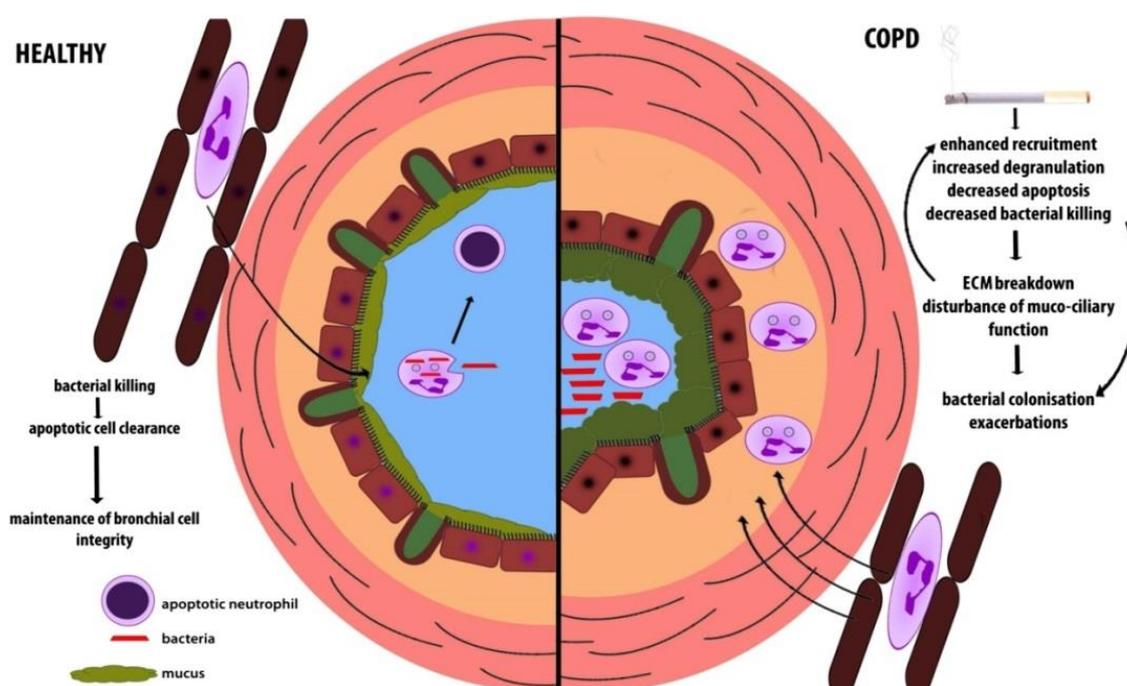


Figure 19 : Le rôle délétère des polynucléaires neutrophiles au cours de la BPCO
(Hoenderdos & Condliffe 2013)

2.3.1.3.1 Chimiotactisme des polynucléaires neutrophiles

L'IL-8 est l'un des plus puissants facteurs chimio-attractants des polynucléaires neutrophiles et son niveau de sécrétion dans les lavages broncho-alvéolaires (LBA) de patients BPCO est augmenté en comparaison avec celui dosé dans les LBA de sujets sains (Woolhouse *et al.* 2002 ; Drost *et al.* 2005). Ces niveaux augmentés corréleront avec le nombre

de polynucléaires neutrophiles présents et activés (avec une activité myéloperoxydase positive) dans les LBA (Nocker *et al.* 1996). Le degré d'obstruction des voies aériennes est corrélé au nombre de polynucléaires neutrophiles retrouvé dans les LBA (Yamamoto *et al.* 1997 ; Drost *et al.* 2005), dans les expectorations (Stănescu *et al.* 1996) et dans l'épithélium bronchique (Pilette *et al.* 2007). Par ailleurs, de nombreuses études indiquent que les propriétés chimiotactiques (sensibilité et vitesse de migration) des polynucléaires neutrophiles sont augmentées chez les patient BPCO (Burnett *et al.* 1987 ; Woolhouse *et al.* 2005 ; Milara *et al.* 2012).

2.3.1.3.2 Hypoxie et activité des polynucléaires neutrophiles

Au cours de la BPCO, l'hypoxie consécutive à l'hypersécrétion mucosale est mise en évidence par l'augmentation du facteur de transcription HIF-1 α (hypoxia-inducible factor) (Haugland *et al.* 2002). En effet, chez les patients BPCO, l'HIF-1 α est surexprimé par les cellules épithéliales bronchiques (Polosukhin *et al.* 2007) et est associé à des zones d'hyperplasie des cellules caliciformes (Polosukhin *et al.* 2011). L'hypoxie ne perturbe pas les capacités migratoires des polynucléaires neutrophiles en réponse à l'IL-8 ou au tripeptide N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) (McGovern *et al.* 2011), ni la capacité à phagocyter les agents pathogènes opsonisés. En revanche, l'hypoxie altère clairement les mécanismes de destruction des bactéries phagocytées par les polynucléaires neutrophiles en perturbant, en particulier, l'activité de la NADPH-oxydase intracellulaire (McGovern *et al.* 2011). Cette altération aboutit à la mort des cellules par nécrose et à la libération associée du contenu des granules sécrétoires (Naylor *et al.* 2007). En favorisant ce processus de dégranulation, l'hypoxie induit une augmentation de la sécrétion des protéases par les polynucléaires neutrophiles et en particulier de l'élastase leucocytaire (ou élastase du neutrophile) (McGovern *et al.* 2011).

2.3.1.3.3 Augmentation de la sécrétion de protéases

L'élastase du Neutrophile (NE) et la MMP-9, sont les deux principales protéases produites par les polynucléaires neutrophiles. Elles sont présentes à des taux élevés dans les expectorations de patients BPCO, et ceci de façon corrélée à la sévérité de la maladie (Paone *et al.* 2011). Par ailleurs, leur sécrétion est majorée au cours des épisodes d'exacerbation

(Ilumets *et al.* 2008). C'est principalement par l'intermédiaire de ces deux protéases que les polynucléaires neutrophiles occupent une place majeure dans le développement de la BPCO. En effet, ces deux protéases synthétisées par le polynucléaire neutrophile participent *i/* à la dégradation des fibres élastiques du poumon initiant la destruction emphysémateuse du tissu pulmonaire, *ii/* à l'hypersécrétion de mucus accompagnant les bronchites chroniques (Amitani *et al.* 1991), *iii/* à l'hyperplasie des cellules caliciformes et des glandes à mucus (Lucey *et al.* 1985) ce qui s'accompagne d'une augmentation de la production de mucus (Tosi *et al.* 1990) et d'une diminution du battement ciliaire (Smallman *et al.* 1984).

2.3.2 BPCO et immunité adaptative

Bien que l'immunité innée soit à l'origine de la sécrétion de la plupart des protéases qui orchestrent la destruction du parenchyme pulmonaire, les cellules T jouent également un rôle important dans l'amplification et le maintien du processus inflammatoire. Des études immuno-histochimiques réalisées sur des coupes de poumons ont montré que dans les voies aériennes et les alvéoles de patients BPCO, les cellules T sont les cellules immunitaires les plus abondantes (Saetta *et al.* 1998). Les modèles animaux d'emphysème démontrent également l'importance de la réponse lymphocytaire T dans le développement de la BPCO. Le potentiel délétère des lymphocytes T activés au niveau du poumon a été mis en évidence par une étude de transfert adoptif de lymphocytes T isolés de souris emphysémateuses qui se sont révélées capables de reconnaître les néo-antigènes exprimés par les cellules épithéliales alvéolaires de l'animal receveur (Enelow *et al.* 1998). Toutefois, la maladie ne se développe que si les deux sous-populations lymphocytaires T CD4⁺ et T CD8⁺ sont transférées en même temps (Eppert *et al.* 2013).

2.3.2.1 Lymphocytes T CD8⁺

La majorité des travaux étudiant le rôle des lymphocytes T CD8⁺ isolés de patients BPCO montrent que ces cellules jouent un rôle clé dans le développement et la progression de la maladie (Finkelstein *et al.* 1995 ; O'Shaughnessy *et al.* 1997 ; Di Stefano *et al.* 1998 ; Saetta *et al.* 1998 ; Majo *et al.* 2001 ; Hogg *et al.* 2004). Ainsi, sur l'ensemble des lymphocytes infiltrés dans les poumons de patients BPCO, les lymphocytes T CD8⁺ représentent le type cellulaire le plus largement identifié dans les voies aériennes et les

alvéoles (Saetta *et al.* 1998 ; Gadgil *et al.* 2006 ; Cosio *et al.* 2009). Par ailleurs, le nombre de lymphocytes T CD8⁺ présents dans les poumons de patients BPCO est directement proportionnel au degré d'obstruction des voies aériennes (Saetta *et al.* 1998).

Au cours de la pathologie, les cellules épithéliales et les macrophages alvéolaires sécrètent les chimiokines CXCL9, CXCL10 et CXCL12 qui activent les lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ respectivement en cellules Th1 et Tc1 via le récepteur CXCR3 exprimé à leur surface (**Figure 19**). Les lymphocytes Tc1 sécrètent des cytokines caractéristiques d'un profil Tc1, avec une augmentation de la production d'IFN- γ et de CXCL10 (Grumelli *et al.* 2004). Le pourcentage de lymphocytes T CD8⁺ circulants et sécrétant de l'IFN- γ est corrélé avec le stade d'avancement de la maladie (Gadgil *et al.* 2006). Ces cytokines de type Tc1 provoquent *in situ* la destruction du tissu pulmonaire par le biais, en particulier, de l'augmentation de la production de métalloprotéinases par les polynucléaires neutrophiles et les macrophages alvéolaires. Cependant, les lymphocytes T CD8⁺ activés (Tc1) peuvent également participer directement à la destruction du tissu pulmonaire par le biais de la libération d'enzymes protéolytiques telles que les perforines et les granzymes. Ces enzymes protéolytiques provoquent la mort des cellules épithéliales par apoptose ou nécrose et participent à l'installation du processus emphysémateux (**Figure 20**) (Monaco *et al.* 2004 ; Henkart 1994 ;

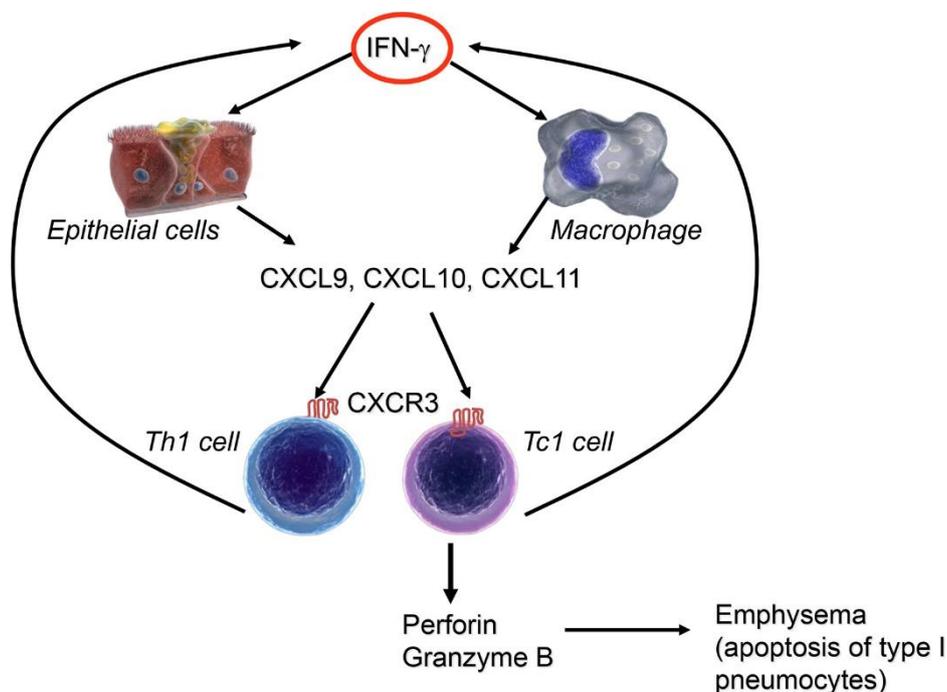


Figure 20 : Orientation Th1 et Tc1 au cours de la BPCO (Barnes 2016)

Kojima *et al.* 1994 ; Cosio *et al.* 2009 ; Urbanowicz *et al.* 2010).

Enfin, l'importance des cellules T CD8⁺ a été mise en évidence expérimentalement dans des modèles animaux. En effet le développement de la pathologie après le transfert adoptif de cellules T de souris qui ont développé une BPCO induite par la fumée de cigarette nécessite la présentation d'antigènes restreinte au CMH de classe I chez les animaux receveurs, puisque l'inactivation du gène de la β 2-microglobuline empêche le développement de l'emphysème (Eppert *et al.* 2013). De plus, il a été démontré que des souris invalidées pour la molécule CD8 ne développent pas d'emphysème après inhalation de la fumée de cigarette alors que, dans les mêmes conditions expérimentales, les souris sauvages, et celles invalidées pour la molécule de CD4, développent quant à elles la pathologie (Maeno *et al.* 2007).

2.3.2.1 Lymphocytes T CD4⁺

La contribution potentielle ou l'absence de contribution des lymphocytes T CD4⁺ dans la physiopathologie de la BPCO reste à démontrer précisément. En effet, bien que l'absence de la molécule CD4 semble non préjudiciable au développement de la maladie, (Maeno *et al.* 2007), il a été montré que certains lymphocytes T CD8⁺ issus d'animaux dont le gène codant pour la molécule CD4 est invalidé, ont la faculté de pouvoir répondre à la fois à des épitopes restreints au CMH de classe I et au CMH de classe II après leur sélection thymique (Tyznik *et al.* 2004). Ceci permettrait donc aux lymphocytes T CD8⁺ de suppléer l'absence de cellules T CD4⁺ dans les souris invalidées pour la molécule CD4, et expliquerait pourquoi les cellules CD4⁺ ne semblaient à priori pas importantes dans ce modèle d'inactivation de gène. La preuve de l'importance de la médiation des phénomènes liés aux cellules T CD4⁺ a été apportée par un modèle murin d'exposition de souris sauvages (c'est-à-dire sans inactivation de gène) à la fumée de cigarette, où l'inhibition sélective induite de l'une des deux populations T CD4⁺ ou CD8⁺ par des anticorps spécifiques neutralisant, ralenti à chaque fois l'élargissement des alvéoles et empêche tout recrutement des polynucléaires neutrophiles dans les alvéoles pulmonaires (Podolin *et al.* 2013). Ceci semble indiquer que les cellules T CD4⁺ ont une importance égale à celle des cellules T CD8⁺ dans le développement de l'emphysème. De plus, ces résultats sont équivalents à ceux retrouvés lorsque la totalité des cellules T est déplétée par la Cyclosporin A, ce qui signifie donc qu'aucun des deux types de cellules T ne peut se substituer à l'autre, et que leur présence simultanée est indispensable au développement de la BPCO (Podolin *et al.* 2013), confirmant ainsi les résultats de transfert adoptifs évoqués précédemment (Eppert *et al.* 2013).

Si les lymphocytes T CD8⁺ sont les cellules T primaires et effectrices favorisant le développement de la maladie, les lymphocytes T CD4⁺ sont toutefois indispensables pour perpétuer la réponse immune. En effet, les lymphocytes T CD4⁺ sont responsables de l'orchestration du processus immunitaire en aval par la libération de cytokines activatrices, et ils permettent la convergence et l'amplification de la réponse inflammatoire par les autres cellules effectrices immunitaires. Ainsi, l'activité des lymphocytes T CD4⁺ est essentielle au développement d'une réponse adaptative cytotoxique complète et à la survie à long terme des lymphocytes T CD8⁺ chez les fumeurs et au cours de la BPCO (Frasca *et al.* 1998). En effet, les lymphocytes T CD4⁺ issus des poumons de patients BPCO sont orientés vers un phénotype de type Th1, et par le biais des cytokines qu'ils produisent (en particulier l'IFN- γ) ils activent la production de protéases par les macrophages (Grumelli *et al.* 2004) et le recrutement des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques (**Figure 20**).

2.4 BPCO et phases d'exacerbations

Les exacerbations sont définies comme une majoration des symptômes respiratoires ou l'apparition d'un ou plusieurs symptômes de la maladie débutant de façon aiguë, durant plus de 48 heures et justifiant une modification thérapeutique (Rodriguez-Roisin 2000). Les principaux symptômes de l'exacerbation sont l'apparition ou la majoration d'une dyspnée, l'augmentation du volume de l'expectoration avec un épisode de toux soutenu (durant 24 à 48h), ainsi que la modification des expectorations qui deviennent "purulentes" du fait d'un recrutement massif de polynucléaires neutrophiles. La décompensation est définie comme une exacerbation susceptible de mettre en jeu le pronostic vital.

Les patients atteints de BPCO connaissent en moyenne deux épisodes d'exacerbation par an, et 10% de ces épisodes nécessitent une hospitalisation (Sullivan *et al.* 2000). La durée moyenne de la période d'exacerbation est de 7 jours, mais les patients ne recouvrent leurs fonctions pulmonaires maximales qu'après plusieurs mois (Bach *et al.* 2001). On estime que 70 à 80% des exacerbations sont d'origine virale ou bactérienne (Sethi & Murphy 2008). Les 20 à 30% restants sont liés à une exposition à des polluants environnementaux ou d'origine inconnue (Sapey & Stockley 2006).

2.4.1 Exacerbations infectieuses

Ce sont les infections bactériennes qui sont responsables de la majorité des épisodes d'exacerbation. *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenza*, et *Streptococcus pneumoniae* sont les micro-organismes les plus communément présents chez les patients BPCO stables (30% des patients sont chroniquement infectés par ces bactéries) (Patel *et al.* 2002), et majoritairement retrouvés pendant les phases d'exacerbation (chez 50% des patients) (Hirschmann 2000 ; Murphy *et al.* 2000 ; Papi *et al.* 2006). D'autres bactéries peuvent être également impliquées dans les phases d'exacerbation. C'est le cas de *Pseudomonas aeruginosa* et de *Staphylococcus aureus*. La majorité des épisodes d'exacerbation est due à des bactéries qui n'étaient pas présentes dans les poumons avant la phase d'exacerbation.

Les virus respiratoires sont également retrouvés de façon chronique dans la sphère pulmonaire de patients BPCO stables (10% d'entre eux). Ils sont responsables, chez 50% des patients BPCO ayant déjà eu un épisode d'exacerbation bactérienne, d'un nouvel épisode d'exacerbation (Sajjan 2013). Les rhinovirus sont les virus le plus communément détectés dans les voies respiratoires des patients BPCO exacerbés, devant les virus influenza et le virus respiratoire syncytial (VRS) (Wedzicha 2004).

Quelques micro-organismes atypiques tels que *Chlamydia spp* et *Mycoplasma pneumoniae* peuvent également être impliqués dans 5 à 15% des exacerbations (Lieberman *et al.* 2001 ; Meloni *et al.* 2004).

2.4.2 Exacerbations non infectieuses

Plusieurs données épidémiologiques ont permis d'associer les symptômes respiratoires, consécutifs à un épisode d'exacerbation de la BPCO, avec des épisodes de pollution atmosphériques aux particules fines de moins de 10 µm de diamètre, au monoxyde de carbone, aux oxydes nitriques, aux sulfures de dioxyde, ou à l'ozone (Fusco *et al.* 2001 ; Atkinson *et al.* 2001 ; MacNee & Donaldson 2000). Cependant, 30% des exacerbations n'ont pas de cause bien établie. Ainsi, la constatation d'une insuffisance cardiaque gauche chez 25 à 30% des patients BPCO ayant fait un épisode d'exacerbation (Abroug *et al.* 2006) a amené à suggérer que les dysfonctionnements cardiaques pouvaient également être une cause d'exacerbation de la maladie.

2.5 Genèse de la BPCO

Les mécanismes à l'origine de la BPCO participent d'un processus complexe qui n'est pas encore totalement élucidé. Plusieurs données de la littérature montrent que pour un faible pourcentage de patients (environ 2%), la BPCO peut s'expliquer en partie par un facteur génétique (Sampsonas *et al.* 2006). Ces patients ont une déficience en synthèse d' α 1-antitrypsine ce qui conduit à une activation constante de certaines sérines protéases et en particulier de la NE. Ceci est à l'origine d'une dégradation importante et incontrôlée de la MEC ce qui s'exprime au niveau du poumon par une détérioration intense du parenchyme pulmonaire (Sampsonas *et al.* 2006). Une autre hypothèse qui en découle suggère que l'origine de la BPCO se trouve dans un déséquilibre de la balance protéases/anti-protéases en faveur des protéases ce qui conduirait à une perte du contrôle de l'inflammation basale existant chez tous les fumeurs (Sampsonas *et al.* 2006 ; Antunes & Rocco 2011) (**Figure 21**). Ceci est soutenu par l'existence d'un modèle murin d'emphysème induit par instillation intranasale de NE (Janoff *et al.* 1977). Cependant, chez l'homme, le processus est très probablement plus complexe impliquant de nombreux facteurs incluant par exemple d'autres

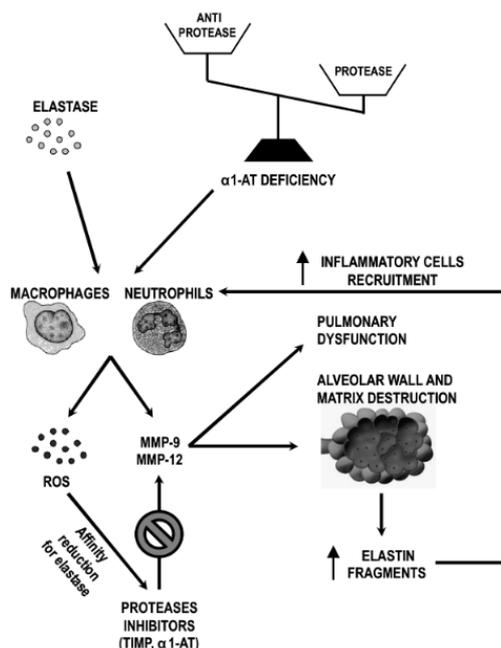


Figure 21 : Action de l'Elastase dans le poumon (Antunes & Rocco 2011)

protéases, des cytokines pro-inflammatoires, ou des radicaux libres, qui tous sont surexprimés chez les patients BPCO (Roth 2008). Enfin, une hypothèse plus récente implique les protéines de la MEC. Le processus inflammatoire initié de façon chronique par la prise quotidienne de tabac conduit à la genèse de protéases capables de dégrader différents composants de la matrice extracellulaire. Plus particulièrement, les protéases à activité élastinolytiques engendrent une intense dégradation des fibres élastiques dans le tissu pulmonaire. La forte dégradation de l'élastine génère la synthèse de peptides solubles d'élastine doués d'activités biologiques dont la principale est une puissante activité chimio-attractante vis-à-vis notamment des monocytes et des polynucléaires neutrophiles (Senior *et al.* 1980 ; Hinek *et al.* 1988). Ces propriétés chimio-attractantes majorent le recrutement des cellules inflammatoires et la synthèse de médiateurs de l'inflammation ce qui instaure une boucle d'auto-amplification du processus inflammatoire au niveau du tissu pulmonaire (**Figure 22**).

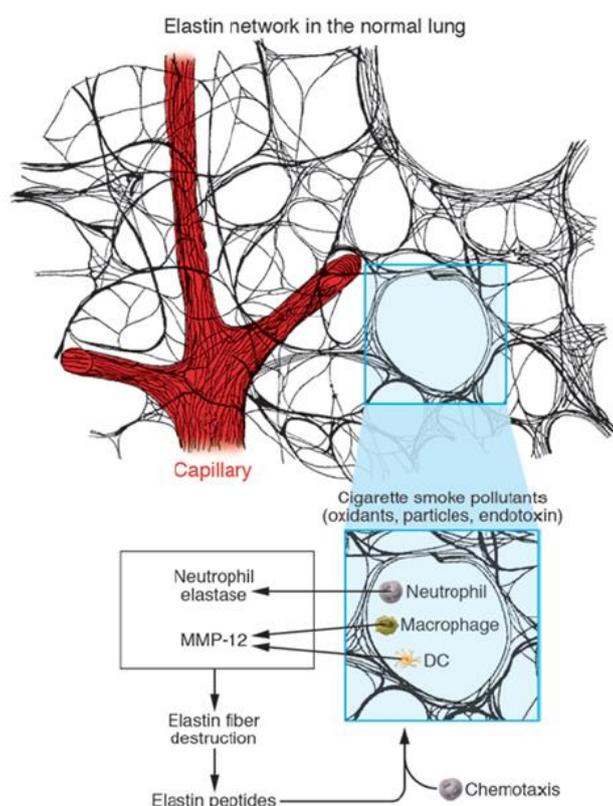


Figure 22 : Peptides d'élastine et BPCO (Taraseviciene-Stewart *et al.* 2005)

3. Elastine et peptides d'élastine (PE)

3.1 La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) désigne l'ensemble des macromolécules qui forment un enchevêtrement complexe, structuré et organisé, entourant les cellules des tissus conjonctifs. Le plus souvent, ces macromolécules sont synthétisées et sécrétées par des cellules spécialisées dans la production de cette matrice, comme par exemple les fibroblastes.

Les principales macromolécules de la MEC sont des polysaccharides (glycosaminoglycanes fixés à des protéoglycanes) et des protéines fibreuses, qui peuvent être de structure (collagène et élastine) ou d'adhérence (fibronectine et laminine).

Les macromolécules de la MEC possèdent de nombreux domaines d'interaction avec les récepteurs des cellules environnantes, jouant ainsi un rôle important dans les interactions cellule-MEC ; c'est ce type d'interaction qui permet aux deux parties de communiquer bilatéralement. En effet, les cellules, après avoir sécrété la MEC, peuvent la façonner, et celle-ci va en échange jouer un rôle dans le soutien structural, l'adhérence, le mouvement, et la régulation des cellules environnantes ; tout cela est nécessaire à la formation et au maintien du tissu conjonctif sain et fonctionnel.

3.2 Les fibres élastiques

3.2.1 Généralités

Les organes et les tissus élastiques, tels que les vaisseaux sanguins, la peau, ou les poumons, sont soumis à de fortes contraintes mécaniques, et ils doivent avoir la capacité à être étirés sans être déchirés et à recouvrer leur forme initiale après la fin de l'étirement afin de pouvoir fonctionner correctement. La réponse à ces contraintes est apportée par un réseau de fibres élastiques qui compose la matrice extracellulaire de ces tissus, et cette organisation leur permet de se déformer et de recouvrer leur forme initiale passivement, sans dépenser d'énergie (Bedell-Hogan *et al.* 1993). La protéine qui assure les propriétés élastiques du tissu

et des fibres élastiques est l'élastine. L'élastine représente au sein des tissus élastiques une part parfois non négligeable de la masse sèche, comme par exemple dans la peau (moins de 1%), les poumons (de 3% à 7%), les vaisseaux sanguins (de 28% à 32%), et les ligaments (environ 75%) (Uitto 1979). Les fibres élastiques sont également composées de collagène, qui confère la solidité et la résistance aux tensions afin d'éviter le déchirement du tissu, et de nombreuses glycoprotéines, telles que la fibrilline ou encore la fibuline qui forment des microfibrilles et assurent la bonne organisation des fibres élastiques.

3.2.2 La biosynthèse de l'élastine

La séquence de l'élastine humaine est disponible sur UniProtKB à l'entrée P15502 (ELN_HUMAN). L'élastine humaine est une protéine hydrophobe, riche en proline et en glycine, mais qui ne contient pas d'hydroxylysine, ni d'hydroxyproline, et n'est pas glycosylée. Sa synthèse est assurée par les fibroblastes (Rosso *et al.* 2004). Au moment de leur sécrétion, chaque molécule du précurseur soluble, la tropoélastine, est associée à l'"Elastin Binding Protein" (EBP), une protéine chaperonne qui empêche son agrégation prématurée, et qui est aussi une sous-unité du complexe récepteur de l'élastine. Cette association avec l'EBP persiste jusqu'à ce que le complexe se trouve à proximité d'une fibre élastique en cours de construction. L'EBP se lie alors à des galactosides présents sur les microfibrilles de la fibre élastique en cours de formation afin d'être recyclée, entraînant la libération de la tropoélastine (Brown-Augsburger *et al.* 1996).

Sous l'effet de la lysyl oxydase, les résidus lysine en position $NH_{2-\epsilon}$ de la tropoélastine subissent une désamination oxydative créant des allysines. Un résidu allysine peut réagir par condensation soit avec un résidu lysine pour former un intermédiaire appelé lysinonorleucine, soit avec un autre résidu allysine pour former de l'allysine aldol (**Figure 23**). Ces deux nouveaux intermédiaires peuvent alors à nouveau se condenser pour former le premier type de réticulation tétravalente : la desmosine. La seconde réticulation tétravalente est formée après que l'allysine aldol se soit condensé avec une autre lysine pour former la merodesmosine, qui se condense elle-même avec une allysine pour former l'isodesmosine (**Figure 23**) (Partridge *et al.* 1964 ; Vrhovski & Weiss 1998).

Desmosine et isodesmosine permettent de relier de façon covalente les chaînes polypeptidiques de tropoélastine, ce qui est essentiel à l'intégrité structurale et fonctionnelle des fibres élastiques matures. Elles génèrent des liaisons croisées intra et inter-chaînes entre les molécules de tropoélastine. Il en résulte une polymérisation irréversible des monomères de tropoélastine rendant l'élastine insoluble (Debelle & Alix 1999). De plus, ces deux structures typiques de l'élastine sont des marqueurs de dégradation de l'élastine (Thomas *et al.* 1963 ; Gottlieb *et al.* 1996). En effet, lors d'une dégradation intense de l'élastine, elles sont retrouvées à des taux élevés dans différents liquides biologiques (sérum, urine, LBA,...), et elles peuvent ainsi servir de biomarqueurs d'une profonde altération des fibres élastiques, comme cela est le cas au cours de la BPCO (Luisetti *et al.* 2008).

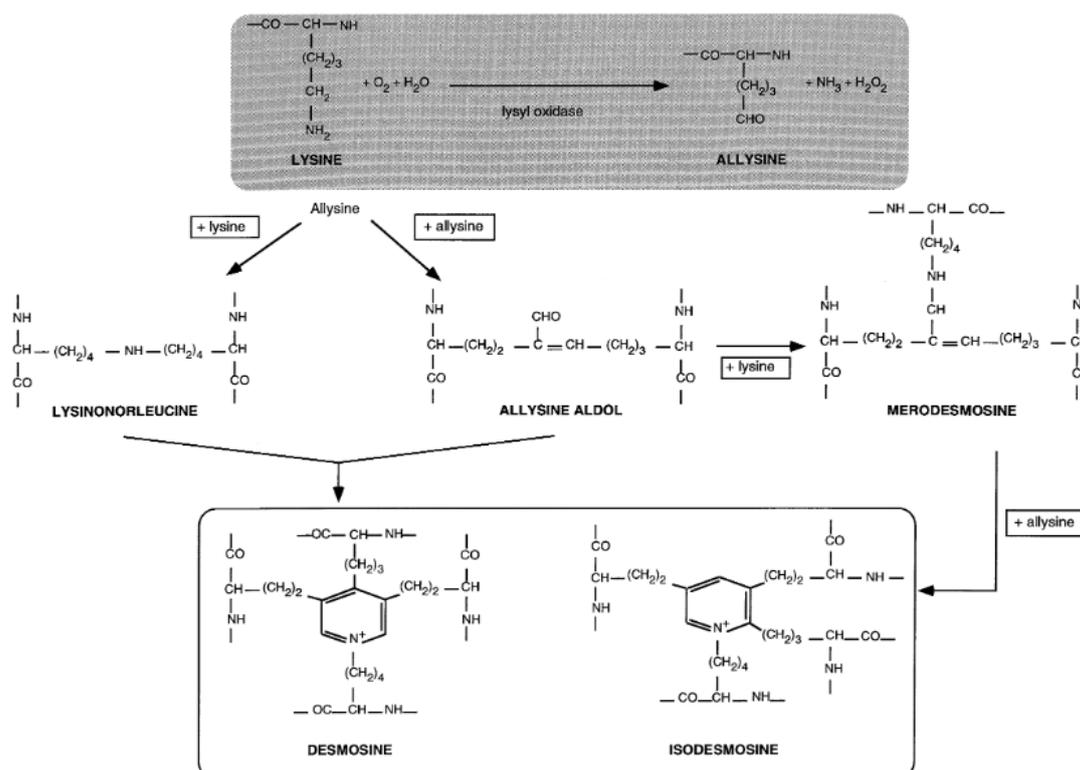


Figure 23 : Processus de réticulation de l'Elastine (Vrhovski & Weiss 1998)

3.3 Les peptides d'élastine (PE)

3.3.1 Les "Matrikines"

De nombreuses protéases sont capables d'hydrolyser les constituants de la MEC et de libérer des peptides. Certains de ces peptides, issus de la dégradation partielle de la MEC, sont capables d'interagir avec les cellules environnantes en se fixant sur des récepteurs qu'elles expriment à leur surface. Ceci est possible lorsque ces peptides contiennent les domaines spécifiques de fixation aux récepteurs cellulaires des protéines natives dont ils sont issus. Ils agissent alors sur les cellules cibles en déclenchant des réponses d'adhésion, de migration, de prolifération cellulaire ou d'apoptose (Kamoun *et al.* 1995 ; Peterszegi *et al.* 1999 ; Marneros & Olsen 2001). Ces peptides spécifiques, issus de la dégradation de la MEC et doués d'activités biologiques, sont appelés des "Matrikines" (Maquart *et al.* 1999). Toutefois, agissant dans un contexte différent de la relation physiologique cellules-MEC, utile à la cicatrisation ou la régénération tissulaire par exemple, les processus cellulaires déclenchés par les "Matrikines" peuvent être inadéquats et entraîner alors des processus pathologiques tels que la formation et l'entretien de tumeurs (Maquart *et al.* 2004 ; Duca *et al.* 2004), ou d'autres pathologies variées.

3.3.2 La genèse des peptides d'élastine

Grâce à ses liaisons croisées, l'élastine est une protéine très résistante physiquement, chimiquement, et mécaniquement, et sa demi-vie est estimée à 70 ans (Petersen *et al.* 2002). Couvrant alors presque entièrement la vie d'un Homme, elle est très peu dégradée en conditions physiologiques, sauf lors de grossesses, de cicatrisation/réparation tissulaire, et de vieillissement (Werb *et al.* 1982). En revanche, en conditions pathologiques comme lors de pathologies vasculaires (Fulop *et al.* 1990) ou de processus inflammatoires touchant des tissus riches en élastine (poumons, peau, artères) (Taggart *et al.* 2005), l'élastine est dégradée par des protéases à activité élastinolytiques ce qui génère des peptides solubles d'élastine. Les principales protéases à activité élastinolytiques sont issues de différentes familles. On distingue ainsi, i/ les sérines protéases (Elastase du neutrophile, Cathepsin G) (Stone *et al.* 1982), ii/ les Métallo-Protéases Matricielles (MMP) telles que la MMP-2 (gélatinase A), la

MMP-9 (gélatinase B) la MMP-7 (matrilysine), ou la MMP-12 (Elastase des macrophages) (Shapiro 1994), et iii/ la protéinase 3 (Antonicelli *et al.* 2007).

L'utilisation des peptides solubles d'élastine à des fins expérimentales a permis des avancées considérables dans la compréhension des mécanismes liés au vieillissement et au remodelage tissulaire. Le terme "peptides d'élastine" (PE) désigne indifféremment les peptides issus de la digestion enzymatique de l'élastine par les enzymes citées précédemment et ceux obtenus après hydrolyse chimique partielle, soit par l'acide oxalique générant des peptides appelés α -Elastine (Partridge *et al.* 1955) soit par l'hydroxyde de potassium générant des peptides appelés κ -Elastine (Jacob & Hornebeck 1985). Bien que ces hydrolyses partielles chimiques soient simples à mettre en œuvre, elles génèrent toutefois des mélanges de peptides qui ont des masses moléculaires variables et non contrôlées. Cependant, la κ -Elastine constitue un bon modèle capable de reproduire des effets biologiques identiques à ceux obtenus par l'action des protéases élastinolytiques *in vitro* (Brassart *et al.* 2001).

3.3.3 Le complexe récepteur de l'élastine (CRE)

L'élastine, la tropoélastine et les PE interagissent avec les cellules en se fixant sur un récepteur complexe, ou Complexe Récepteur à l'Elastine (CRE), présents à leur surface. Le CRE est composé de trois sous-unités : deux protéines transmembranaires, la "Protective

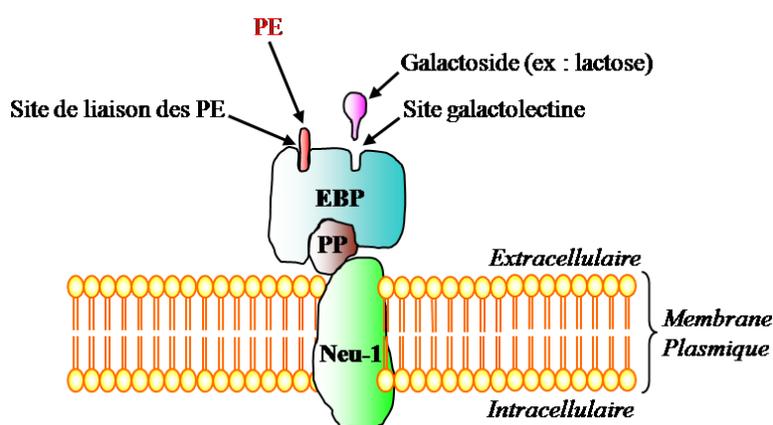


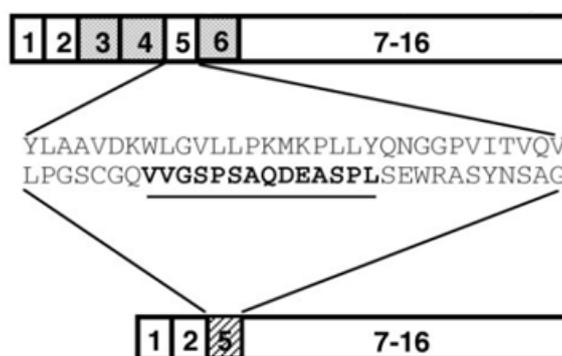
Figure 24 : Représentation schématique du complexe récepteur de l'élastine

(Robert 1997)

Protein Cathepsin A" (PPCA), de 55kDa, et la Neuraminidase-1 (Neu-1) de 61kDa, et une protéine périphérique, l'"Elastin Binding Protein" (EBP) de 67kDa (**Figure 24**).

L'EBP est un variant d'épissage alternatif de la β -galactosidase, protéine lysosomale ubiquitaire, mais est dépourvue de l'activité enzymatique galactosidase : ainsi, l'EBP est également appelé "Spliced-Galactosidase" ou S-Gal (*Hinek et al. 1988*). En effet, l'épissage alternatif de la β -galactosidase entraîne une délétion des exons 3,4 et 6, donc une disparition de l'activité enzymatique, mais également un décalage du cadre de lecture de l'exon 5 uniquement (car restauré à partir de l'exon 7) qui va engendrer la traduction d'une séquence unique dont 14 résidus aminés (VVGSPSAQDEASPL) correspondent à un site de fixation à l'élastine (*Privitera et al. 1998*) (**Figure 25**). C'est donc l'EBP qui, par l'intermédiaire de son site de fixation, peut reconnaître et fixer l'élastine, la tropoélastine ou les peptides issus de la dégradation partielle de l'Elastine. L'EBP reconnaît essentiellement la séquence peptidique consensus GXXPG (*Senior et al. 1984*), une séquence minimale répétée à plusieurs reprises dans la molécule d'élastine. L'EBP possède également un second site de fixation qui est destiné aux galactosides, appelé site Galactolectine (**Figure 24**). La fixation d'un sucre tel que le lactose sur le site Galactolectine a pour conséquence le changement conformationnel de la structure de l'EBP, ce qui diminue son affinité pour les deux autres protéines du CRE et entraîne sa dissociation du reste du complexe. C'est cette particularité du lactose qui le fait couramment utiliser comme un inhibiteur non compétitif des peptides d'élastine (*Privitera et al. 1998*).

ARNm codant pour le précurseur de l'enzyme β -Galactosidase



ARNm codant pour le variant épissé (S-gal)

Figure 25 : Epissage alternatif de la β -galactosidase (*Privitera et al. 1998*)

3.3.4 Propriétés biologiques des PE

Historiquement, la première activité biologique des PE à avoir été décrite est celle de leur capacité de chimio-attraction vis-à-vis des monocytes (Senior *et al.* 1980). Ces peptides qui font partie du groupe des "Matrikines" ont également été identifiés sous le terme d'"Elastokines" (Duca *et al.* 2004). Plus largement, les PE peuvent interagir avec une multitude de types cellulaires tels que les fibroblastes, les macrophages, les polynucléaires neutrophiles, les monocytes, les lymphocytes T ou encore les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales (Hinek *et al.* 1988). Les PE interagissent également avec de nombreuses cellules tumorales issues de fibrosarcomes, de carcinomes, de mélanomes, d'astrocytomes et de gliomes (Duca *et al.* 2004). Leur activité biologique varie en fonction du type cellulaire avec lequel ils interagissent (Rodgers & Weiss 2005) et la séquence minimale qui leur confère une activité biologique est la séquence GXXPG (Grosso & Scott 1993 ; Brassart *et al.* 2001). Cette séquence adopte une structure en coude β de type VIII qui leur permet une interaction efficace avec le CRE à la surface des cellules cibles (Senior *et al.* 1984). Chez l'Homme, le motif GXXPG est répété 18 fois dans la séquence de la tropoélastine et le peptide d'élastine Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly (VGVAPG) est à lui seul répété 6 fois de façon très condensée dans l'exon 24 du gène de la tropoélastine (Sandberg *et al.* 1981 ; Bellon *et al.* 2004) (**Figure 26**). Le peptide VGVAPG est le peptide d'élastine le plus étudié parmi l'ensemble des peptides d'élastine décrits pour leurs activités biologiques (Rodgers & Weiss 2005).

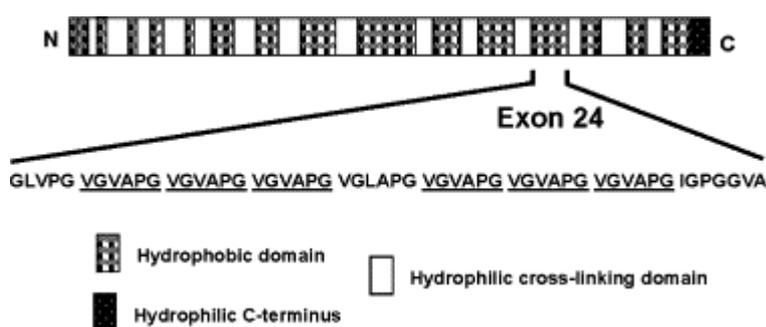


Figure 26 : Les séquences VGVAPG au sein de la Tropoélastine humaine
(Bellon *et al.* 2004)

3.3.4.1 Propriétés pro-angiogénique et pro-tumorale

De nombreuses données de la littérature démontrent le rôle significatif des interactions entre les cellules tumorales et les PE dans la progression tumorale. D'une manière générale, ce sont les tissus des organes riches en élastine qui sont les plus susceptibles de développer des cancers sur la base d'interactions entre les cellules tumorales et les PE. *In vivo*, la dégradation de l'élastine par des enzymes élastinolytiques sécrétées par les cellules stromales et tumorales conduit à la genèse de PE favorisant la progression tumorale. Le caractère pro-tumoral des PE est attribué à leur capacité à induire la sécrétion de protéases matricielles (notamment les MMPs) par les cellules tumorales et stromales (Maquart *et al.* 2005), et à activer les cellules endothéliales dans le cadre de l'angiogenèse tumorale (Tilmar *et al.* 1991 ; Lapis & Tilmar. 2002). Des expérimentations réalisées *in vitro* ont permis de montrer que le potentiel fortement invasif de cellules tumorales à travers un matrigel est augmenté en présence de κ -Elastine via une augmentation de l'expression de la MMP-2 (Hazgui *et al.* 2005). Ces données ont été confirmées dans le modèle du mélanome où les cellules tumorales augmentent le niveau d'expression de la MMP-2 active après stimulation par des PE (Ntayi *et al.* 2004). Dans les fibrosarcomes, les PE stimulent également l'expression de la pro-MMP-2 par les cellules HT-1080 issues d'un fibrosarcome humain (Brassart *et al.* 1998 ; Robinet *et al.* 2004). Par ailleurs, l'interaction peptide d'élastine VGVAPG/récepteur S-Gal à la surface de cellules issues de mélanomes a permis de révéler les propriétés pro-tumorales du peptide avec chimio-attraction des cellules tumorales et augmentation de leur pouvoir d'adhésion (via CD44, ICAM-1 et NCAM) (Pocza *et al.* 2008).

3.3.4.2 Régulation de la réponse inflammatoire

Au cours des pathologies inflammatoires, les cellules inflammatoires se retrouvent dans un milieu complexe constitué de nombreux facteurs solubles pouvant provenir à la fois d'un environnement exogène (agents microbiens) et d'un environnement endogène (peptide issus de la dégradation de la MEC). Dans un tel contexte, notre laboratoire a démontré que les PE diminuent, au niveau transcriptionnel et protéique, le niveau de production des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β et IL-6) induit par une activation des monocytes humains par le LPS. Cet effet est la conséquence de l'interaction des PE avec le récepteur S-gal exprimé à la surface des monocytes, interaction qui aboutit à la dérégulation de la voie de signalisation NF- κ B qui contrôle l'expression du TNF- α , de l'IL-1 β et de l'IL-6 (Baranek *et al.* 2007). Cet effet

inhibiteur n'est pas limité à une activation par le LPS puisque des effets identiques sont retrouvés dans un modèle de mélanome où un état d'inflammation est associé à un processus tumoral. Dans ce modèle, il a été mis en évidence le potentiel inhibiteur des PE sur la synthèse des cytokines pro-inflammatoires IL-8 et GRO- α (Debret *et al.* 2006).

3.3.4.3 Polarisation de la réponse T

La régulation de l'équilibre des cytokines pro- et anti-inflammatoires orchestrée par les profils Th-1, Th2 et Th17 des lymphocytes est primordiale aux communications cellules-cellules, à la mise en place de défenses efficaces contre les infections bactériennes, virales ou parasitaires et au contrôle du développement des pathologies inflammatoires chroniques. Dans un travail précédent, notre laboratoire a montré que la sous-unité S-Gal du CRE est exprimée à la surface des lymphocytes T humains circulants activés et/ou non activés (Debret *et al.* 2005). L'interaction des PE avec le récepteur S-Gal à la surface des lymphocytes T oriente la réponse lymphocytaire systémique vers une réponse de type Th1 avec une augmentation du niveau d'expression des cytokines IFN- γ et IL-2 (cytokines Th1) qui s'accompagne d'une diminution du niveau d'expression des cytokines IL-5 et IL-10 (cytokines Th2) (**Figure 27**). Les PE sont également capables d'inverser la polarisation de lymphocytes pré-orientés Th2 vers un profil de type Th1 (Debret *et al.* 2005) Au niveau moléculaire, l'interaction

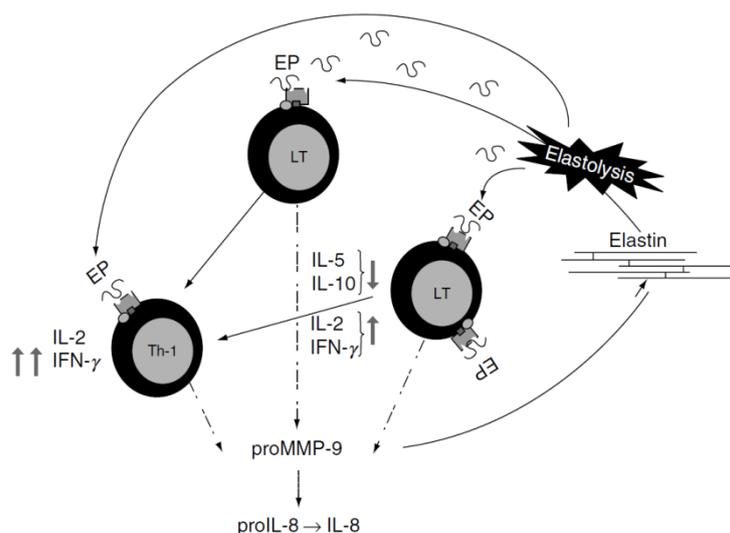


Figure 27 : PE et polarisation de la réponse T (Antonicelli *et al.* 2007)

PE/récepteur S-Gal à la surface des lymphocytes T permet l'activation des voies de signalisation Erk1/2 et AP-1 qui sont impliquées dans la synthèse d'IFN- γ et d'IL-2 et dans l'expression de pro-MMP-9 par les lymphocytes T (Schafer *et al.* 2003, Duca *et al.* 2002). La pro-MMP-9 va, à son tour, engendrer la destruction de la MEC et la genèse de nouveaux PE ce qui crée une boucle d'auto-amplification de la polarisation de la réponse T induite par les PE (**Figure 27**).

3.4 Peptides d'élastine et BPCO

La BPCO est caractérisée par une inflammation chronique du tractus respiratoire due à l'afflux massif de cellules inflammatoires au niveau du parenchyme pulmonaire. Les cellules inflammatoires infiltrées dans le parenchyme pulmonaire sécrètent de nombreuses protéases impliquées dans les lésions tissulaires (Owen 2005 ; Shifren & Mecham 2006) et dont certaines d'entre elles, du fait d'une activité élastinolytique, participent à la dégradation des fibres élastiques du poumon (Owen 2005 ; Lombard *et al.* 2006). La forte excrétion de desmosine, marqueur spécifique de la dégradation de l'élastine (Gottlieb *et al.* 1996), et les taux élevés de PE dans différents liquides biologiques (sang, LBA, expectorations), sont le reflet d'une dégradation intense de l'élastine pulmonaire chez les patients atteints de BPCO (Schriver *et al.* 1992 ; Betsuyaku *et al.* 1996). Par ailleurs, les taux élevés de desmosine dans les urines de patients BPCO ont été associés au degré de tabagisme, à l'âge des patients, à l'altération des paramètres fonctionnels du poumon, et à la sévérité de la maladie (Cocci *et al.* 2002 ; Lindbergh *et al.* 2012).

Au cours de l'emphysème humain, les fortes concentrations de PE dans les LBA corrélaient avec le niveau élevé d'élastase dans les mêmes fluides et avec la sévérité de la pathologie (Betsuyaku *et al.* 1996). Ces PE exercent un fort pouvoir chimio-attractant vis-à-vis des monocytes et des polynucléaires neutrophiles isolés de patients emphysemateux ou provenant d'un modèle expérimental d'emphysème murin (Hunninghake *et al.* 1981 ; Hance *et al.* 2002, Houghton *et al.* 2006). Par ailleurs, des anticorps circulants anti-élastine ont été retrouvés au cours de l'emphysème humain et dans le modèle murin emphysemateux (Lee *et al.* 2007 ; Brandsma *et al.* 2010). Le taux de ces anticorps corréla avec la sévérité de la maladie. Les PE ont également été décrits comme impliqués dans la régulation de la réponse Th/Th-17 au cours de la BPCO (Kheradmand *et al.* 2012). Par ailleurs, nous avons montré dans notre

laboratoire que les propriétés migratoires des PN de patients BPCO ainsi que leur capacité à synthétiser des cytokines pro-inflammatoires et à produire des dérivés actifs de l'oxygène sont réduites en présence de PE. Ceci est directement lié au niveau d'expression du récepteur de l'élastine à la surface des PN de patients BPCO qui est lui-même dépendant de la concentration de PE circulants dans l'environnement immédiat des PN. Ainsi, nous avons mis en évidence que la forte sécrétion en PE au cours des phases d'exacerbation dérégule fortement le niveau d'expression du récepteur de l'élastine à la surface des PN ce qui les rend moins susceptibles aux effets des PE (Dupont *et al.* 2013). Plus récemment, nous avons montré que l'instillation endotrachéale d'une dose unique du peptide VGVAPG induit, en 21 jours chez la souris, un emphysème caractérisé par une réponse inflammatoire pulmonaire importante, un élargissement des espaces alvéolaires et une destruction du parenchyme pulmonaire. Dans ce modèle, les PE sont directement responsables du recrutement accru des polynucléaires neutrophiles et des monocytes dans le tissu pulmonaire et de la production augmentée de protéases élastinolytiques telles que la MMP-2 et la MMP-9 (Sellami *et al.* 2015).

4. Le vieillissement cellulaire

4.1 Généralités

Pour la première fois dans l'Histoire, la tranche des personnes âgées constitue parmi la population globale mondiale celle qui a la plus forte courbe de croissance, et des projections indiquent qu'en 2025, la cohorte des personnes âgées de plus de 65 ans augmentera 3,5 fois plus rapidement que le nombre total d'humains (Oeppen & Vaupel 2002) ; ainsi, la proportion d'individus âgés de 60 ans ou plus passera de 10% en 2000 à 22% environ en 2050, soit 2 milliards d'individus au total (12 fois plus qu'en 1950) (United Nations Department of Economic and Social Affairs Population Division, 2013).

Toutefois, les personnes qui parviennent de nos jours à la fin de leur vie en bonne santé sont rares, et c'est pourquoi une forte augmentation des maladies séniles a inévitablement accompagné ce gain d'espérance de vie (Crimmins *et al.* 1994). L'âge représente ainsi le premier facteur de risque des maladies chroniques, cardiovasculaires et neuro-dégénératives, car il est responsable d'une diminution du potentiel de réparation et de régénération affectant quasiment tous des organes et tissus.

En effet, le vieillissement physiologique est un processus continu, complexe et multifactoriel, associés à des modulateurs génétiques, épigénétiques et environnementaux, provoquant de profonds changements physiologiques, cellulaires et moléculaires. Récemment, 9 caractéristiques liées au vieillissement ont été identifiées, réunis en 3 grands items interconnectés fonctionnellement (**Figure 28**) (Lopez-Otin *et al.* 2013) :

- Facteurs primaires (premiers facteurs responsables de la sénescence et des dommages cellulaires)
 - instabilité génomique
 - raccourcissement des télomères
 - altérations épigénétiques
 - perte d'homéostasie des protéines

- Mécanismes mis en place pour contrecarrer ou atténuer les dommages causés par les facteurs primaires, mais pouvant devenir délétères si chroniques ou exacerbés

- dérégulation de l'assimilation des nutriments
- disfonctionnement mitochondrial
- sénescence généralisée des cellules
- Conséquences des phénomènes précédents, responsables en définitive du déclin fonctionnel généralisé associé au vieillissement
 - épuisement des cellules souches
 - altération de la communication intercellulaire

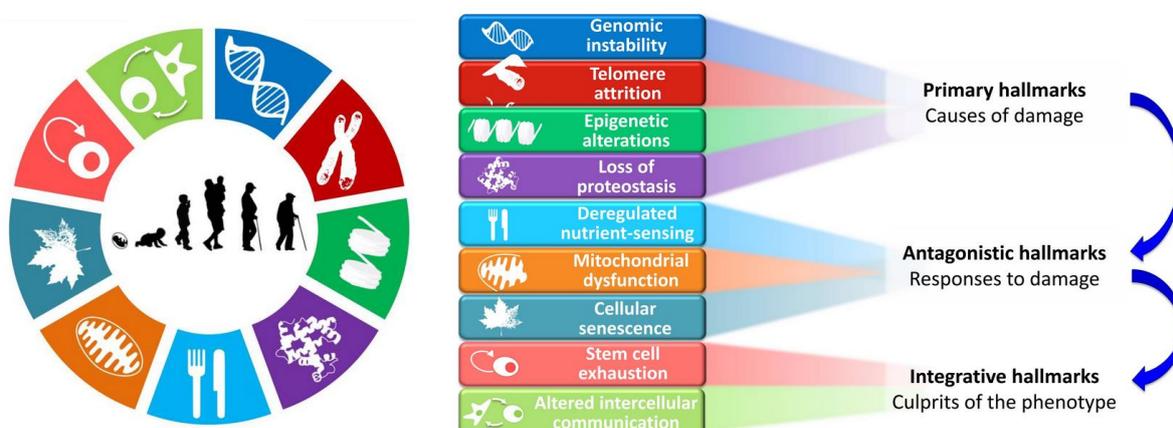


Figure 28 : Les principaux facteurs du vieillissement physiologique.

(Lopez-Otin *et al.* 2013)

4.2 La sénescence cellulaire

La première caractéristique qu'ont les cellules sénescents est leur perte de potentiel prolifératif. En effet, le ralentissement ou la disparition intrinsèque et prédéterminée de cette capacité est la cause majeure du vieillissement cellulaire. Ainsi, les cellules somatiques normales possèdent une limite intrinsèque les empêchant de se diviser indéfiniment : il s'agit de la limite de Hayflick (Hayflick & Moorhead 1961). Ce phénomène est défini comme la limite de la capacité des cellules somatiques à proliférer, résultant en un arrêt du cycle cellulaire, et donnant une population de cellules sénescents incapables de se renouveler bien

qu'encore parfaitement viables. Des expériences *in vitro* ont montré que des cellules saines mises en culture rentrent dans un état de sénescence répliquative au-delà de 50 divisions (Hayflick & Moorhead 1961). On sait aujourd'hui que cette sénescence décrite par Hayflick est causée notamment par le raccourcissement des télomères, qui sont la répétition d'une séquence hexamérique de nucléotides situés aux extrémités des chromosomes, après chaque réplication (Bodnar *et al.* 1998).

Il existe ainsi un concept selon lequel des cellules sénescents peuvent acquérir un phénotype sécrétoire associé à la sénescence (Senescence-Associated Secretory Phenotype - SASP) (Burton *et al.* 2014 ; van Deursen 2014). Ces dernières années, la caractérisation du sécrétome de ces cellules sénescents a mis en évidence des modifications de celui-ci lié au vieillissement. En effet, les SASP ont un profil sécrétoire différent des cellules juvéniles, permettant la diffusion de signaux paracrines pro-sénescents au travers du tissu via des jonctions serrées, ainsi que la libération de ROS (Nelson *et al.* 2012) ou de miRNA (Grillari & Grillari-Voglauer 2010), accompagnés quasi systématiquement d'altérations de la matrice extracellulaire (MEC) (Kuilman *et al.* 2010). Cela signifie que le vieillissement peut être induit et accéléré par des cellules elles-mêmes vieillissantes suite à la transmission de signaux pro-sénescents, de façon paracrine au sein d'un même tissu, mais également de façon généralisée via des sécrétions autocrines (Lavasani *et al.* 2012) : c'est le concept de « vieillissement métastatique ». Toutefois, les facteurs extrinsèques ou externes tels que le stress oxydatif sont aussi responsables de la sénescence des cellules.

4.3 Vieillessement et fonctions pulmonaires

Le poumon humain acquiert son maximum de fonctionnement et de maturation à l'âge de 20-25 ans (Thurlbeck & Angus 1975), puis la fonction pulmonaire, mesurée par la FEV (forced expiratory volume, ou VEMS en français : volume expiratoire maximal par seconde), décline progressivement même en l'absence de maladie à la vitesse de 1% par an (Fletcher & Peto 1977 ; Janssens *et al.* 1999 ; Sharma *et al.* 2009). A mesure que la fonction décline, les poumons subissent de multiples changements liés à l'âge, incluant une réduction de la force des muscles respiratoires, une augmentation chronique de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, and TNF- α), une réponse immunitaire globalement réduite (Ito *et al.* 2009 ; Lowery *et al.* 2013) et des altérations de la MEC (collagène et élastine) (Fletcher *et al.* 1977 ; Janssens *et al.* 1999 ; Sharma *et al.* 2009). Le déclin de la fonction pulmonaire

s'accompagne d'altérations structurales telles qu'un élargissement des alvéoles pulmonaires, une diminution de la surface des échanges gazeux, une augmentation du volume résiduel des poumons (Thurlbeck & Angus 1975 ; Gillooly & Lamb 1993) et une diminution de l'élasticité statique passive de l'élastine (Turner *et al.* 1968) souvent accompagnée par des altérations dans la compliance (Janssens *et al.* 1999 ; Sharma *et al.* 2009).

4.4 Elastine et vieillissement

L'âge est également responsable de la fragmentation irréversible et naturelle des fibres d'élastine dans le poumon (Janssens *et al.* 1999 ; Teramoto & Ishill 2007), semblable à celle qui se produit extemporanément dans la peau, ce qui a pour conséquence une perte d'élasticité et donc des plissements de la peau. Ces plissements de la peau, liés à la dégradation de l'élastine, sont augmentés par le tabagisme (Aizen & Gillar 2001) ; l'exposition à la fumée de cigarette produit alors quasi-systématiquement une élastolyse, aussi bien dans les poumons que dans la peau (Just *et al.* 2007), suggérant dès lors que le tabagisme accélère le processus de vieillissement des tissus élastiques (Bernhard *et al.* 2007).

Lindbergh *et al.* ont trouvé une corrélation positive entre l'âge et le niveau de desmosine (un marqueur de la dégradation de l'Elastine) dans les urines, et ceci indépendamment du sexe, du tabagisme et du développement de la BPCO (Lindbergh *et al.* 2012). Ceci est en accord avec le fait que l'élastolyse est un phénomène qui se produit naturellement au cours du vieillissement (Vrhovski & Weiss 1998), mais également avec le concept d'"emphysème sénile", un vieillissement physiologique du poumon lié à l'âge, associé à une dilatation des alvéoles, un élargissement des voies aériennes et une perte des tissus de soutien des voies aériennes périphériques (Janssens *et al.* 1999).

4.5 Immunosénescence et inflammaging

4.5.1 Définition de l'immunosénescence

La limite stricte du potentiel prolifératif, aussi appelée "sénescence répllicative", bien qu'étant bénéfique en tant que suppresseur de tumeur (Hayflick 1980), impacte évidemment de façon négative la fonction du système immunitaire puisque la faculté du système

immunitaire à agir plus ou moins rapidement est basée sur des cycles de division cellulaire rapides et soutenus, en particulier au cours de l'expansion clonale des Lymphocytes. La décroissance de l'efficacité du système immunitaire avec l'âge est caractérisée par des modifications sur les plans cellulaire et systémique incluant une altération qualitative de la réponse immunitaire. L'immuno-sénescence est associée à une augmentation de l'incidence de maladies dégénératives, chroniques et auto-immunes. Les deux versants, inné et adaptatif, du système immunitaire sont affectés (Castelo-Branco & Soveral 2014). Ce déclin général de la vigilance de l'immunité chez les personnes âgées augmente leur susceptibilité à développer des maladies infectieuses (Gavazzi & Krause 2002), la prévalence au cancer (Derhovanessian *et al.* 2008), et induit des réponses incomplètes à la vaccination (Goodwin *et al.* 2006).

4.5.2 Le concept d'"inflammaging"

Avec l'âge, les cellules adoptent un phénotype associé à la sénescence, et ont un profil sécrétoire différent des cellules juvéniles ; ce sont les SASP (Burton & Krizhanovsky 2014 ; van Deursen 2014). Ainsi, la sénescence cellulaire provoque une inflammation légère et généralisée car les cellules sénescents produisent des cytokines pro-inflammatoires en plus fortes quantités (Tsuji *et al.* 2010), pouvant être associée à des faiblesses généralisées chez les plus âgés (Hubbard *et al.* 2009). Il en résulte alors une inflammation systémique de bas niveau qui s'installe avec l'âge, processus connu sous le nom d'"inflammaging". Décrit pour la première fois par Franceschi *et al.*, l'inflammaging est un facteur de comorbidité fragilisant l'organisme, le plus souvent en causant des dommages à des organes non-immuns, provoquant des maladies chroniques (Franceschi *et al.* 2000). Les personnes atteintes de troubles de la santé au cours de leur vieillissement présentent un inflammaging avéré (Franceschi *et al.* 2007). L'origine la plus probable de l'inflammaging serait qu'en vieillissant, le système immunitaire met de plus en plus de temps à revenir à son état basal, aboutissant ainsi à un état de stimulation continue. Au niveau moléculaire, l'inflammaging peut être expliqué par des altérations de plusieurs mécanismes biochimiques dans la plupart des cellules de l'organisme au cours du vieillissement, créant ainsi des déficiences fonctionnelles et phénotypiques des cellules concernées.

Par exemple, des déficiences fonctionnelles comme l'autophagie peuvent jouer un rôle dans l'inflammaging (Salminen *et al.* 2012 ; Stranks *et al.* 2015). En effet, l'autophagie est un mécanisme de ménage primordial qui contrôle l'homéostasie intracellulaire en facilitant le

recyclage via le lysosome des protéines mal repliées et les organelles dysfonctionnant (He & Klionsky 2009 ; Ravikumar *et al.* 2010). La déficience autophagique causée par le vieillissement conduit à l'augmentation du stress oxydatif par l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) puisque les mitochondries qui fonctionnent mal ne sont pas éliminées (Cruz *et al.* 2007). Les ROS sont responsables d'un phénomène appelé stress oxydatif. Ce phénomène est causé par une augmentation de la production de radicaux libres oxygénés, et résulte le plus souvent d'un déséquilibre biochimique entre formation et élimination des radicaux libres. Par exemple, le radical libre hydroxyle ($\bullet\text{OH}$) stimule l'activation de la guanylate cyclase et la formation du second messenger guanosine monophosphate cyclique (GMPc) (Mittal & Murad 1977). Ceci a pour conséquence un déséquilibre de la balance AMPc/GMPc en faveur du second messenger chez les sujets de plus de 50 ans, alors que l'AMPc est un élément essentiel de la régulation de la réponse anti-inflammatoire (Coelho Horta *et al.* 2005). Les ROS qui s'accumulent avec l'âge sont capables de favoriser l'inflammation (et/ou l'inflammaging) en favorisant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (telles que l'IL-1 β et l'IL-18) soit directement en activant la voie NF- κ B (Gloire *et al.* 2006 ; Morgan & Liu 2011), soit indirectement en favorisant l'assemblage de l'inflammasome, grâce à l'activation de NLRP3 (Cruz *et al.* 2007 ; Zhou *et al.* 2010).

L'existence d'un phénotype pro-inflammatoire chez les mammifères âgés est relatée au niveau systémique par des taux élevés de cytokines pro-inflammatoires sériques, notamment d'IL-6 et de TNF- α (Krabbe *et al.* 2004 ; Singh & Newman 2011). Or l'augmentation des niveaux de TNF- α , d'IL-1, et d'IL-6 chez les personnes âgées est associée à de nombreuses maladies telles que les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives, l'athérosclérose, les syndromes métaboliques, le diabète de type 2, etc... (Ostan *et al.* 2008 ; Fulop *et al.* 2015). Cette inflammation chronique liée au vieillissement est observée au sein du tissu pulmonaire (Aoshiba & Nagai 2009) et pourrait jouer un rôle important dans le développement et la progression de la BPCO (Sharma *et al.* 2009).

4.5.3 Immunosénescence et système immunitaire inné

Les cellules sénescentes de l'immunité innée présentent une activité inflammatoire chronique et une augmentation des récepteurs aux cytokines pro-inflammatoires à leur surface, alors que dans le même temps leurs fonctions effectrices diminuent (Fagiolo *et al.* 1993 ; Leng *et al.* 2004 ; Solana *et al.* 2012). Ainsi, l'inflammaging du système immunitaire

inné pourrait être la conséquence d'une adaptation homéostatique au vieillissement du système immunitaire, probablement nécessaire pour faire face aux sollicitations des pathogènes et maintenir la réponse innée à un niveau fonctionnel optimal (Fulop *et al.* 2014 ; Shaw *et al.* 2013)

Cependant, l'inflammaging se révèle finalement à terme être un phénomène préjudiciable, puisqu'il a pour conséquence d'augmenter la production de protéases par les cellules inflammatoires, et d'induire des phénomènes de remodelage inopportuns. Ainsi dans le poumon, cet environnement biologique pro-inflammatoire rend le parenchyme pulmonaire fortement susceptible au développement de lésions emphysémateuses, et encore plus lors d'expositions répétées à la fumée de cigarette. On retrouve dans les poumons de personnes âgées saines une persistance de polynucléaires neutrophiles et des lésions de nature emphysémateuse causées par un relargage plus important d'élastase neutrophilique que dans les poumons d'individus plus jeunes (Meyer *et al.* 1998).

Cependant, les cytokines pro-inflammatoires ne peuvent expliquer à elles seules le phénomène complexe d'inflammaging, qui serait plutôt issu d'un ensemble d'interactions mises en jeu entre des molécules pro- et anti-inflammatoires et le système immunitaire inné (Morrisette-Thomas *et al.* 2014). En effet, les origines de l'inflammaging des cellules de l'immunité innée peuvent être variées, et outre la sénescence naturelle de ces cellules liée au vieillissement, elles possèdent également la faculté à devenir plus sensibles à un même stimulus rencontré à de nombreuses reprises ce qui conduit à la genèse d'une mémoire innée (Netea *et al.* 2011). Cette mémoire non-spécifique qui est différente de celle que l'on retrouve dans le versant adaptatif de l'immunité, est dénommée immunité innée qualifiée (trained innate immunity). Cette immunité innée qualifiée serait impliquée dans la sénescence des monocytes/macrophages par le maintien d'un phénotype pro-inflammatoire consécutif aux stimuli répétés rencontrés tout au long de la vie (Fulop *et al.* 2015). Dans le génome des monocytes/macrophages, des régions appelées "latent enhancers" ont été identifiées. Ces régions sont des régions communément non occupées par des facteurs de transcription mais capables d'acquérir les caractéristiques de régions "enhancers" en réponse à des stimulations répétées. Cependant, l'acquisition du caractère "enhancer" est incomplet et se fait sans que la cellule ne puisse retrouver un état totalement latent lorsque la stimulation cesse, ce qui génère un phénotype pro-inflammatoire récurrent (Ostuni *et al.* 2013). Par ailleurs, de nombreux stimuli (microbes, nutriments,..) sont capables de jouer un rôle important dans la

reprogrammation épigénétique des monocytes, ce qui conduit les macrophages à acquérir le phénotype de mémoire qualifiée (Saeed *et al.* 2014).

4.5.4 Immunosénescence et système immunitaire adaptatif

4.5.4.1 Résistance à l'apoptose

L'immunité adaptative est particulièrement sensible au vieillissement comme en témoigne la baisse du nombre et de la diversité des cellules T naïves, allant de pair avec l'involution du thymus (Lang *et al.* 2011). Ces cellules naïves sont atteintes d'altérations fonctionnelles, incluant un raccourcissement des télomères, une diminution de la diversité du répertoire, une diminution de la production d'IL-2, et une différenciation en cellules effectrices altérées (Lang & Nikolich-Zugich 2011). Leur capacité à organiser une réponse immunitaire face à de nouveaux antigènes est donc diminuée (Mitchell *et al.* 2010).

Du fait de la diversité du répertoire antigénique et d'une certaine homéostasie dans le nombre de cellules T tout au long de la vie, seul un très petit nombre de cellules peuvent reconnaître le même antigène. C'est pourquoi l'expansion clonale est un élément primordial de la réponse immunitaire adaptative ; il est donc indispensable que son déroulement ne soit pas perturbé afin de générer une réponse immune effective suffisante à la clairance de l'agent pathogène. Or, après de multiples cycles de stimulation par présentation d'antigènes allogéniques ou dérivés de peptides autologues par les CPA, les cellules T subissent des perturbations graves altérant leur fonction, et en particulier leur à entrée en apoptose (Dagarag *et al.* 2003 ; Spaulding *et al.* 1999 ; Vaziri *et al.* 1993 ; Freund *et al.* 2010). *In vitro*, en réponse à 6 différents stimuli apoptotiques, les cultures de lymphocytes T à passage avancé montrent des niveaux d'apoptose significativement plus faibles par rapport aux cellules quiescentes de passage moins avancé pourtant issues du même donneur (Spaulding *et al.* 1999).

4.5.4.2 Perte du corécepteur CD28

Le CD28 est un corécepteur du TCR indispensable à l'activation des lymphocytes T par les CPA. Sa disparition ou sa moindre expression est associée à une perte de la réactivité du système immunitaire face à des antigènes exogènes ou tumoraux. Or paradoxalement, l'auto-réactivité des cellules T CD4⁺CD28⁻ peut être plus importante dans des pathologies auto-

immunes telles que les polyarthrites rhumatoïdes (Schmidt *et al.* 1996), et les cellules T CD8⁺CD28⁻ montrent un potentiel cytotoxique élevé avec surexpression de granzymes et de perforines (Azuma *et al.* 1993 ; Fagnoni *et al.* 1996). Chez la souris, une étude a montré que les cellules T CD8⁺ de souris âgées de 16 mois expriment moins de CD28 que les cellules T CD8⁺ de souris jeunes âgées de 6 à 12 semaines (Lages *et al.* 2010). Chez l'Homme, à l'âge de 80 ans, environ 10 à 15% des cellules T CD4⁺ et 50 à 60% des cellules T CD8⁺ ont une expression déficiente du corécepteur CD28 (Fagnoni *et al.* 1996). En revanche, toutes les cellules T naïves présentes dans le sang ombilical expriment le corécepteur CD28 (Azuma *et al.* 1992) et tous les lymphocytes T humains l'expriment à la naissance (Effros *et al.* 1994).

L'activité télomérasique des cellules T sénescence est également dépendante de l'expression de la molécule CD28 à leur surface (Valenzuela & Effros 2002). La télomérase est un complexe enzymatique responsable de la prolongation des télomères en cours de raccourcissement du fait de multiples cycles de division cellulaire (Counter *et al.* 1992). Puisque la perte du corécepteur CD28 est associée à un profil de cellule T sénescence et à une activité télomérasique déficitaire, il a été émis l'hypothèse que le maintien de la transcription de la molécule CD28 dans des cultures à long terme de cellules T CD8⁺ pouvait prévenir les modifications phénotypiques et prolifératives liées à la sénescence. Des expériences de transduction de la molécule CD28 dans des cellules sénescence T CD28⁻ ont permis de restaurer l'activité télomérase des cellules, d'augmenter leur potentiel prolifératif et de diminuer la production de cytokines pro-inflammatoires (Parish *et al.* 2010).

La cause de la perte d'expression de la molécule CD28 au cours du vieillissement *in vivo* peut être attribuée en grande partie aux stimulations antigéniques répétées, car ce phénomène est également observé après de multiples stimulations antigéniques de cellules T CD28⁺ *in vitro* (Vallejo 2005 ; Valenzuela & Effros 2002). Toutefois, la perte de la molécule CD28 au cours du vieillissement n'est pas uniquement un résultat des activations répétées du TCR, puisqu'un environnement pro-inflammatoire, comme celui présent au cours de l'inflammaging, est également capable de soutenir la genèse et l'accumulation de cellules T CD28⁻. Ainsi, le traitement prolongé *in vitro* de lymphocytes T par du TNF- α exogène accélère l'acquisition des caractéristiques de sénescence, et notamment la dérégulation de l'expression des gènes codant pour la molécule CD28 (Parish *et al.* 2009). Réciproquement, la production de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-6 et le TNF- α , par les cellules T CD8⁺CD28⁻ est augmentée après de multiples passages en culture (Effros *et al.* 2005). Ces observations suggèrent l'existence d'un feed-back positif entre inflammaging et

immunosénescence. Ce phénomène a été également décrit avec les cellules T CD4⁺CD28⁻ (Bryl *et al.* 2001). Par ailleurs, les cytokines IL-7 et IL-15 qui sont importantes pour assurer l'homéostasie des cellules T en absence de stimulation antigénique (Surh & Sprent 2008) peuvent dans certaines conditions accélérer la perte de la molécule CD28 à la surface des cellules T CD8⁺ activées via leur TCR (Borthwick *et al.* 2000 ; Chiu *et al.* 2006).

4.5.4.3 Diminution de la fréquence des cellules T naïves

Dans un contexte de pool lymphocytaire restreint à la même taille tout au long de la vie, les cellules sénescentes devenues résistantes à l'apoptose restreignent la place des cellules lymphocytaires naïves ce qui diminue la veille et la protection contre de nouveaux antigènes et altère l'ensemble de la fonction immunitaire (Pawelec *et al.* 2005). Ainsi, tout au long du vieillissement, la fréquence de cellules T naïves diminue drastiquement alors que celle des cellules mémoires-effectrices augmente irrémédiablement (Callahan *et al.* 1993). Bien que les deux types de populations lymphocytaires T soient touchés par cette diminution linéaire des cellules naïves, les cellules T CD8⁺ naïves diminuent plus tôt et deux fois plus rapidement que les cellules T CD4⁺ naïves (Saule *et al.* 2006).

4.6 BPCO et Vieillesse

Indépendamment du tabagisme, la prévalence de la BPCO augmente avec l'âge et environ 10% de la population globale ayant plus de 40 ans souffre d'une obstruction chronique des voies aériennes de niveau II selon la classification GOLD (Halbert *et al.* 2006 ; Buist *et al.* 2007). La BPCO touche préférentiellement les individus âgés et l'âge peut être considéré comme un facteur augmentant seul l'incidence de la BPCO (Faner *et al.* 2012). En effet, l'environnement inflammatoire constaté au cours de l'inflammaging est très proche de celui que l'on retrouve chez les sujets fumeurs et les patients atteints de BPCO. Les cytokines IL-6 et IL-8 ainsi que les MMPs 1, 2, 3, 8, 9 et 10 produites par les cellules inflammatoires sont retrouvées en grande quantité dans les poumons de sujets BPCO (Ostridge *et al.* 2016) et participent à la dégradation du parenchyme pulmonaire. Au niveau fonctionnel, l'augmentation de la concentration sérique de MMP-9 est associée à de fortes toux et à une diminution de la FEV₁ (Linder *et al.* 2015) chez les sujets BPCO.

La proportion de cellules T CD8⁺CD28⁻ sénescents est augmentée dans le sang périphérique et les poumons de patients BPCO fumeurs et de patients BPCO ayant arrêté de fumer. L'activité cytotoxique et pro-inflammatoire des cellules T CD8⁺CD28⁻ est supérieure à celle des cellules T CD8⁺CD28⁺ chez les mêmes patients (Hodge *et al.* 2011). Une augmentation de la proportion des cellules CD4⁺CD28⁻ est également retrouvée chez les sujets BPCO et cette augmentation est associée à une altération de la fonction pulmonaire. Ces cellules T CD4⁺CD28⁻ expriment des récepteurs habituellement propres aux cellules NK (CD94 et CD158) et sécrètent de la perforine et des granzymes intracellulaires (Lambers *et al.* 2009) qui leur permettent de lyser des cellules cibles après stimulation et de contribuer directement aux dommages du parenchyme pulmonaire en induisant l'apoptose des cellules épithéliales alvéolaires (Nakajima *et al.* 2002). De plus, ces cellules T CD4⁺CD28⁻ libèrent des quantités importantes d'IFN- γ , ce qui favorise indirectement la destruction du parenchyme pulmonaire par induction de la sécrétion de MMPs par les macrophages (Park *et al.* 1997).

L'accumulation de cellules T CD8⁺ mémoires différenciées tardivement au cours du vieillissement est responsable d'une inversion du ratio CD4/CD8 chez les personnes de plus de 65 ans (Saule *et al.* 2006 ; Wikby *et al.* 2008 ; Strindhall *et al.* 2013). Cependant, bien que la diminution du ratio CD4/CD8 soit significative et proportionnelle au stade d'avancement de la maladie chez les patients atteints de BPCO (Chen *et al.* 2012), il n'existe pas d'association directe entre ce ratio et le développement de la maladie. Puisqu'une expansion monoclonale de cellules T peut également avoir lieu en réponse à un antigène du soi, l'auto-immunité est de plus en plus considérée comme un élément important de la pathologie. Les lymphocytes T CD4⁺CD28⁻ issus de répliquations sénescents sont impliqués dans de nombreuses maladies auto-immunes, telles que les arthrites rhumatoïdes, les scléroses multiples, la spondylarthrite ankylosante (Thewissen *et al.* 2007). Les lymphocytes T CD8⁺CD28⁻ sont quant à eux impliqués dans le développement de granulomatoses interstitielles du poumon (Heron *et al.* 2010).

Si l'âge semble favoriser le développement de la BPCO, il est également admis que la BPCO, elle-même, peut accélérer le vieillissement du tissu pulmonaire de façon réciproque en exposant chroniquement le poumon à des antigènes du soi issus de la dégradation de la MEC au cours du processus emphysémateux. La BPCO est également considérée sur le plan fonctionnel comme un vieillissement phénotypique accéléré des poumons, avec des fonctionnalités anatomiques et physiologiques chez des patients BPCO relativement jeunes

similaires à celles constatées habituellement chez des personnes plus âgées et saines (Ito & Barnes 2009 ; Provinciali *et al.* 2011). De même, la détérioration des fonctions pulmonaires au cours du vieillissement chez les personnes en bonne santé est accélérée chez les patients du même âge atteints de BPCO (Fletcher & Peto 1977).

Le vieillissement est le premier facteur responsable de la sénescence des cellules alvéolaire. La fumée de cigarette accélère également ce phénomène puisque des cultures *in vitro* de cellules fibroblastiques (Jörres *et al.* 2005) ou de cellules épithéliales (Tsuji *et al.* 2006) exposées à la fumée de cigarette augmentent le niveau d'expression de la molécule SA- β -gal (senescence-associated β -galactosidase), un marqueur type de la sénescence cellulaire. Cette augmentation de la SA- β -gal est également retrouvée dans des cultures *ex vivo* de fibroblastes pulmonaires provenant de patients emphysémateux (Müller *et al.* 2006). Chez les personnes âgées atteintes d'emphysème, l'exposition à la fumée de cigarette pendant de longues périodes de temps accélère le processus d'apoptose des cellules épithéliales tapissant les petites voies aériennes et les alvéoles (Walters *et al.* 2014). De plus, comme le renouvellement cellulaire s'accélère pour compenser la hausse de l'apoptose, l'apparition prématurée de cellules sénescents est inévitable (Aoshiba & Nagia 2009).

Si le vieillissement et le développement de la BPCO semblent partager des mécanismes cellulaires et moléculaires communs, le rôle précis du vieillissement dans le développement de la maladie est controversé et reste à préciser. Ainsi, une étude réalisée en 2013 ne montre aucune différence significative des paramètres cellulaires mis en jeu dans le développement d'un emphysème chez la souris jeune et la souris âgée après 6 mois d'exposition à la fumée de cigarette (Zhou *et al.* 2013). A l'opposé, une autre étude démontre clairement que le temps nécessaire à l'établissement d'un emphysème chez la souris est dépendant de l'âge de l'animal avec des souris jeunes développant un emphysème après 4 mois d'exposition à la fumée de cigarette alors que les mêmes souris (même fond génétique) plus âgées développe la même symptomatologie après seulement 3 mois d'exposition (John-Schuster *et al.* 2016). L'hypothèse du rôle du vieillissement sur la pathogénèse de la maladie sans implication sur sa sévérité est également mise en avant. Cette hypothèse est corroborée par une étude montrant que, dans un modèle *in vivo* d'exposition courte à la fumée de cigarette, l'âge des souris augmente leur susceptibilité à développer une réponse inflammatoire, notamment via l'augmentation de la production basale de chimiokines par les cellules épithéliales bronchiales sénescents (Moriyama *et al.* 2010).

BUT DU TRAVAIL

Les fibres élastiques assurent l'élasticité de nombreux tissus et en particulier du tissu pulmonaire. L'élastine qui est le composant majoritaire des fibres élastiques peut être le siège, au cours de certains processus physiopathologiques, d'une profonde élastolyse.

Une des hypothèses étiologiques de la BPCO réside dans le déséquilibre de la balance protéases/anti-protéases lié à une forte production d'enzymes protéolytiques par les cellules inflammatoires infiltrant le parenchyme pulmonaire, ce qui conduit à la destruction des fibres élastiques pulmonaires et à la genèse de peptides solubles d'élastine (PE). Des taux élevés de PE sont retrouvés dans les liquides biologiques de patients atteints de BPCO et ces taux sont corrélés à la sévérité de la maladie. Une étude réalisée dans le laboratoire a montré que l'instillation intra-trachéale d'une dose unique du peptide d'élastine VGVAPG à des souris permet d'obtenir, en 21 jours, une inflammation chronique et une dégradation du parenchyme pulmonaire caractéristique d'un processus emphysémateux.

Si l'exposition au tabac est le facteur de risque majoritaire du déséquilibre de la balance protéases/anti-protéases au cours de la BPCO, le vieillissement est également un facteur de risque important. En effet, la prévalence de la maladie augmente en fonction de l'âge et l'émergence, au cours de la BPCO, de clones lymphocytaires T CD4⁺CD28⁻ et T CD8⁺CD28⁻ spécifiques de l'immunosénescence montre que la BPCO s'apparente à une maladie du vieillissement.

Des études précédentes réalisées dans le laboratoire ont montré que les peptides d'élastine, et en particulier l'hexapeptide VGVAPG, ont la capacité, via leur interaction avec le site "S-gal" du récepteur à l'élastine exprimé à la surface des lymphocytes T, d'orienter la polarisation des lymphocytes Th vers un phénotype de type Th1. Or, les lymphocytes Th et Tc jouent également un rôle important dans la physiopathologie de la BPCO et notamment dans l'installation de l'emphysème.

C'est dans ce contexte scientifique que l'hypothèse de l'implication des PE et du vieillissement dans la polarisation de la réponse Th et Tc au cours de la BPCO a été émise. Lorsque mon travail de thèse a commencé, une étude était en cours pour explorer l'orientation de la réponse lymphocytaire dans deux modèles murins d'emphysème, un modèle induit par les peptides d'élastine et un modèle induit par une élastase. Après avoir montré, dans ces deux modèles, que le développement de l'emphysème s'accompagnait d'une réponse lymphocytaire de type Th1 et Th17 associée à une réponse Tc1, nous avons étudié les effets du vieillissement sur la mise en place du processus emphysémateux et sur la modulation de la réponse Th et Tc associée.

MATERIELS & METHODES

Les différentes techniques et approches expérimentales utilisées dans le cadre de ce travail de thèse sont détaillées dans les deux articles qui sont intégrés à ce document. En conséquence, cette partie de la thèse intitulée « Matériels & Méthodes » est restreinte à la description détaillée des analyses phénotypiques et du dosage des cytokines sécrétées réalisées par cytométrie en flux. Pour le phénotypage des différentes populations cellulaires étudiées nous avons adopté des stratégies de marquage multi-couleurs afin d'optimiser le nombre de cellules utilisées pour l'exploration simultanée de plusieurs marqueurs (membranaires, intracellulaires et intranucléaires ; de viabilité et de prolifération). Concernant le dosage des cytokines, la technique multiplex appelée «Cytometric Beads Array » (CBA) a été utilisée afin de cribler puis cibler et doser différentes cytokines d'intérêts dans un même échantillon et sur des volumes très inférieures à ceux nécessaire pour les autres techniques de dosage.

1. Rappels de cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique de caractérisation multiparamétrique individuelle, qualitative et semi-quantitative de particules en suspension. Elle consiste en l'analyse de signaux optiques émis par des particules (le plus souvent des cellules, entraînées

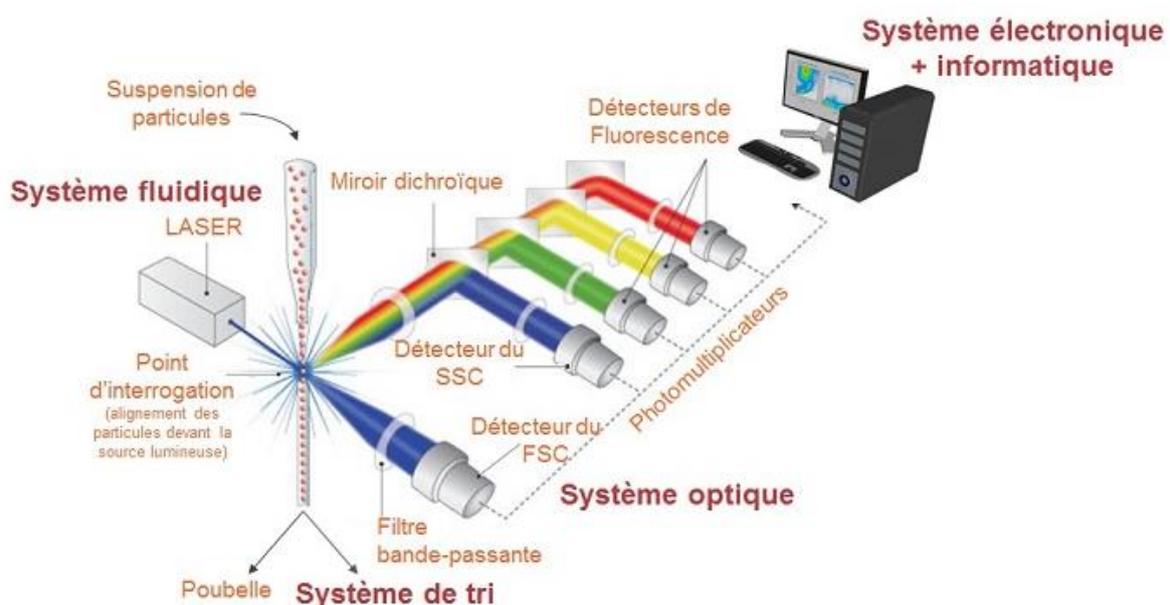


Figure 29 : Principe de fonctionnement d'un cytomètre en flux

dans un flux qui les aligne parfaitement) après que celles-ci aient traversé le faisceau lumineux d'un laser dans une chambre d'analyse. Les signaux optiques parviennent ensuite à des détecteurs, puis sont amplifiés par des photomultiplicateurs (PMT), numérisés, traités et stockés par ordinateur (**Figure 29**).

Il faut donc que la lumière émise soit focalisée, séparée, puis acheminée vers des systèmes de détection ou photomultiplicateurs (PMT). Pour cela, les signaux lumineux émis transitent à travers différents circuits optiques composés d'une alternance de miroirs et de filtres. Ces miroirs et filtres ont la capacité de ne laisser passer que la lumière située dans une certaine gamme de longueurs d'ondes et de réfléchir les autres, ce qui permet donc la

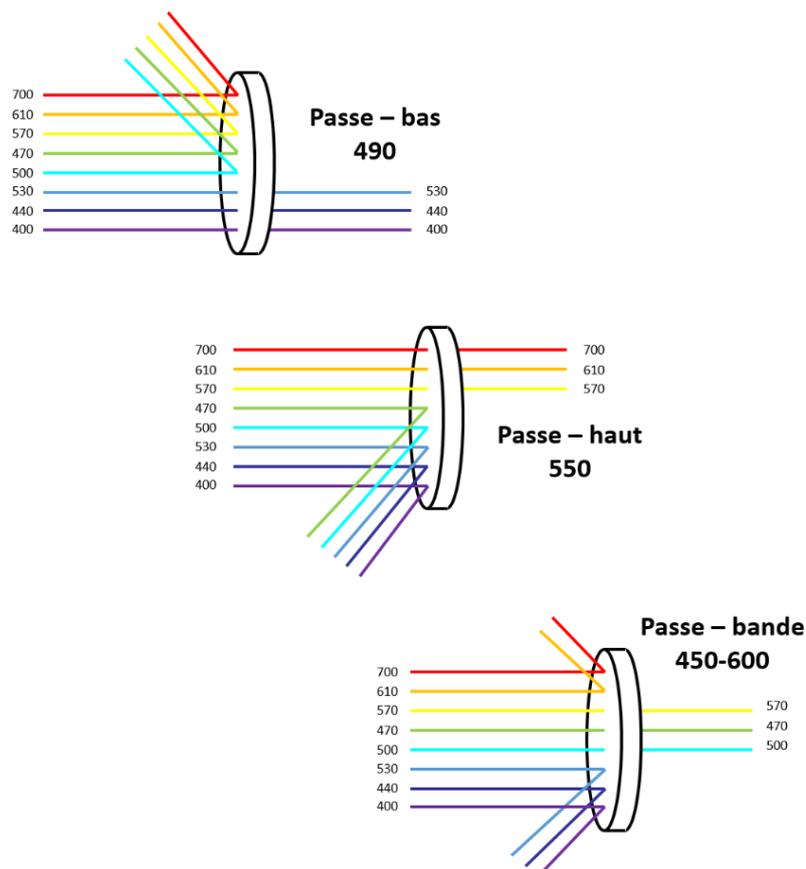


Figure 30 : Les différents filtres utilisés en cytométrie en flux

décomposition du spectre d'émission nécessaire à l'analyse des résultats (**Figure 30**).

Les signaux mesurés sont relatifs: *i*) aux propriétés optiques intrinsèques des particules (dimension, structure interne ou auto-fluorescence), *ii*) aux propriétés optiques induites de fluorescence obtenues par des marquages spécifiques de structures (protéines) ou de fonction cellulaires (viabilité, prolifération).

En fonction des caractéristiques optiques des détecteurs, il est possible d'obtenir trois types d'information. Ainsi, le cytomètre renseigne sur *i*) la taille relative de la particule qui est évaluée à partir de la diffraction aux petits angles de la lumière incidente (notion de "Forward Scattered Light", ou FSC), *ii*) la structure relative de la particule, c'est-à-dire son degré de granulosité interne qui est appréciée à partir de la diffraction aux grands angles de la lumière incidente (notion de "Side Scattered Light", ou SSC), et *iii*) l'intensité de la fluorescence relative de la particule qui est obtenue après excitation de marqueurs fluorescents, ou fluorochromes, qui émettent des photons d'une longueur d'onde toujours supérieure à celle de la lumière incidente.

2. Description du cytomètre en flux utilisé

Le plateau technique de cytométrie en flux URCACyt est intégré dans la plateforme Santé de l'URCA. Situé sur le campus du pôle santé de l'université, il dispose de plusieurs appareils de cytométrie : deux analyseurs, un FACS-Calibur™ (BD biosciences, Pont-de-Claix, France), et un LSR-Fortessa™ (BD biosciences), et un analyseur-trieur FACS-Aria™ II (BD biosciences). Ces différents appareils diffèrent par le nombre de lasers dont ils sont équipés, et par le nombre de canaux de détections disponibles. Le cytomètre utilisé pour la réalisation de ces travaux de thèse est l'analyseur LSR-Fortessa™.

Le cytomètre analyseur LSR-Fortessa™ possède 4 lasers (405nm, 488nm, 561nm, et 640nm) permettant l'analyse de 2 paramètres de morphologie (taille et structure) et 13 paramètres de fluorescence (**Tableau 1**). Le logiciel d'acquisition et de traitement des données est le logiciel FACSDiva v6 (BD biosciences).

Le laser violet est caractérisé par une longueur d'onde d'excitation à 405nm et est relié à un BD-Octagon™ avec un système optique permettant la collecte des signaux d'émission sur 3 détecteurs (450±25nm, 525±25nm, et 610±10nm). Le laser bleu est caractérisé par une

Laser	Excitation	Filtre	Fluorochrome
Bleu	488 nm	530/30	FITC, AF488
		710/50	PerCP-Cy5.5
Jaune-Vert	561 nm	586/15	PE
		610/20	PE-CF594
		670/30	PE-Cy5
		710/50	PE-Cy5.5
		780/60	PE-Cy7, PE-H7
Rouge	640 nm	670/14	APC, AF647
		730/45	AlexaFluo 700
		780/60	APC-H7
Violet	405 nm	450/50	V450, BV421
		525/50	V500, BV510
		610/20	BV605

Tableau 1 : Les 13 paramètres de couleurs du BD LSR-Fortessa

longueur d'onde d'excitation de 488nm est relié à un BD-Octagon™ avec un système optique permettant la détection de 2 couleurs d'émission (530±15nm et 710±25nm) et du paramètre SSC (488±5nm). Le laser jaune-vert est caractérisé par une longueur d'onde d'excitation de 561nm est relié à un BD-Octagon™ avec un système optique permettant la détection de 5 groupes de longueurs d'ondes d'émission (586±7,5nm, 610±10nm, 670±15nm, 710±25nm, 780±30nm). Enfin, le laser rouge est caractérisé par une longueur d'onde d'excitation de 640nm, et est relié à un BD-Trigon™ avec un système optique permettant la détection de 3 types de fluorescence émise (670±7nm, 730±22,5nm, et 780±30nm) (**Tableau 1**). Il y a donc un système optique pour chacun des 4 lasers

Chaque système optique est composé de filtres passe-bas qui réfléchissent les longueurs d'ondes inférieures à leur valeur seuil, et sont envoyés vers un autre filtre (**Figure 31**). Les détecteurs se trouvent derrière les filtres, et analysent la lumière qui leur est parvenue. Cette configuration technique, qui associe un laser à un système optique, permet également de différencier les lumières émises dans les mêmes gammes, mais issues de l'excitation de fluorochromes par des lasers différents. C'est notamment le cas, dans la configuration du cytomètre utilisé, des deux filtres 610/20 présents après les lasers à 405nm et 561nm. En effet, ces filtres ne peuvent techniquement capter que la lumière émise par le fluorochrome excité par le laser qui leur est associé (**Figure 32**). C'est pourquoi par extension, il est courant d'attribuer à chaque canal de détection le nom d'un (ou plusieurs) fluorochromes utilisé(s) habituellement.

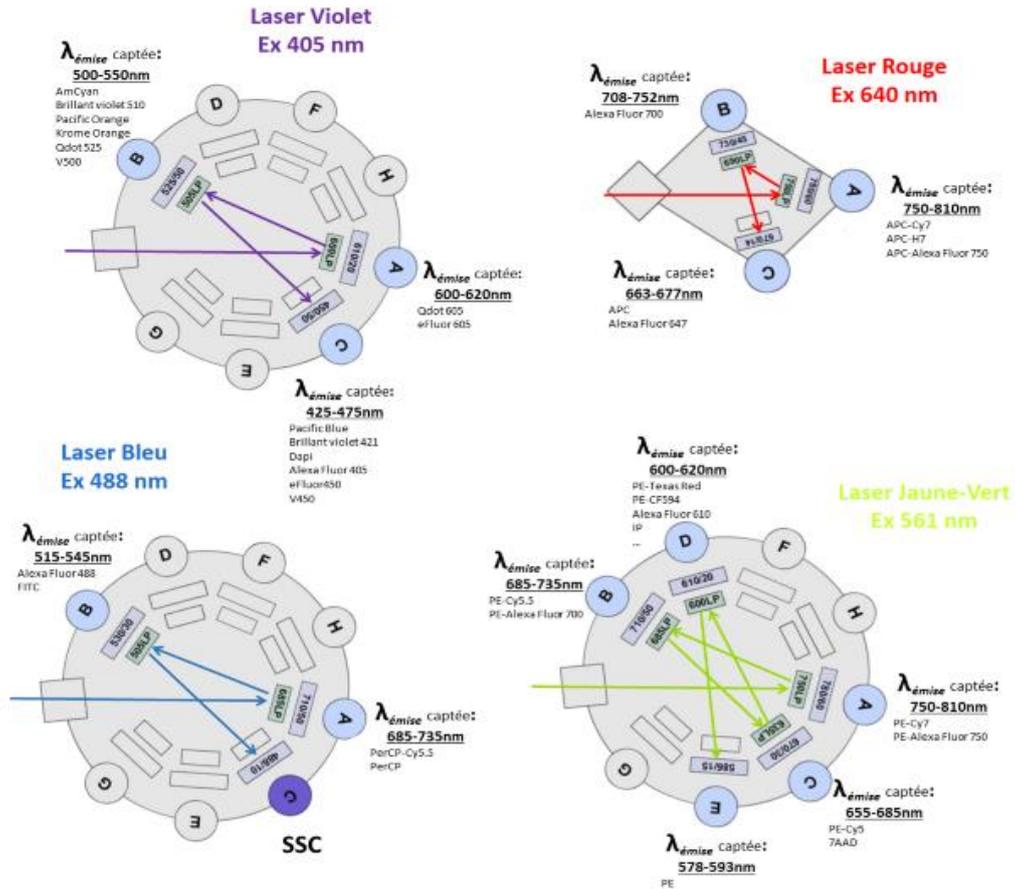


Figure 31 : Configuration du BD LSR-Fortessa

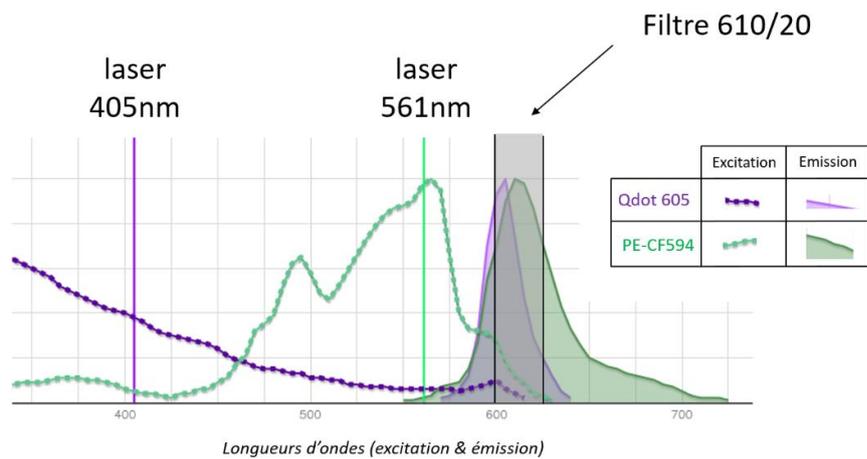


Figure 32 : Exemple de fluorochromes ayant une longueur d'onde d'émission semblable, mais d'excitation différente.

(d'après Biotrend, Fluorescence spectra analyser tool)

3. Construction des panels multi-couleur et stratégies de "gating"

3.1. Principes généraux

Afin de réaliser le choix d'un panel multi-couleur optimal, il est nécessaire de prendre en considération trois paramètres importants :

1. La configuration du cytomètre utilisé. La connaissance du nombre de lasers et de leurs longueurs d'onde d'excitation et la connaissance du nombre de détecteurs et de leurs longueurs d'ondes d'émission sont nécessaires afin de pouvoir lister les fluorochromes potentiellement utilisables (**Tableau 1**).

2. L'intensité de fluorescence des fluorochromes : une fois la configuration du cytomètre connue et une fois les fluorochromes à utiliser identifiés, ces derniers ont été classés sur la base de leur intensité de fluorescence en allant du plus brillant (very bright) au moins brillant (dim) (**Tableau 2**)

3. Le niveau d'expression des marqueurs cellulaires. Il est important de définir les populations cellulaires d'intérêt, les cibles cellulaires à étudier ainsi que leur mode d'expression dans la cellule.

		Fluorochrome			
		Very Bright	Bright	Moderate	Dim
Laser	Violet (405 nm)	BD Horizon™ BV421	BD Horizon™ BV605	BD Horizon™ BV510	BD Horizon™ V450 BD Horizon™ V500
	Blue (488 nm)	BD Horizon™ BB515		FITC Alexa Fluor® 488 PerCP-Cy™5,5	PerCP
	Yellow/Green (561 nm)	PE BD Horizon™ PE-CF594 PE-Cy™5 PE-Cy™7			
	Red (640 nm)		APC Alexa Fluor® 647		Alexa Fluor® 700 APC-H7 APC-Cy7

Tableau 2 : Classement des fluorochromes en fonction de leur intensité de fluorescence (BD Biosciences)

Les trois paramètres précédents ayant été définis, nous avons choisi les couples Ac-fluorochromes en prenant le soin d'associer un Ac ciblant un marqueur faiblement exprimé à un fluorochrome très brillant, et en appliquant une stratégie inverse pour les marqueurs fortement exprimés dans la cellule. Afin d'optimiser les résultats obtenus et de faciliter l'analyse des résultats, les panels ont toujours été construits en commençant par la sélection des Ac identifiants soit les marqueurs peu présents dans la cellule tel que les cytokines, les facteurs de transcription ou les marqueurs d'activation, soit les marqueurs très importants pour la caractérisation des populations cellulaires ciblées tel qu'un marqueur de viabilité ou un cluster de différenciation rare. Différents panels ont ainsi été construits et utilisés pour l'analyse des cellules étudiées dans ce travail de thèse, qu'il s'agisse de la vérification des tris cellulaires réalisés (tri des CD4⁺ et des CD45⁺) ou de la réalisation du phénotypage des cellules après stimulation. Ci-après sont présentées la description des différents panels utilisés au cours de la thèse ainsi que la description de la stratégie d'identification des populations.

3.2. Panels de vérification des tris cellulaires

3.2.1. Tri des lymphocytes T CD4⁺

Les lymphocytes T CD4⁺ isolés des rates de souris ont été obtenus grâce à un tri immuno-magnétique par déplétion (Macs Miltenyi Biotec, Paris, France). Les splénocytes et la suspension cellulaire obtenue après tri ont été analysés par cytométrie en flux afin de

<u>Populations cellulaires :</u>		<u>Splénocytes avant/après tri</u>
Leucocytes	Marqueurs de surface	CD45 APC
Lymphocytes B		CD19 PE
Lymphocytes T		CD3 BV421
Lymphocytes Tc		CD8 FITC
Lymphocytes Th		CD4 APC-H7
Activation		CD69 PerCP-Cy5.5
		CD25 PE-Cy7

Tableau 3 : Panel utilisé pour vérifier l'efficacité du tri des lymphocytes T CD4⁺

déterminer leur composition cellulaire et de vérifier l'efficacité du tri. Les Ac monoclonaux (Acm) utilisés pour cibler les populations cellulaires et qui ont été couplés à des fluorochromes *ad hoc* selon la démarche décrite précédemment sont détaillés dans le **Tableau 3**.

La stratégie de "gating" adoptée pour cette analyse a été la suivante : après avoir exclu les doublets, une représentation bi-paramétrique du FSC-A en fonction du SSC-A a permis de définir les événements correspondant aux cellules. Le niveau d'expression du marqueur CD19 identifiant les LB, et celui du marqueur du CD3 identifiant les LT ont ensuite été analysés sur cette population. Sur la population CD3⁺, les deux sous-populations Tc et Th ont été séparées sur l'identification respective des marqueurs CD8 et CD4. Le niveau d'activation des cellules T CD4⁺ a enfin été déterminé en analysant le niveau d'expression des marqueurs CD25 et CD69 (**Figure 33**). Sur l'ensemble des tris réalisés, les pourcentages de pureté des populations CD4⁺/CD45⁺ a toujours été supérieur ou égal à 92%. L'analyse de l'expression des marqueurs d'activation a permis de confirmer que le procédé de tri par déplétion n'active pas les cellules.

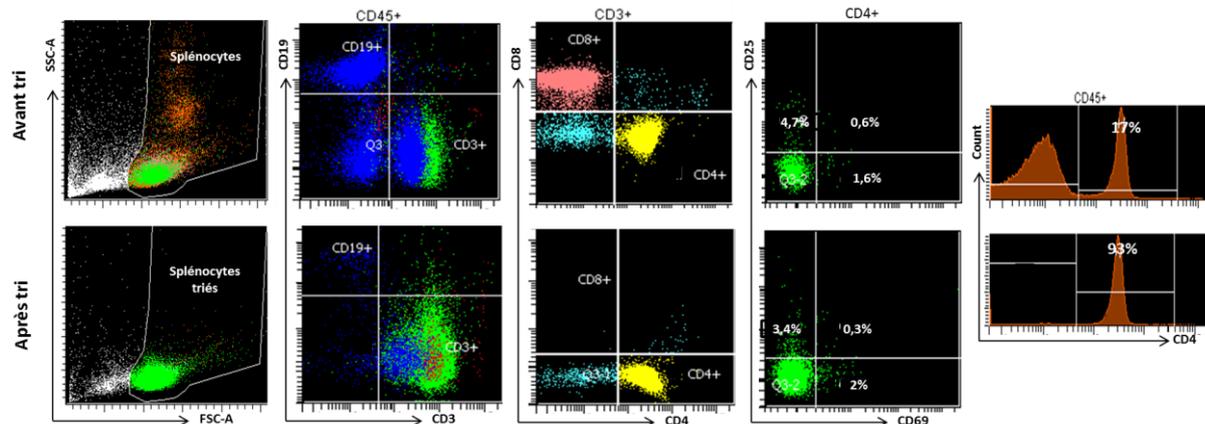


Figure 33 : Stratégie de "gating" pour la vérification du tri des lymphocytes T CD4⁺

3.2.2. Tri des leucocytes CD45⁺

Les leucocytes CD45⁺ isolés des poumons de souris par sélection positive au moyen d'un système de tri immuno-magnétique (Macs Miltenyi Biotec), ou obtenus après broyage

des ganglions médiastinaux (mLN) de souris ont été analysés par cytométrie en flux afin de déterminer la pureté de la suspension cellulaire. Pour cela un marquage simple avec un Ac anti-CD45 couplé à l'APC a été utilisé (**Figure 34**). La pureté des cellules CD45⁺ obtenues après tri à partir de poumons broyés a toujours été supérieure ou égale à 95%. L'analyse des échantillons provenant des mLN a également permis de confirmer que plus de 98% des cellules de la suspension obtenue exprimaient le marqueur CD45. Par ailleurs, afin de connaître la composition cellulaire des suspensions obtenues et d'identifier des variations de proportions des populations cellulaires d'une condition à l'autre, un panel de 7 couleurs a été utilisé. Ce panel qui a également été utilisé pour le phénotypage des LBA est présenté dans le paragraphe suivant.

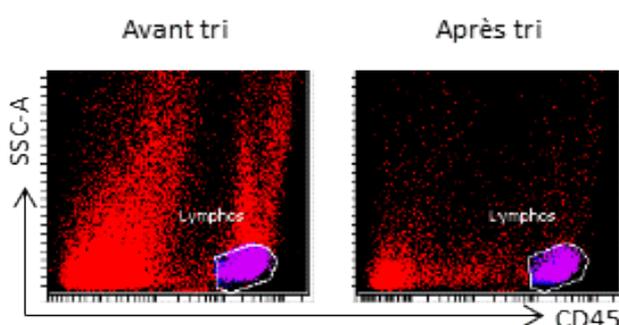


Figure 34 : Expression du CD45 sur un broyat de poumon avant et après tri

3.2.3. Phénotypage des LBA

Après centrifugation, les cellules récupérées des LBA de souris sont comptées puis marquées pour une analyse phénotypique. Les populations cellulaires ciblées et les Acm utilisés pour l'analyse sont reportés dans le **Tableau 4**.

La stratégie de "gating" adoptée pour cette analyse a été la suivante : après avoir exclu les doublets et avoir caractérisé les cellules selon leur taille (FSC) et leur complexité (SSC), les PN (Ly6G⁺), les macrophages (Mac3⁺), les LB (CD19⁺) et les LT (CD3⁺) ont été identifiés parmi les cellules CD45⁺. Les deux sous-populations Tc et Th ont ensuite été définies parmi les lymphocytes T CD3⁺ (**Figure 35**)

Populations cellulaires :		Splénocytes avant/après tri	
Leucocytes	Marqueurs de surface	CD45	AlexaFluor 700
Lymphocytes B		CD19	FITC
Lymphocytes T		CD3	PE-Cy7
Lymphocytes Tc		CD8	BV510
Lymphocytes Th		CD4	APC-H7
Macrophages		Mac-3	PE
Neutrophiles		Ly6G	APC

Tableau 4 : Panel utilisé pour le phénotypage des LBA

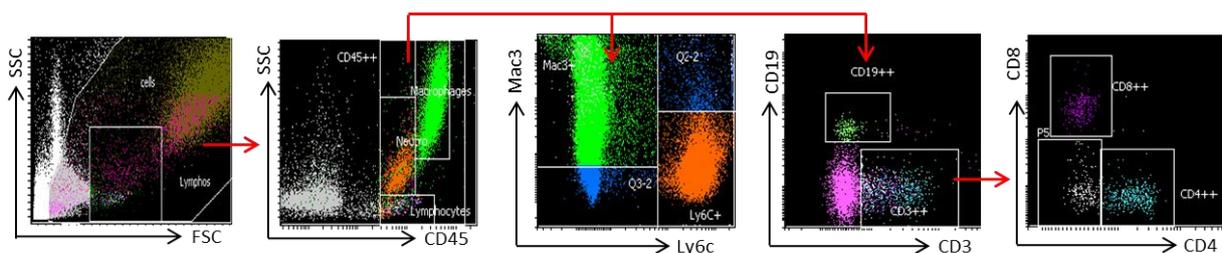


Figure 35 : Stratégie de "gating" pour le phénotypage des LBA

3.2.4 Phénotypage des cellules $CD45^+$, $CD4^+$ et $CD8^+$ après stimulation

Les leucocytes $CD45^+$ triés à partir des poumons et ceux provenant des mLN ainsi que les lymphocytes T $CD4^+$ et T $CD8^+$ isolés des rates de souris, ont été mis en culture et stimulés en présence de billes recouvertes d'Ac anti-CD3 et anti-CD28 (Dynabeads, Invitrogen, Illkirch, France). Après 48 h de stimulation les cellules ont été analysées par cytométrie en flux afin d'identifier les sous-populations Th1/Tc1, Th2/Tc2 et Th17/Tc17 ou Treg sur la base de l'expression de leur cytokines respectives (IFN- γ , IL-4, IL-17a) ou de leurs facteurs de transcription (FT) spécifiques (T-bet, GATA3, ROR γ t, FoxP3). En fonction

de l'origine de la suspension cellulaire à analyser (poumons, mLN ou rate), les marquages de surface ont été différents mais les mêmes Ac anti-cytokines et anti-FT ont été utilisés. A titre d'exemple, le **Tableau 5** présente le panel utilisé pour le phénotypage des leucocytes et des LT CD4

Populations cellulaires :	Leucocytes (Poumons – mLN):	LT CD4 ⁺ (Rate):
Cellules vivantes	ZOMBIE®	ZOMBIE®
Leucocytes	CD45	
Activation	CD25	CD25
Lymphocytes T	TCR β	TCR β
Lymphocytes Th	CD4	CD4
Lymphocytes Tc	CD8	
Lymphocytes Th1	IFN γ	Tbet
Lymphocytes Th2	IL4	Gata 3
Lymphocytes Th17	IL17a	Roryt
Lymphocytes Treg		Foxp 3

Marqueurs de surface	Leucocytes (Poumons – mLN):	LT CD4 ⁺ (Rate):
	RED	RED
	AlexaFluor 700	
	PerCP-Cy5.5	PerCP-Cy5.5
	BV510	BV510
	APC-H7	APC-H7
	PE-Cy7	
Marqueurs intracellulaires	Leucocytes (Poumons – mLN):	LT CD4 ⁺ (Rate):
	FITC	PE
	BV421	AlexaFluor 488
	PE	BV421
		APC

Tableau 5 : Panels utilisés pour le phénotypage des Leucocytes et des LT CD4⁺

Après mise en culture et stimulation des leucocytes CD45⁺, la stratégie d'analyse des cytokines exprimées par les cellules Th a été la suivante : les singulets correspondant aux cellules vivantes exprimant le marqueur CD45 et le TCR β à leur surface ont été caractérisés sur la base de l'expression du marqueur CD8 ou du marqueur CD4. Une fois les LT CD4⁺CD25⁺ identifiés, le pourcentage de cellules Th exprimant l'une ou l'autre des cytokines IFN- γ , IL-4 ou IL-17a a été évalué (**Figure 36**). En ce qui concerne l'analyse de l'expression des facteurs de transcriptions des LT CD4⁺CD25⁺, la même stratégie de « gating » des différentes populations leucocytaires a été utilisée. Les sous-populations Th ont alors été caractérisées sur la base de l'expression du facteur de transcription (FT) T-bet, GATA3 ou ROR γ t. Les lymphocytes Treg ont également été identifiés au niveau de leur facteur de transcription spécifique comme la population CD4⁺FoxP3⁺CD25^{high} (**Figure 37**).

La stratégie d'analyse des cytokines exprimées par les cellules Tc a été en tout point identique à celle appliquée pour les cellules Th.

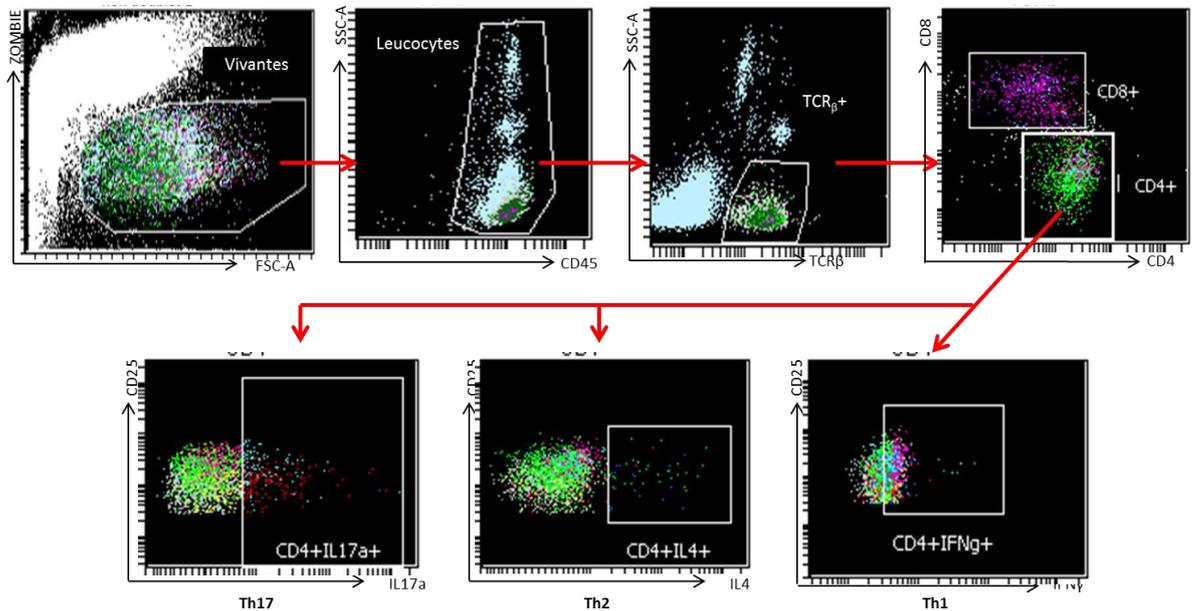


Figure 36 : Stratégie de "gating" pour le phénotype des CD45⁺ stimulés et l'analyse des cytokines intra-cellulaires des cellules Th

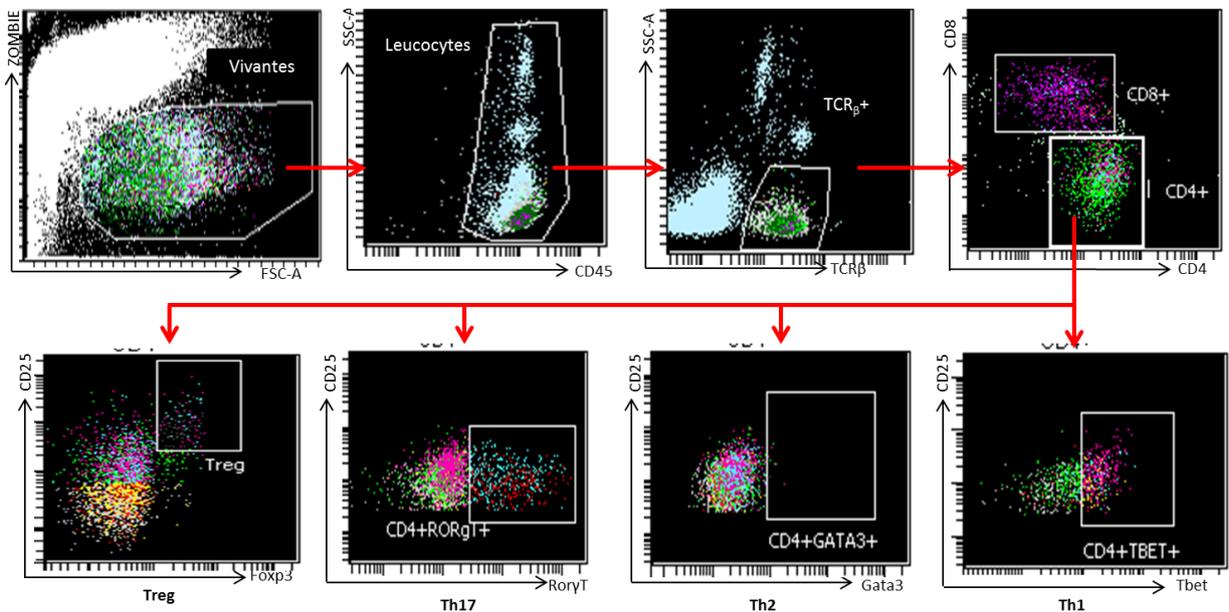


Figure 37 : Stratégie de "gating" pour le phénotype des CD45⁺ stimulés et l'analyse des facteurs de transcription

En parallèle, après mise en culture et stimulation des LT CD4⁺ ou des LT CD8⁺ triés des rates de souris, une analyse des cytokines et des facteurs de transcription a été réalisée selon la stratégie suivante : les lymphocytes TCR β ⁺CD4⁺ ou TCR β ⁺CD8⁺ vivants et activés ont été identifiés et le pourcentage de cellules Th ou Tc exprimant l'une ou l'autre des cytokines IFN- γ , IL-4 ou IL-17a ainsi que le pourcentage des cellules Th ou Tc exprimant l'un ou l'autre des facteurs de transcription T-bet, GATA3, ROR γ t ou FoxP3 a été évalué. La **Figure 38** et la **Figure 39** présentent respectivement la stratégie de "gating" pour le phénotypage des lymphocytes T CD4⁺ stimulés et l'analyse des cytokines et des facteurs de transcriptions. Une stratégie identique a été utilisée pour les lymphocytes T CD8⁺.

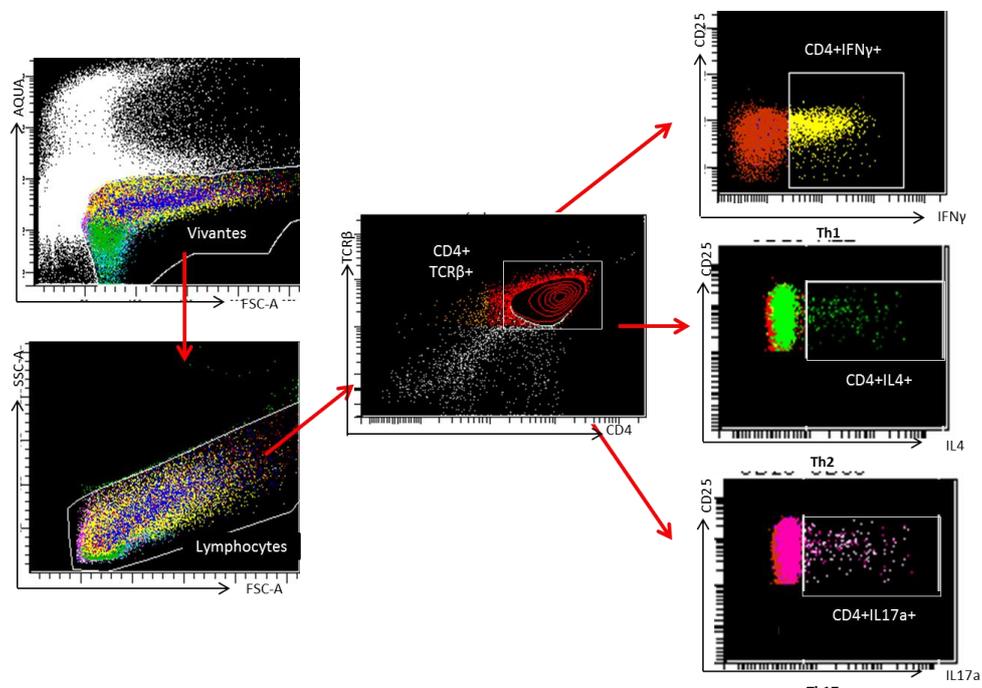


Figure 38 : Stratégie de "gating" pour le phénotypage des lymphocytes T CD4⁺ stimulés et l'analyse des cytokines

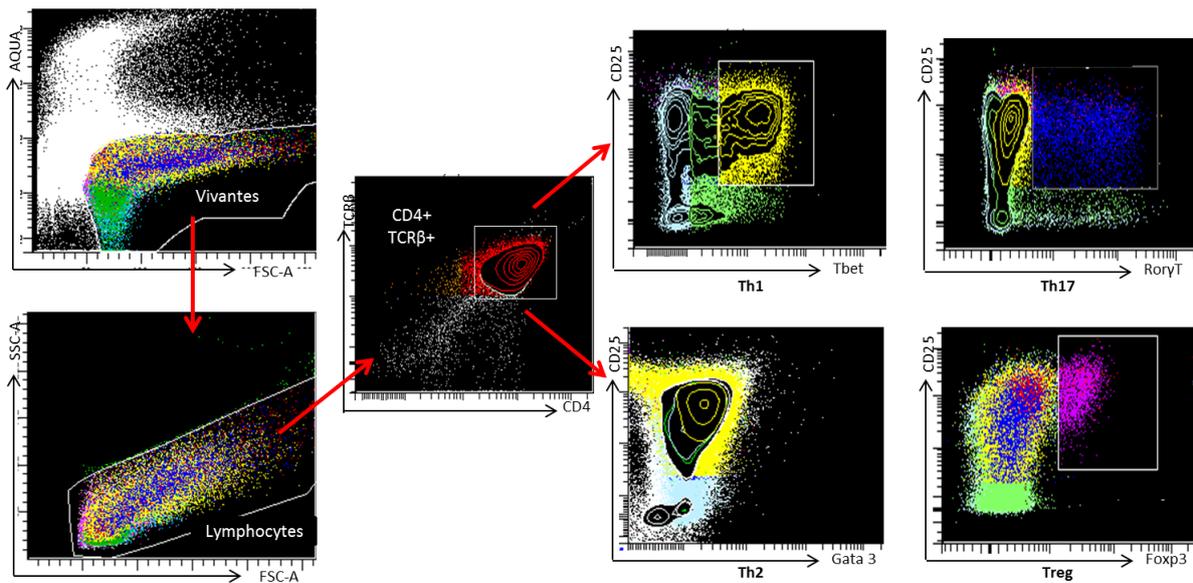


Figure 39 : Stratégie de "gating" pour le phénotypage des LT CD4+ stimulés et l'analyse des facteurs de transcription

4. Dosage multiplexe par la technique de CBA

4.1. Principe

Le "Cytometric Beads Array" (CBA) est une technique de dosage immunologique de protéines utilisant, d'une part des billes fluorescentes couplées à des Ac spécifiques des protéines d'intérêt à doser et, d'autre part, des Ac de révélation couplés à un fluorochrome et reconnaissant également les protéines d'intérêt.

Après excitation par le laser rouge (640 nm), les billes expriment une double fluorescence de type APC et APC-Cy7, détectées respectivement sur le canal 670 ± 7 nm et sur le canal 780 ± 30 nm. L'intensité de cette double fluorescence est différente pour chacune des billes spécifiques d'une cytokine donnée. Les anticorps de révélation sont, quant à eux, couplés au fluorochrome PE, excité par le laser jaune-vert (561 nm) et détecté par le canal $586 \pm 7,5$ nm. L'intensité de fluorescence détectée est alors proportionnelle à la quantité de cytokine présente dans l'échantillon.

Dans notre approche expérimentale, la technique de CBA est utilisée pour doser les cytokines IFN- γ , IL-4 et IL-17a sécrétées dans les surnageants de culture des lymphocytes T CD4⁺ ou T CD8⁺ après stimulation, ou dans les surnageants de co-culture des lymphocytes T CD4⁺ ou T CD8⁺ avec des CD autologues.

4.2. Etapes de marquage

Les différentes étapes de la technique CBA sont les suivantes : des billes fluorescentes et couplées aux Ac anti-cytokines cibles sont incubées avec les différents échantillons. En parallèle, une gamme étalon de dilution géométrique d'ordre 2 est réalisée pour chacune des cytokines ciblées. Les différents anticorps anti-cytokines présents sur les billes interagissent alors avec les cytokines de l'échantillon dont ils sont spécifiques. Après une heure d'incubation, la présence des cytokines à la surface des billes est révélée après une seconde incubation d'une heure en présence d'une suspension d'Ac de détection spécifiques des différentes cytokines à doser. Chaque cytokine est ainsi prise en sandwich entre l'Ac spécifique couplé aux billes et l'Ac spécifique de détection (**Figure 40**). Après deux lavages, l'analyse et le dosage des cytokines d'intérêt sont réalisés par cytométrie en flux.

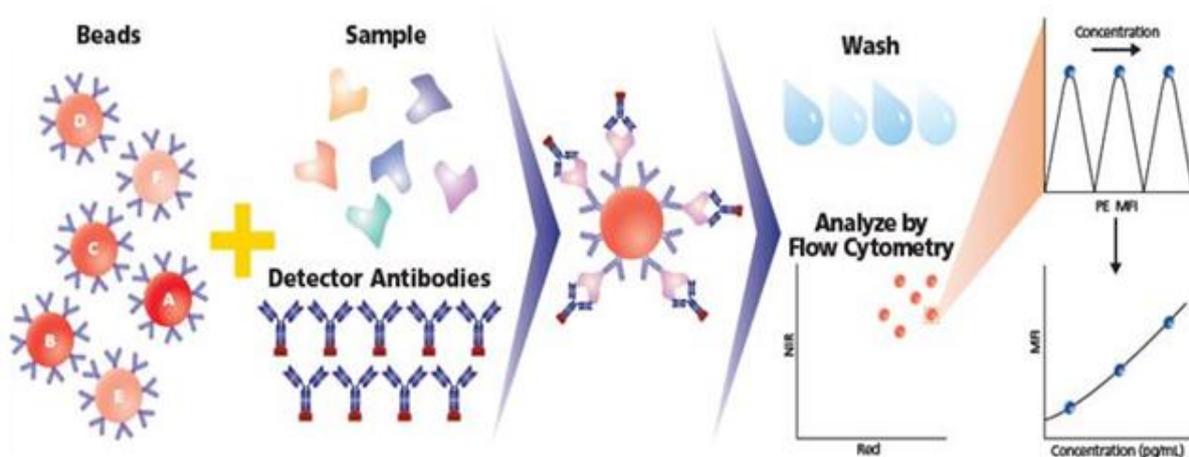


Figure 40 : Différentes étapes de la technique CBA (Flex Set, BD biosciences)

4.3. Analyse des résultats

La technique de CBA est rendue quantitative grâce à l'utilisation d'une gamme étalon pour chacune des cytokines à doser. Pour cela, à partir d'une suspension contenant 2500 pg/mL de chacune des trois cytokines d'intérêt (IFN- γ , IL-4 et IL-17a) neuf dilutions successives de raison géométrique d'ordre 2 sont réalisées. Les différents tubes de la gamme étalon sont traités en parallèle des échantillons à tester selon le principe décrit ci-dessus. L'analyse de la gamme étalon par cytométrie en flux permet d'identifier, sur une représentation bi-paramétrique des intensités de fluorescence APC et APC-Cy7, les trois populations de billes spécifiques des trois cytokines à doser (**Figure 41A**). Sur chacune des populations identifiées, une analyse de l'intensité de la fluorescence PE est réalisée. La quantité de cytokine présente dans les différents tubes de la gamme est directement proportionnelle à l'intensité de fluorescence PE. Les résultats sont exprimés sous la forme d'un histogramme où les intensités de fluorescence sont présentées en abscisse et le nombre

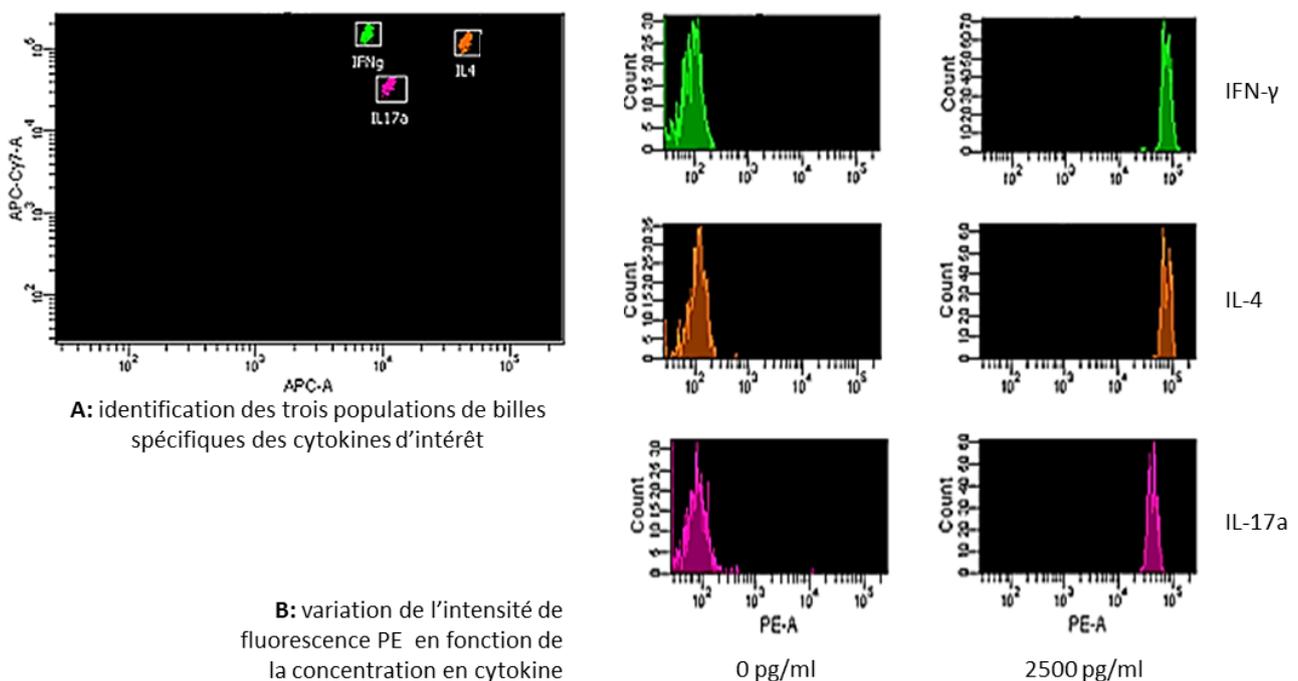


Figure 41 : Identification des populations de billes spécifiques des cytokines à des concentrations différentes

de billes analysées en ordonnée. Plus la concentration en cytokine est importante et plus l'histogramme se déplace sur la droite de la représentation (**Figure 41B**).

Après acquisition de l'ensemble des données de fluorescence de chacune des gammes étalons, une courbe d'étalonnage spécifique de chaque cytokine est obtenue après traitement des données acquises par le logiciel dédié FCAP Array Software v3 (BD biosciences). Le logiciel permet, à partir des concentrations connues des cytokines et des intensités de fluorescence associées à ces concentrations, d'établir une droite de corrélation basée sur le calcul de régression linéaire par la méthode des moindres carrés. Dans un tel modèle de corrélation, plus le coefficient de corrélation linéaire R au carré (R^2) est proche de 1 (soit 100

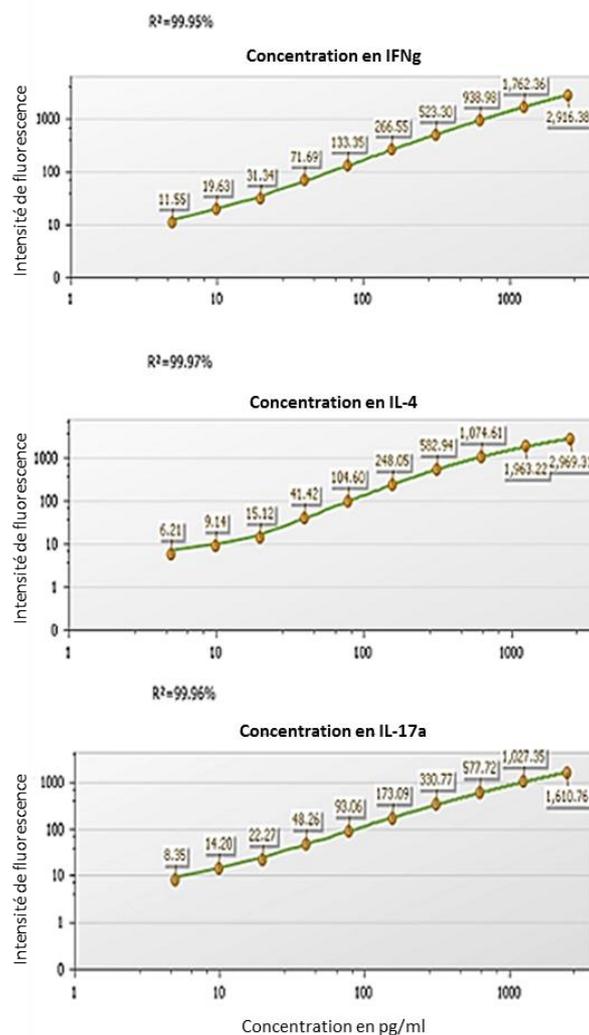


Figure 42 : Courbes d'étalonnage des cytokines

%) plus la corrélation obtenue entre les intensités de fluorescence et la concentration est forte. Comme on peut le voir sur la **Figure 42**, pour chacune des courbes d'étalonnage obtenue, R^2 avoisine 0,999 soit plus de 99% de corrélation. La qualité des courbes d'étalon obtenues pour chacune des cytokines permet de valider l'approche expérimentale et de poursuivre l'analyse des données obtenues à partir des différents surnageants de culture testés.

RESULTATS

Elastin receptor (S-gal) occupancy by elastin peptides modulates T cell response during murine emphysema

L'inflammation chronique associée à la BPCO est caractérisée par une augmentation du nombre de cellules inflammatoires et immunitaires dans les voies aériennes, le parenchyme pulmonaire, et le système vasculaire pulmonaire des patients. L'activation des cellules inflammatoires au cours de la BPCO, et en particulier des polynucléaires neutrophiles, conduit à la sécrétion de nombreuses protéases qui participent à l'installation et à l'entretien de la réponse inflammatoire chronique, la genèse des lésions tissulaires observées au cours de la pathologie, et à la dégradation des fibres élastiques, ce qui génère des peptides solubles d'élastine (PE) doués d'activités biologiques. Les taux élevés de PE dans les liquides biologiques des patients atteints de BPCO sont corrélés avec la sévérité de la maladie. Par ailleurs, plusieurs données de la littérature démontrent le rôle des lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ dans le développement et la progression de la BPCO chez l'homme, et rapportent une corrélation entre l'augmentation de la proportion de ces cellules dans les lavages broncho-alvéolaires et le parenchyme pulmonaire, et la sévérité de la maladie. De même, plusieurs modèles d'emphysème murin décrivent une augmentation du nombre de lymphocytes T au niveau pulmonaire, et des souris ayant subi une déplétion sélective des cellules T CD4⁺ sont protégées contre la destruction du parenchyme pulmonaire et le développement d'un emphysème.

Des études préalables réalisées au sein de l'EA4683 ont permis de mettre en évidence le récepteur à l'élastine à la surface des lymphocytes T, et de démontrer que l'interaction des PE avec leur récepteur spécifique orientaient la réponse T vers un profil de type Th1.

Sur la base du modèle d'emphysème murin mis au point dans le laboratoire, nous avons instillé l'hexapeptide d'élastine VGVAPG à des souris, et nous avons évalué à 21 jours après instillation, c'est-à-dire à un stade où l'animal développe un emphysème expérimental, le niveau d'expression et la production des cytokines spécifiques des sous-types Th1/Tc1 (IFN- γ), Th2/Tc2 (IL-4), et Th17/Tc17 (IL-17) au niveau des lymphocytes T CD4⁺ et des lymphocytes T CD8⁺ isolés des poumons, des ganglions médiastinaux (mLN) et de la rate.

Les principaux résultats obtenus au cours de cette étude sont les suivants :

1/ L'emphysème pulmonaire induit par l'instillation du VGVAPG est associé à une augmentation du niveau d'expression des cytokines IFN- γ et IL-17, et des facteurs de transcription T-bet et ROR γ t par les cellules T CD4⁺ pulmonaires, ganglionnaires et spléniques. Cette augmentation s'accompagne, dans les trois tissus, d'une augmentation concomitante de l'expression d'IFN- γ et de son facteur de transcription par les cellules T CD8⁺. Les souris ayant reçu de l'élastase pancréatique porcine (PPE) et qui développent un emphysème de référence 21 jours après l'instillation, montrent également un profil cytokinique de type Th1 (IFN- γ), Th17 (IL-17a) et Tc1 (IFN- γ).

2/ Les lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ triés à partir des rates des souris instillées, soit avec le peptide VGVAPG soit avec la PPE, expriment des niveaux plus élevés d'IFN- γ (à la fois pour les LT CD4⁺ et les LT CD8⁺) et d'IL-17a (pour les LT CD4⁺) après stimulation CD3/CD28 en présence de PE dans le milieu de culture, par comparaison avec les mêmes cellules mais stimulées en l'absence de PE. Ces résultats reflètent la capacité des PE à potentialiser l'activation des cellules Th1, Th17 et Tc1 *in vitro*.

3/ La co-instillation des souris avec un peptide antagoniste du récepteur à l'élastine (peptide PGAIP) et le peptide VGVAPG, bloque la capacité du peptide VGVAPG à polariser la réponse lymphocytaire T vers un profil de type Th1, Th17 et Tc1. Ce résultat confirme que les effets des PE sur la polarisation des cellules T CD4⁺ et des cellules T CD8⁺ au cours de l'emphysème sont la conséquence de l'interaction du peptide VGVAPG avec son récepteur spécifique exprimé à la surface des cellules

Les résultats obtenus dans ce travail montrent clairement la capacité des peptides d'élastine générés au cours de la BPCO à participer à la polarisation des cellules T helper vers un phénotype Th1 et Th17 et des cellules T cytotoxiques vers un profil Tc1. Cette polarisation, qui est dépendante de l'interaction PE/récepteur à l'élastine à la surface des lymphocytes T CD4⁺ ou à la surface des lymphocytes T CD8⁺, est contrôlée par des peptides antagonistes du récepteur à l'élastine dont l'activité pharmacologique pourrait être retenue pour inhiber les effets délétères de l'IFN- γ et de l'IL-17 au niveau pulmonaire.

Elastin receptor (S-gal) occupancy by elastin peptides modulates T cell response during murine emphysema

Aïda Meghraoui-Kheddar,¹ Alexandre Pierre,¹ Mehdi Sellami,¹ Sandra
Audonnet,² Flora Lemaire,¹ Richard Le Naour¹

Author contributions: A.M-K., A.P. and R.L.N. have 1) contributed to conception and design, 2) analyzed and interpreted data, 3) drafted the article and 4) approved the final version to be published. A.M-K., A.P., M.S. and F.L. have performed experiments. S.D. has 1) analyzed flow cytometry data and 2) critically revised the manuscript. All authors have approved the manuscript submission.

Affiliations: ¹EA4683, SFR CAP-Santé, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France. ²Plateau technique de cytométrie en flux, Plateforme Santé, URCA, Reims, France.

Running head: Elastin-dependent T cell response during murine emphysema

Address for reprint requests and other correspondence: Richard Le Naour, EA4683 "Immunité Adaptative et Fonctionnalité des Barrières Biologiques", UFR de Pharmacie, 1 rue du Maréchal Juin 51096 Reims cedex, France. E-mail: richard.lenaour@univ-reims.fr

Accepted in *"American Journal of Physiology, Lung Cellular and Molecular Physiology"*, July 2017

ABSTRACT

Chronic obstructive pulmonary disease and emphysema are associated with increased elastin peptides (EP) production due to excessive breakdown of lung connective tissue. We recently reported that exposure of mice to EP elicited hallmark features of emphysema. EP effects are largely mediated through a receptor complex which includes the elastin-binding protein S-gal. In previous studies, we established a correlation between cytokine production and S-gal protein expression in EP treated immune cells. In this study, we investigated the S-gal-dependent EP effects on T helper (Th) and T cytotoxic (Tc) responses during murine EP-triggered pulmonary inflammation. C57BL/6J mice were endotracheally instilled with the VGVAPG elastin peptide and 21 days after treatment, local and systemic T lymphocyte phenotypes were analyzed at cytokine and transcription factor expression levels by multicolor flow cytometry. Exposure of mice to the VGVAPG peptide resulted in a significant increase in the proportion of the CD4⁺ and CD8⁺ T cells expressing the cytokines IFN- γ or IL-17a and the transcription factors Tbet or ROR γ t without effects on IL-4 and Gata3 expression. These effects were maximized when each T cell sub-population was challenged *ex vivo* with EP and they were inhibited *in vivo* when an analogous peptide antagonizing the EP/S-gal interactions was instilled together with the VGVAPG peptide. This study demonstrates that during murine emphysema, EP/S-gal interactions contribute to a Th-1 and Th-17 pro-inflammatory T cell response combined with a Tc-1 response. Our study also highlights the S-gal receptor as a putative pharmacological target to modulate such an immune response.

Keywords: murine model, VGVAPG, T lymphocytes, IFN- γ , IL-17

INTRODUCTION

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD), one of the leading health issues worldwide, is characterized by a progressive airflow limitation that is associated with a chronic inflammatory response in the airways. This persistent inflammatory state may induce pulmonary emphysema and small airway fibrosis (41). Whereas neutrophils and macrophages have been described as key effector cells involved in COPD pathogenesis, recent studies have emphasized on the role of other immune cells such as NK cells (40), NKT cells (11) and T lymphocytes in the pulmonary inflammation process and emphysema development. Focusing on T cells, numerous studies reported the presence of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in both airways and parenchyma during COPD (14, 15, 30) and the relationship between increase in these cell populations and a greater disease severity (7, 8, 18). Increase of T helper (Th)-1 (17, 24), Th-2 (3, 31) or Th-17 (8, 36) cytokine expression was described in peripheral blood, broncho-alveolar lavages (BAL) or intraepithelial COPD-associated T cells. It is now accepted that emphysema is partly driven by pathogenic T cells inducing inflammatory damages, but the critical role of CD4⁺ Th cells versus CD8⁺ T cytotoxic (Tc) cells in emphysema remains controversial and their orientation in COPD is still unclear.

In COPD patients, a massive proteases production by lung-infiltrating inflammatory cells was described (26), supporting the protease/antiprotease imbalance theory during the pathology (27). Some of these proteases promote degradation of pulmonary elastin (23). Accordingly, an increased secretion of desmosine, a specific marker for elastin degradation (13), and elevated levels of soluble elastin peptides (EP) in various biological fluids of COPD patients reflect massive pulmonary elastin breakdown (9, 32). In emphysematous animal models, circulating EP are associated with the lysis of nearly 60% of pulmonary elastic fibers (13). EP produced in significant amounts during proteolytic degradation of lung share miscellaneous biological activities, predominantly chemotactic activities (35) and protease

release (9) that are directly involved in propagation and maintenance of inflammation associated with emphysema.

EP exhibit a wide range of biological activities (9, 12, 35) that can be attributed in their whole to the VGVAPG hexa-peptide, a peptide sequence repeated several times in the elastin monomer and the major ligand for the high affinity binding site of a receptor complex that includes a 67-kDa elastin-binding protein which is an enzymatically inactive spliced variant of β -galactosidase called Spliced-galactosidase (S-gal) (16). In immune cells, we previously demonstrated that EP/S-gal interactions modulate expression of pro-inflammatory cytokines in monocytes (1) and promote a pro-inflammatory Th-1 response in stimulated human peripheral blood lymphocytes (5). Moreover, the immunogenicity of EP was investigated during COPD and anti-elastin B-cell response was reported (22). The emergence of auto-reactive T cell clones was also described during emphysema (44) and recently reported in COPD patients (4). Interestingly, we defined in our last works a correlation between EP/S-gal interactions and alteration of neutrophil functions in COPD patients (9) or induction of emphysema-like phenotype in EP-treated mice (34).

Since EP/S-gal interactions regulate T cell response and promote development of emphysema process, we here hypothesized that such an interaction may be also involved in the emphysema-associated CD4⁺ and CD8⁺ T cell response. In this study, we demonstrated that in mice Th-1, Th-17 and Tc-1 pro-inflammatory responses observed during EP-induced emphysema could be modulated using S-gal-specific antagonist peptides.

MATERIALS AND METHODS

Animal procedure. Six-week old C57BL/6J female mice purchased from Harlan Sprague Dawley (Harlan Laboratories, Gannat, France) were housed in an animal facility that was maintained at 22-26°C with 40-69% humidity and a 12-h light/dark cycle. Animals were fed with a commercial diet and received water *ad libitum*. Animals were humanely cared for, and all animal experiments were approved by the University of Reims Champagne-Ardenne Institutional Animal Care and Use Committee and were carried out in accordance with institutional guidelines and regulations. After appropriate sedation, mouse lungs were endotracheally instilled with either PBS, or one unit (7.4 µg) porcine pancreatic elastase (PPE) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), or 10 µg VGVAPG (Genepep SA, Saint Jean de Védas, France), or 10 µg PGAIP (Genepep SA) via a 22-gauge i.v. catheter in a total volume of 50 µl PBS as previously described (34). In some experiments, we co-administrated the analogous antagonist peptide PGAIP to VGVAPG-recipient mice or to PPE-recipient mice to evaluate the capacity of this peptide to neutralize the VGVAPG- or PPE-induced T cell response. In these experiments, animals received 50 µl of PBS containing a single mixture of VGVAPG (10 µg) and PGAIP (10 µg), or PPE (7.4 µg) and PGAIP (10 µg) at time 0 and were sacrificed on the 21st day. Animals were sacrificed on days 2 and 21. At day 2, bronchoalveolar lavage fluids (BALF) were recovered to analyse cell profiles. At day 21, BALF were also recovered to determine desmosine concentrations. At the same time, lungs, mediastinal lymph nodes (mLN) and spleens were recovered to investigate the profile of the tissue specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells. Peripheral blood of mice was collected by cardiac puncture and *sera* stored at -80°C for further measurement of circulating desmosine concentration. Then, the pulmonary and systemic circulation of euthanized mice was perfused with sterile PBS to remove the intravascular pool of cells. Spleen was dissected away from the surrounding tissue, and mLN were then collected. Lungs were carefully separated from

thymic, cardiovascular remnants and main bronchi and trachea. Lungs from appropriate mice were also inflated, removed and embedded in paraffin to allow morphological and elastin/collagen network analysis.

Synthesis, purification and characterization of EP. Synthesis of the elastin peptides used in this study (VGVAPG and PGAIPG) was performed by Genepep (Genepep SA, Saint Jean de Védas, France). Crude peptides were purified by RP-HPLC on a semi-preparative C18-bonded silica column using a Shimadzu SPD 10A UV/VIS detector, with detection at 210 and 254 nm. The column was perfused at a flow rate of 3 ml/min with solvent A (10%, v/v, water in 0.1% aqueous TFA), and a linear gradient from 10 to 90% of solvent B (80%, v/v, acetonitrile in 0.1% aqueous TFA) over 40 min was adopted for peptide elution. Analytical purity and retention time of each peptide were determined using HPLC conditions in the above solvent system (solvents A and B). All analogous peptides showed >98% purity when monitored at 215 nm. Homogeneous fractions, as established using analytical HPLC, were pooled and lyophilized. Peptides molecular weights were determined by ESI mass spectrometry. ESI-MS analysis was made in positive ion mode. The sample was dissolved in a mixture of water and methanol (50/50) and injected directly into the electrospray source, using a syringe pump, which maintains constant flow at 5 μ l/min. The temperature of the capillary was set at 220 °C. All peptides used in this study were solubilized or diluted in PBS.

Broncho-alveolar lavage. The trachea was inserted with a 22-gauge i.v. catheter, and the whole lungs were washed three times with 1 ml PBS. BALF was centrifuged at 300 x g for 10 min at +4°C, and the supernatant was collected and stored at -80°C until required. Cell pellet was resuspended in 1 ml of PBS, and cell count was performed. Cell viability was more than 95% as determined by trypan blue exclusion. Aliquots of cells were then stained with fluorescent mAb specific for leucocytes (CD45, BD Biosciences, Le pont de Claix, France), neutrophils (Ly6G, BD Biosciences), macrophages (Mac3, BD Biosciences), B lymphocytes

(CD19, BD Biosciences), and T lymphocyte sub-populations (CD3, CD4 and CD8, BD Biosciences). Flow cytometry analysis was performed and absolute number in cell populations was calculated.

Lung tissue preparation. The lungs were inflated for 10 min at a constant pressure of 25 cm H₂O in the presence of 10% neutral buffered formalin solution (Sigma-Aldrich) and then removed. Formalin inflated lungs were fixed in 4% PFA for 24 h at room temperature before embedding in paraffin. Then, transverse 3- μ m or 20- μ m sections of lung were cut for morphological or collagen and elastin network analysis, respectively.

Lung, mLN and spleen cell preparation and culture. Lungs were thoroughly chopped in using iridectomy scissors and incubated in digestion medium (Mac's Miltenyi Biotec, Paris, France) for 30 min at 37°C under permanent agitation of 60 rpm. Lung fragments were resuspended in fresh digestion medium, passed through a successive 70- μ m and 40- μ m cell strainers and centrifuged. Red blood cells were then lysed using RBC Lysis Solution (Miltenyi Biotec) and washed with X-VIVO 15 serum free medium (Lonza, Verviers, Belgium). mLN were passed through a 70- μ m cell strainer, using a 1 mL syringe plunger, and washed in X-VIVO 15 serum free medium (Lonza). Spleens were also passed through a successive 70- μ m and 40- μ m cell strainers, using a 5 mL syringe plunger-and washed twice. The CD45⁺ leucocytes were isolated from lung single-cell suspensions by immuno-magnetic positive selection using mouse anti-CD45 microbeads according to the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec). Cell purity and viability were respectively over 98% and 90% as determined by flow cytometry analysis. Phenotypic analysis of mLN single-cell suspensions by flow cytometry revealed over 90% of CD45⁺ cells, so no sorting were performed. CD4⁺ and CD8⁺ T cells were separately isolated from spleen single-cell suspensions by immuno-magnetic depletion using mouse CD4⁺ Isolation Kit II and CD8⁺ T cell Isolation Kit respectively, according to the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec).

Cell purity and viability were respectively over 90% and 95% as determined by flow cytometry analysis. CD45⁺ leucocytes either from lungs or mLN were cultured in 96-well culture plates (4×10^6 cells/ mL) and incubated with Dynabeads mouse T-activator beads (Invitrogen, Illkirch, France) coated with antibodies against CD3 and CD28. Isolated CD4⁺ and CD8⁺ splenic T cells were cultured in 48-well culture plates (2×10^6 cells/mL) and incubated with Dynabeads mouse T-activator beads (Invitrogen) in the presence or not of the VGVAPG peptide (20 µg/ mL) or an elastin peptide mixture (EPM) obtained by the digestion of lung elastic fibers with neutrophil elastases (Elastin Products Co., Owensville, MO, USA). After 48 h incubation, stimulated cells from lungs, mLN and spleens were stained and analyzed by flow cytometry.

Morphological analysis. Serial mid-sagittal sections (3-µm thick) stained with Hematoxylin Phloxin Safran were used for morphological analysis. Ten randomly selected (100x) fields per slide were photographed using the ZEN imaging software (Carl Zeiss SAS, Marly-Le-Roi, France). The images were analyzed using the Image J software (NIH, Bethesda, MD, USA). From each fields ten areas of interest, free of airways and muscular blood vessels, were picked for measurement of the number of intersections of virtual lines of known length, with alveolar septa. An increase in the average distance between intercepts (mean linear intercept) indicates enlarged airspaces.

Collagen and elastin network acquisition and quantification. Serial unstained mid-sagittal sections (20-µm thick) were used for the simultaneous visualization of collagen and elastin in lung tissue section based on collection of second-harmonic generation (SHG) and two photons excited fluorescence (2PEF) signals, respectively, as described previously (34). Volume ratio of elastin and collagen structures were computed in term of the voxel volumes as previously described (34). The volume fraction estimation of elastin and collagen structures was performed after 3D reconstruction images from 2PEF/SHG data sets processing with the

Imaris software (Bitplane AG, Zurich, Switzerland). The ratio index, calculated in order to evaluate the elastin destruction in lung tissue, is defined as follow: Ratio index = $(E_v - C_v)/(E_v + C_v)$, where E_v and C_v represent elastin and collagen voxel volumes, respectively. This ratio index approaches maximum value of +1 when only elastin is present, and this ratio index approaches minimum value of -1 when only collagen is present. This ratio index therefore provides an estimation of the extent of ECM remodeling in terms of collagen and elastin voxel volumes in the lung tissues undergoing emphysematous destruction.

Quantification of cytokine secretion. Determination of IFN- γ , IL-17a and IL-4 concentrations in the cell culture supernatants of stimulated CD4⁺ and CD8⁺ splenic T cells was performed using commercially available Cytometric Bead Array (CBA) Flex Set technology (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions. CBA Flex Set capture bead is a single bead population with distinct fluorescence intensity and is coated with a capture antibody specific for a soluble protein. Preparation of samples was done according to the manufacturer's instructions. Briefly, serial dilutions (1/2, v/v) of the standard preparations were prepared whereas culture supernatants were used undiluted. Then, 50 μ L of mixed capture beads were added to each sample. After 1 h incubation period at room temperature, 50 μ L of PE detection reagent was added and samples were incubated for another 1 h at room temperature. Samples were then washed twice at 400 x g for 10 min and 150 μ L wash buffer was added. Flow cytometry analysis was performed using BD LSRFortessa cell analyzer and CBA analysis FCAP software (BD Biosciences). A total of 700 events were acquired per analyte. The minimum detection level for each cytokine was 0.5 pg/mL, 0.95 pg/mL and 0.3 pg/mL for IFN- γ , IL-17a and IL-4, respectively.

Desmosine quantification. Determination of desmosine concentrations in BAL fluids and sera was performed in triplicate using a commercially available ELISA kit (Cusabio Biotech product, Interchim, Montluçon, France) according to manufacturer's instructions. The

sensitivity of ELISA kit was 0.78 pg/ml.

Flow cytometry analysis. Analysis of the surface antigens, intracellular cytokine and intranuclear transcription factor expressed on stimulated CD45⁺ leucocytes or sorted lymphocytes isolated from BALF, lung, mLN or spleen were performed using antibodies listed in Table 1 and at a target concentration determined from dose/effect specific curves. Cells were treated with Cytofix / CytoPerm or Transcriptional Factor buffer set (BD Biosciences) before incubation with intracytoplasmic antibodies or intranuclear antibodies respectively. Whatever the experimental conditions used, incubation with antibodies was performed during 20 min at +4°C and in the dark. Following two successive centrifugations (300 x g, 10 min), pellets of stained cells were resuspended in 300 µL PBS containing 1% PFA, and stored in the dark at +4°C until analysis (at the latest 72 h after staining). In all protocols, fluorescence emission was assessed by flow cytometry using BD LSRFortessa (BD Biosciences) cell analyzer and BD Diva (BD Biosciences) and FlowJo (FlowJo, Ashland, USA) softwares. As compensation controls, OneComp eBeads were used (Biosciences Company, Paris, France) and isotype controls of each monoclonal antibody and fluorescence minus one tubes were used to assess negative population.

Statistical analysis. Data are presented as means±SEM. Difference among groups was analyzed using one-way ANOVA followed by the Bonferroni *post hoc* test. For all analyses, a *p* value < 0.05 was considered statistically significant. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism (GraphPad software San Diego, CA, USA).

Table 1. *Antibodies list*

Marker	Fluorochrom	Clone	Provider	Cell target
Zombie red fixable viability dye			Biolegend	Dead cells
CD45	AF700	30-F11	BD Bioscience	Leucocytes
TCR β	PerCPCy5.5	H57-597	BD Bioscience	T lymphocytes
CD8a	BV510	53-6.7	BD Bioscience	Tc lymphocytes
CD4	APCH7	GK1.5	BD Bioscience	Th lymphocytes
CD25	PECy7	PC61	BD Bioscience	Activated T cells
IFN- γ	FITC	XMG1.2	BD Bioscience	Th1/Tc1 lymphocytes
IL-17A	PE	TC11-18H10	BD Bioscience	Th17/Tc17 lymphocytes
IL-4	BV421	11B11	BD Bioscience	Th2/Tc2 lymphocytes
T-bet	PE	O4-46	BD Bioscience	Th1/Tc1 lymphocytes
ROR γ t	BV421	Q31-378	BD Bioscience	Th17/Tc17 lymphocytes
GATA-3	AF488	L50-823	BD Bioscience	Th2/Tc2 lymphocytes
FoxP3	AF647	MF23	BD Bioscience	Treg cells
CD3e	PECy7	145-2C11	BD Bioscience	T lymphocytes
CD19	FITC	1D3	BD Bioscience	B lymphocytes
Ly6G	APC	1A8	BD Bioscience	Neutrophils
Mac3	PE	M3/84	BD Bioscience	Macrophages

RESULTS

The VGVAPG peptide-induced emphysema is associated with an early CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocyte infiltrate in BALF. We previously demonstrated that mice instilled with VGVAPG, an elastin hexa-peptide, exhibited lung accumulation of inflammatory cells (macrophages and neutrophils), high concentration of desmosine in BALF and emphysematous structural changes similar to those observed following endotracheal administration of PPE (34). Here, we examine the lymphocyte cell infiltration in the BALF of EP-exposed mice. Two days after exposure to one single dose of the VGVAPG peptide (10µg) delivered into the trachea of WT C57BL/6J mice, flow cytometry analysis of BALF was performed and absolute number of cells was calculated. As expected, total cells in the BALF of VGVAPG-treated mice were found to be at least threefold higher than BALF total cells of PBS-treated group, with a majority of macrophages and neutrophils (Fig. 1A). A significant increase of infiltrating T lymphocytes through CD4⁺ and CD8⁺ T cell subpopulations was also observed in VGVAPG-instilled mice when compared to control group. This result was also obtained following administration of a single dose of PPE (7.4µg). VGVAPG-dependent cellular accumulation in BALF was associated at day 21 to histological characteristics of emphysema. A breakdown of elastin and collagen fibers was observed in lung tissue (Fig. 1B) and confirmed by decrease of the ratio index that provides a quantification of the extent of extracellular matrix remodelling in terms of elastin and collagen structures (Fig. 1C). Extracellular matrix remodeling after 21 days was accompanied by significant airspace enlargement (Fig. 1D) as revealed by increase of mean linear intercept values representative of the alveolar space size (Fig. 1E). The elastin fibers breakdown related to VGVAPG administration was also confirmed at day 21 by the increase of desmosine concentration in BAL fluids and *sera* compared to control condition. The desmosine levels were similar between VGVAPG and PPE groups (Fig. 1F).

Figure 1

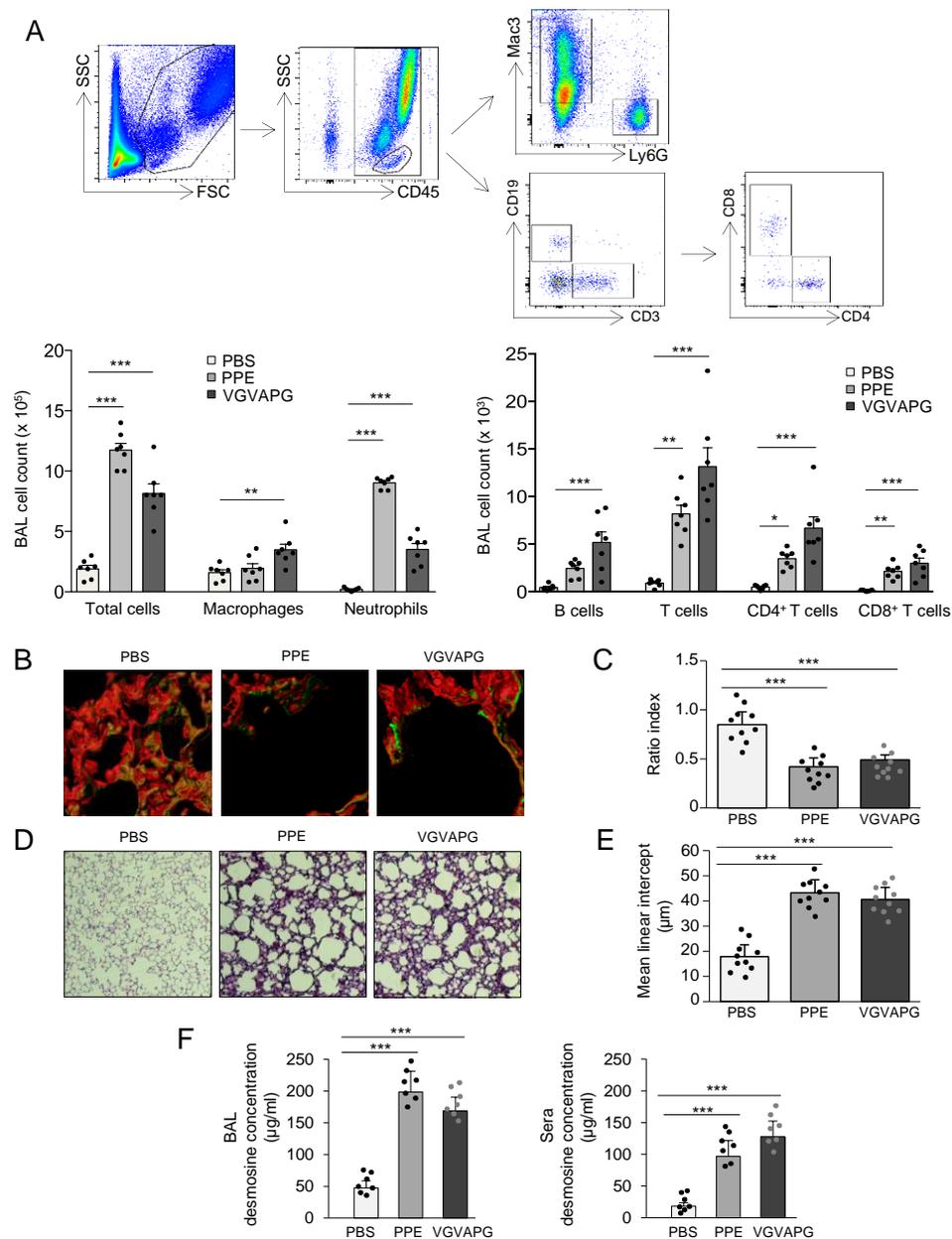


Fig.1. Increased number of T lymphocyte subpopulations in the cell infiltrate observed during VGVAPG-dependent emphysema. *A*: flow cytometry analysis and specific cell count in the BALF of mice 2 days-exposed to PBS, PPE (7.4 $\mu\text{g/ml}$) or VGVAPG (10 $\mu\text{g/ml}$). *B*: auto-fluorescent analysis of elastin and collagen fibers organization in the lungs of mice at day-21 (63x). *C*: ratio index of the elastin-to-collagen structures measured from a 3D mapping of lung extracellular matrix components performed at day-21. *D*: morphological representation of Hematoxylin Phloxin Safran-stained lung sections obtained from mice at day-21 (100x). *E*: mean linear intercept measured from Hematoxylin Phloxin Safran-stained lung sections performed at day-21. *F*: desmosine concentrations measured in BAL fluids and sera collected from mice at day-21 following PBS, PPE or VGVAPG instillation. In these experiments, $n = 7$ to 16 mice per group. Photomicrographs are representative of three separate experiments and data represent mean of values from four separate experiments \pm SEM. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

The VGVAPG peptide induces a local and systemic Th-1/Th-17 and Tc-1 response during murine emphysema. We next examined at day 21 the levels of type 1 (IFN- γ), type 2 (IL-4) and type 17 (IL-17a) cytokines expressed by CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes either locally (lung tissue and mLN) or at systemic level (spleen). Flow cytometry analysis of anti-CD3/CD28-activated CD4⁺CD25⁺ T cells showed that, in all three tissue types, expression of intracellular IFN- γ or IL-17a was significantly higher in VGVAPG-treated mice than in PBS-treated mice, whereas intracellular IL-4 expression was not altered by VGVAPG treatment (Fig. 2A). Interestingly, the proportion of CD4⁺CD25⁺ T cells expressing IFN- γ was constantly greater than the proportion of T cells expressing IL-17a in the two mice groups. Th-1 and Th-17 differentiation are driven by the transcription factors T-bet (39) and ROR γ t (20), respectively. We found that expression of the transcription factors T-bet or ROR γ t by activated CD4⁺CD25⁺ T cells was stronger in lung tissue, mLN and spleen after VGVAPG treatment (Fig. 2B). As expected, exposure to VGVAPG did not affect expression of the type-2 specific transcription factor GATA3 by activated CD4⁺CD25⁺ T cells (Fig. 2B). A significant increase of IFN- γ and T-bet transcription factor was also observed in activated CD8⁺CD25⁺ T cells isolated from lung, mLN or spleen of VGVAPG instilled mice (Fig. 3A and 3B). In contrast, exposure to VGVAPG did not impact the expression of neither IL-17a and IL-4 intracellular cytokines nor ROR γ t and GATA3 transcription factors in these cells (Fig. 3A and 3B). Similar results were obtained after endotracheal administration of PPE (Fig. 2 and Fig. 3). Consistent with both intracellular and intra-nuclear analysis of activated splenic T cells, CBA assay showed an important IFN- γ and, to a lesser extent, IL-17a cytokine production by stimulated CD4⁺ splenic T cells isolated from VGVAPG- or PPE-treated groups, whereas no difference was observed in CD4⁺ T cell-derived IL-4 production whatever the group analysed (Fig. 4A). Likewise, a massive production of IFN- γ was detected after

anti-CD3/CD28 stimulation of splenic CD8⁺ T cells isolated from either VGVAPG or PPE emphysematous mice (Fig. 4B).

Figure 2

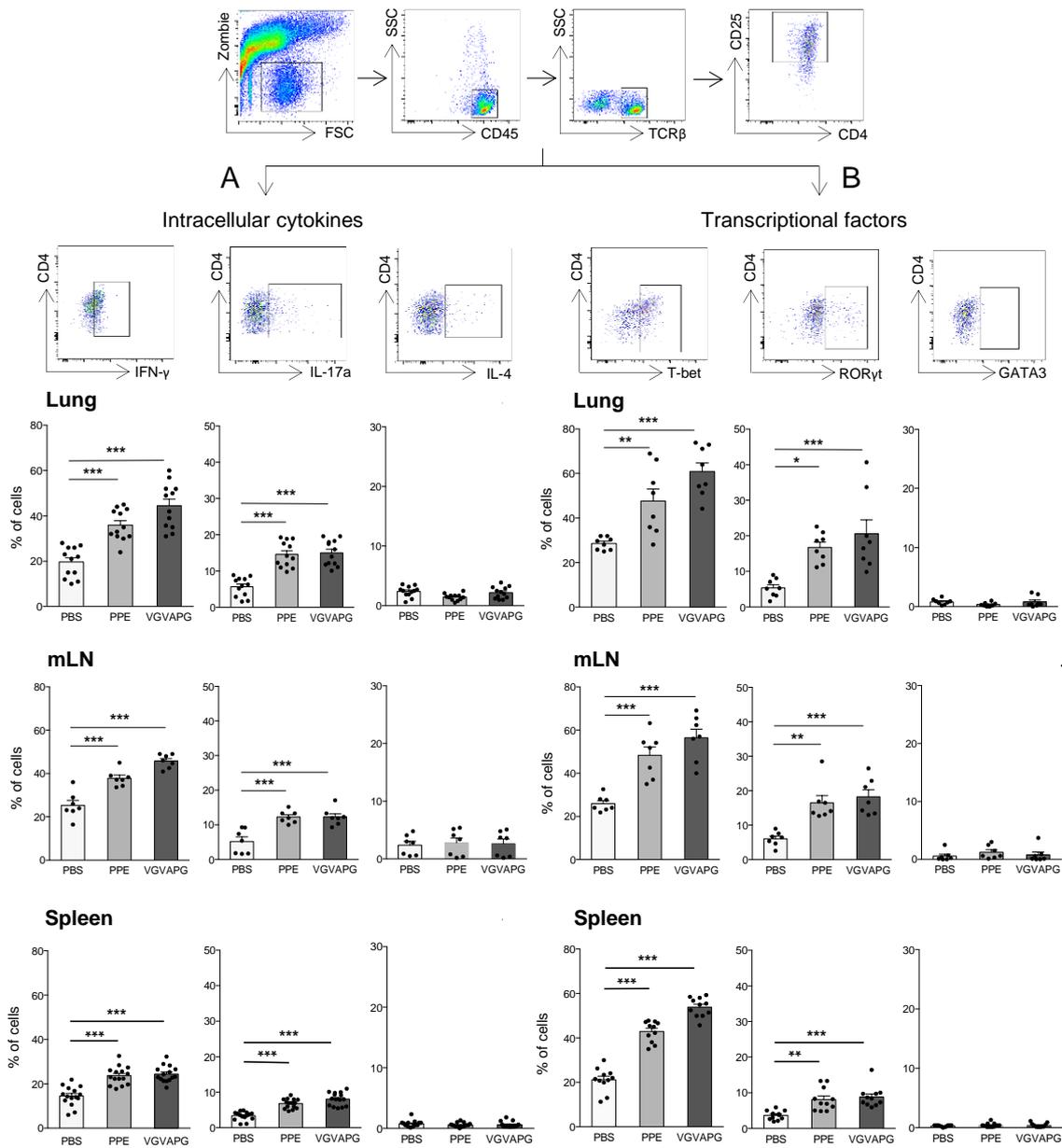


Fig.2. Exposure of mice to VGVAPG increases the proportion of CD4⁺ T cells expressing IFN- γ and IL-17a in lung, mLN and spleen. Flow cytometry analysis of intracellular cytokine expression (IFN- γ , IL-17a and IL-4) (A) and transcription factor expression (T-bet, ROR γ t and GATA3) (B) performed after anti-CD3/CD28 stimulation of CD45⁺ T cells from lung, mLN and spleen of mice 21 days-exposed to PBS, PPE or VGVAPG. Values are expressed as percentage of activated CD4⁺CD25⁺ T cells expressing each cytokine or transcription factor. In these experiments, n = 7 to 15 mice per group and data represent mean of values from four separate experiments \pm SEM. *** p < 0.001, ** p < 0.01, * p < 0.05.

Figure 3

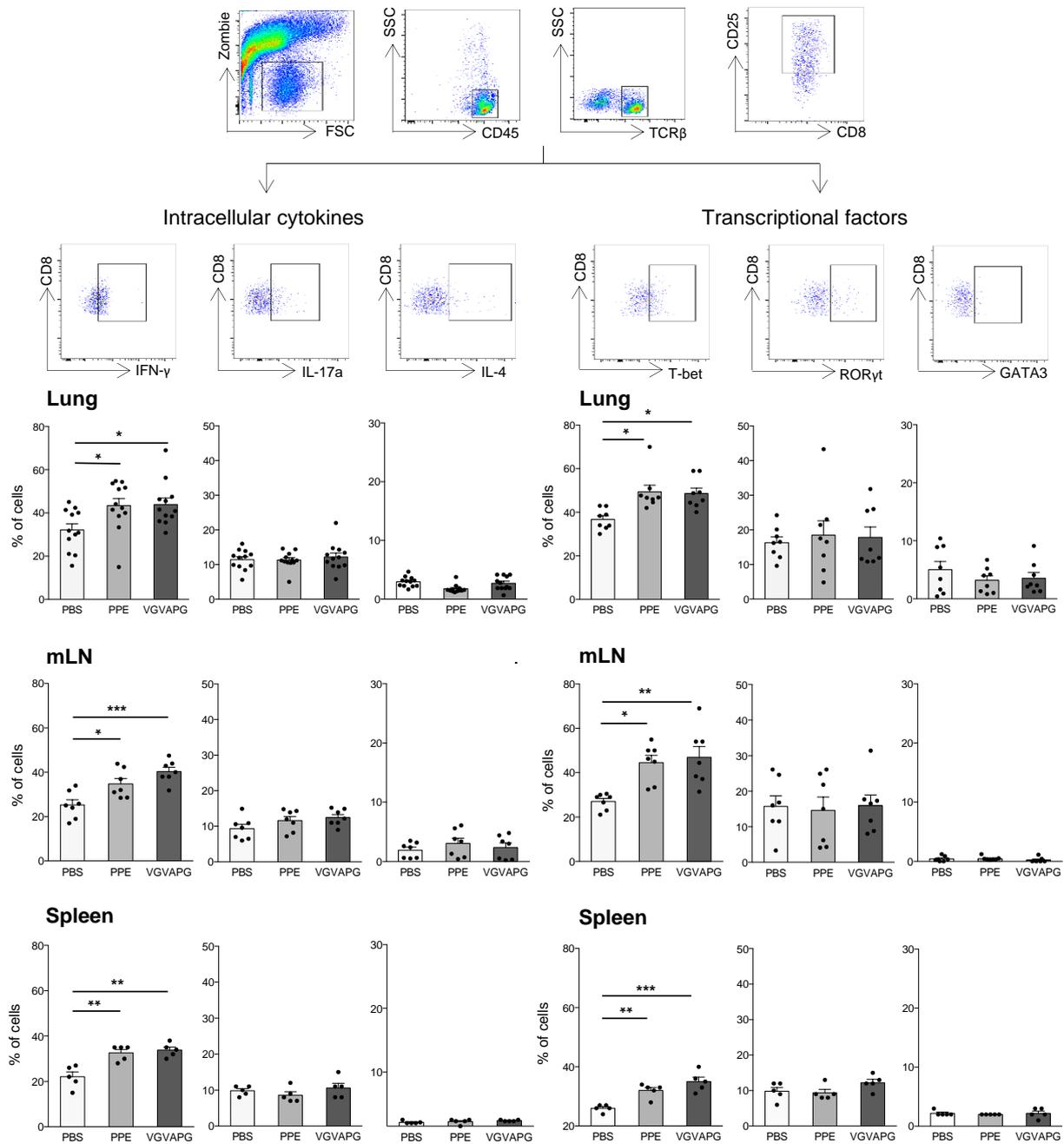
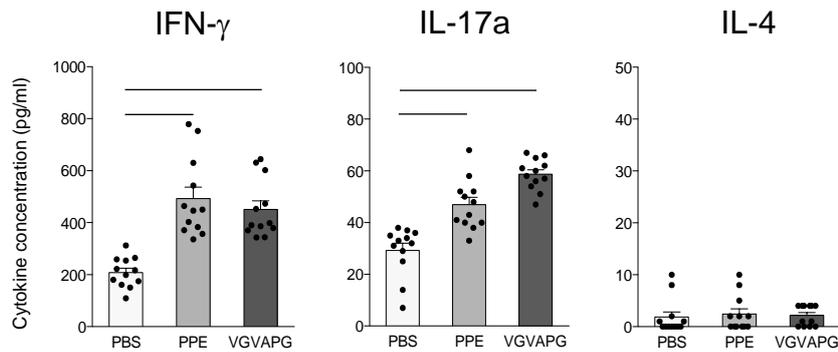


Fig.3. Exposure of mice to VGVAPG increases the proportion of CD8⁺ T cells expressing IFN-γ in lung, mLN and spleen. Flow cytometry analysis of intracellular cytokine expression (IFN-γ, IL-17a and IL-4) (A) and transcription factor expression (T-bet, RORγt and GATA3) (B) performed after anti-CD3/CD28 stimulation of CD45⁺ T cells from lung, mLN and spleen of mice 21-days exposed to PBS, PPE or VGVAPG. Values are expressed as percentage of activated CD8⁺CD25⁺ T cells expressing each cytokine or transcription factor. In these experiments, n = 5 to 12 mice per group and data represent mean of values from three separate experiments ± SEM. ****p* < 0.001, ***p* < 0.01, **p* < 0.05.

Figure 4

A : splenic CD4⁺ T cells



B : splenic CD8⁺ T cells

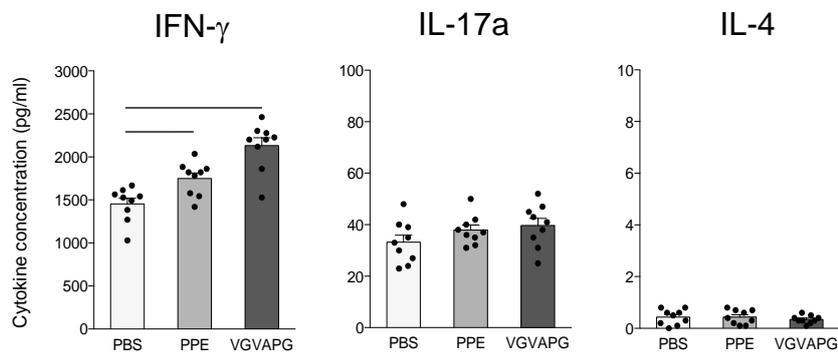


Fig. 4. Exposure of mice to VGVAPG induces IFN- γ production by both CD4⁺ and CD8⁺ splenic T cells and IL-17a production by CD4⁺ T cells. Quantification of IFN- γ , IL17-a and IL-4 production in cell culture supernatants of anti-CD3/CD28-stimulated CD4⁺ (A) or CD8⁺ (B) splenic T cells performed by Cytometric Bead Array Analysis. In these experiments, n = 9 to 12 mice per group and data represent mean of values from three-four separate experiments \pm SEM. *** p < 0.001, ** p < 0.01, * p < 0.05.

Treg cell proportion is not altered in lung, mLN and spleen of VGVAPG-instilled mice.

The typical balance between Th-17 and Treg, and to a lesser extent between Th-1 and Treg (42), led us to investigate the consequences of VGVAPG endotracheal instillation of mice on the proportion of Treg (CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺) cells. Compared to the control group exposed to PBS, the proportion of Treg cells remained unchanged in spleen isolated from VGVAPG-treated mice (Fig. 5A). The lack of VGVAPG effects on the proportion of spleen Treg cells was also confirmed in lung and mLN (Fig. 5B). Similarly, the proportion of Treg cells among the cells isolated from lung, mLN and spleen of PPE-treated mice was not modified compared to control group (Fig. 5B).

Figure 5

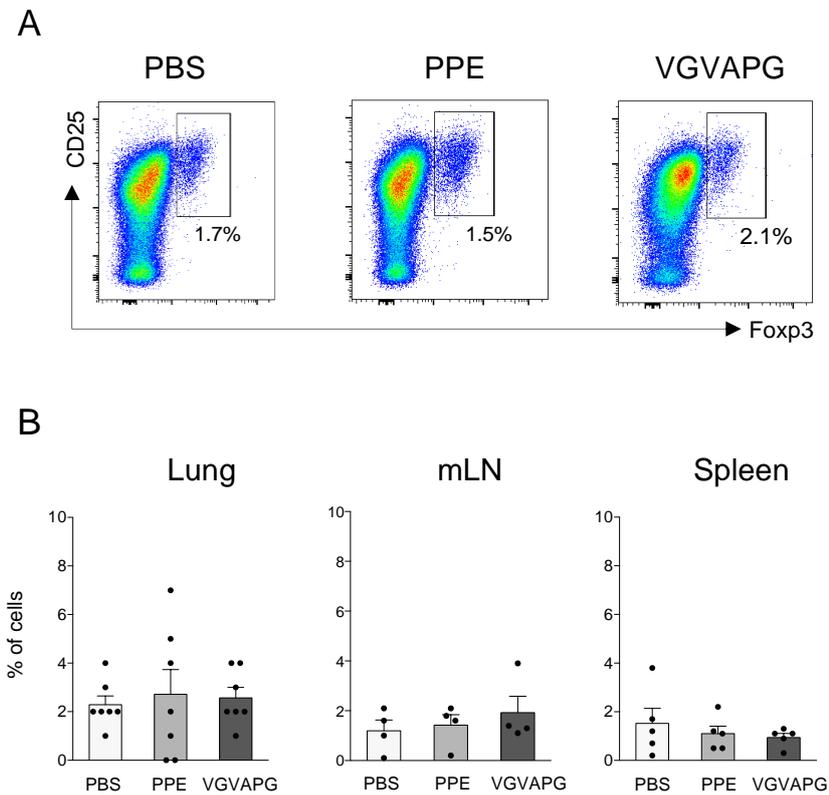


Fig.5. Treg cell proportion is not altered in lung, mLN and spleen of mice exposed to VGVAPG. (A) Flow cytometry analysis of CD25 and FoxP3 transcription factor co-expression after anti-CD3/CD28 activation of CD4⁺ T cells isolated from the spleen of mice 21 days-exposed to PBS, PPE or VGVAPG. Data are representative of three independent experiments. (B) Percentage of CD4⁺CD25^{high} T cells expressing FoxP3 in the lung, mLN and spleen of mice 21 days-exposed to PBS, PPE or VGVAPG. In these experiments, n = 4 to 7 mice per group and data represent mean of values from two separate experiments ± SEM.

Elastin peptides promote a Th-1/Th-17 and Tc-1 response in splenic T lymphocytes ex vivo.

We next wondered whether an *ex vivo* interaction between EP and S-gal expressed on the surface of Th-1, Th-17 and Tc-1 pre-oriented T lymphocytes isolated from VGVAPG-exposed mice, may influence their cytokine expression. We first sorted CD4⁺ and CD8⁺ T cells from spleen of VGVAPG-treated mice and cultured them only with VGVAPG or elastin peptide mixture (EPM). Absence of significant effects on the proportion of IFN- γ or IL-17a expressing T cells (data not shown) leads us to culture the two sorted T cell subsets with anti-CD3/CD28 coated beads, in the absence (negative control, CT) or in the presence of VGVAPG or EPM. Compared to CT, addition of VGVAPG or EPM to stimulation media leads to a significant increase in the proportion of IFN- γ and IL-17a-expressing CD4⁺ splenic T cells (Fig. 6A). This result was associated with a concomitant rise of activated CD4⁺T-bet⁺ and CD4⁺ROR γ t⁺ cells (Fig. 6B). Similar results were obtained with CD4⁺ splenic T cells isolated from mice that received either PPE (Fig. 6C and 6D) or PBS (Fig. 6E and 6F). The presence of VGVAPG or EPM during CD8⁺ splenic T cells stimulation also increased the proportion of IFN- γ expressing cells isolated from VGVAPG-treated mice (Fig. 7A) as well as PPE- and PBS-instilled mice (Fig. 7C and 7E). These observations were confirmed by T-bet expression profile analysis of the same stimulated CD8⁺ T cells (Fig. 7B, 7D and 7F).

Figure 6

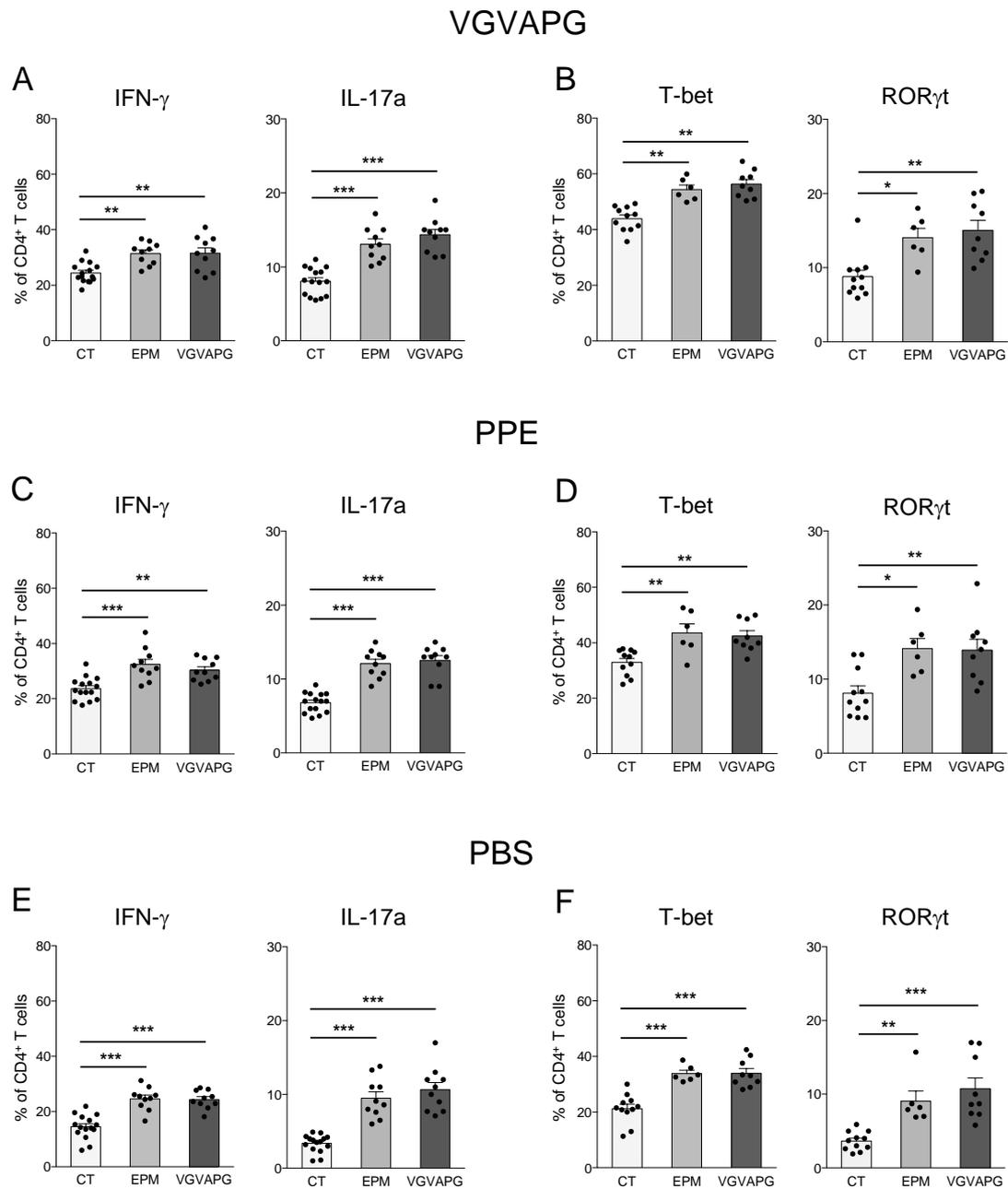


Fig.6. EP potentiate IFN- γ and IL-17a-producing CD4⁺ splenic T cells *ex vivo*. CD4⁺ T cells sorted from the spleens of VGVPAG-, PPE- or PBS-treated mice were cultured with anti-CD3/CD28 beads in absence (CT) or presence of either elastin peptide mixture (EPM) or VGVPAG peptide. Intracellular IFN- γ and IL-17a expression (A, C, and E) and T-bet and ROR γ t expression (B, D, and F) were analyzed by flow cytometry. Values are expressed as percentage of activated CD4⁺CD25⁺ splenic T cells expressing each cytokine or transcription factor. In these experiments, n = 6 to 15 mice pooled per group and data represent mean of values from four separate experiments \pm SEM. ****p* < 0.001, ***p* < 0.01, **p* < 0.05.

Figure 7

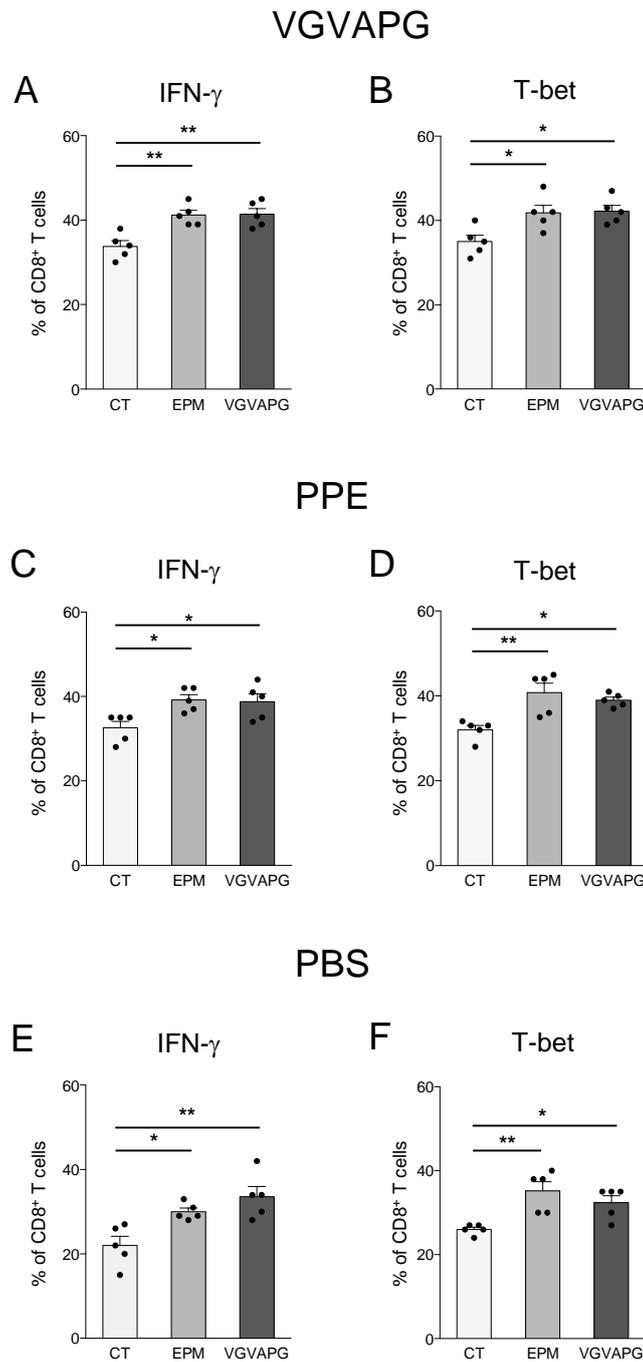


Fig.7. EP potentiate IFN- γ -producing CD8⁺ splenic T cells *ex vivo*. CD8⁺ T cells sorted from the spleens of VGAPG-, PPE- or PBS-treated mice were cultured with anti-CD3/CD28 beads in absence (CT) or presence of either elastin peptide mixture (EPM) or VGAPG peptide. Intracellular IFN- γ expression (A, C, and E) and T-bet expression (B, D, and F) were analyzed by flow cytometry. Values are expressed as percentage of activated CD8⁺CD25⁺ splenic T cells expressing each marker. In all experiments, n = 6 to 10 mice pooled per group and data represent mean of values from three separate experiments \pm SEM. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

S-gal-specific antagonist peptide inhibits local Th-1/Th-17 and Tc-1 response in VGVAPG-treated mice and PPE-treated mice. To further investigate whether Th-1/Th-17 and Tc-1 related cytokine response in VGVAPG-treated mice was linked to EP interaction with S-gal, we co-instilled mice with VGVAPG and the analogous peptide PGAIP that antagonizes the elastin peptide/elastin receptor interactions. This peptide was identified in a previous study as an inactive C-terminal glycine deleted-elastin peptide that retains its binding-activity to elastin receptor and inhibits the *in vitro* and *in vivo* activities of emphysema-inducing VGVAPG (34). We also co-instilled mice group with PPE and the antagonist peptide PGAIP to confirm our blocking strategy. In lung, mLN and spleen of mice co-treated with VGVAPG and PGAIP, the proportion of anti-CD3/CD28-activated CD4⁺ T cell was highly reduced compared to mice in which VGVAPG was used alone, and reached values comparable to those obtained in PBS-instilled mice and PGAIP-instilled mice (Fig. 8A, 8C and 8E). As expected, this negative shift was correlated with a significant decreased expression of the transcription factors T-bet and ROR γ t analyzed in the same experimental conditions (Fig. 8B, 8D and 8F). Regarding CD8⁺ T cell in lung, mLN and spleen, as a consequence of PGAIP efficiency, expression of IFN- γ and T-bet transcription factor was also significantly lowered in PGAIP/VGVAPG co-treated mice as revealed by values equivalent to those of PBS-treated mice and PGAIP-instilled mice (Fig. 9). The same blocking effect of PGAIP was observed in PPE/PGAIP co-instilled mice on CD4⁺ and CD8⁺ T cells cytokines and transcription factors expression (Fig. 8 and Fig. 9).

Figure 8

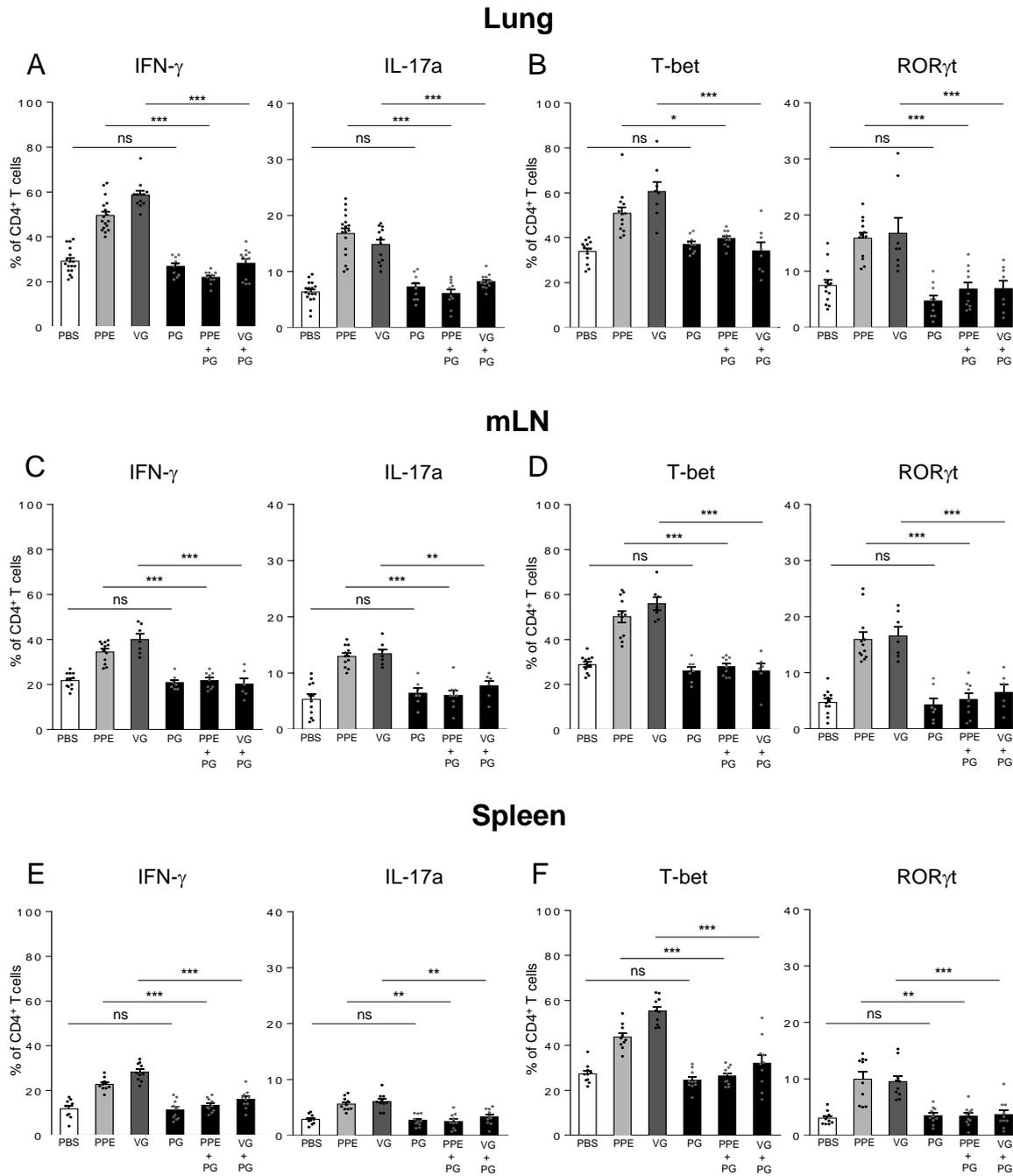


Fig.8. S-gal specific antagonist peptide PGAIP inhibits VGVAPG and PPE effects on Th-1 and Th-17 response in lung, mLN and spleen. Flow cytometry analysis of IFN- γ and IL-17a expression (A, C, and E) and T-bet and ROR γ t expression (B, D, and F) performed after anti-CD3/CD28 stimulation of CD4⁺ T cells from lung, mLN and spleen of mice 21-days exposed to PBS, PPE, VGVAPG (VG), PGAIP (PG) or a mixture containing PPE and the PGAIP peptide (PPE+PG) or the VGVAPG and the PGAIP peptides (VG+PG). In these experiments, n = 7 to 17 mice per group and data represent mean of values from at least three separate experiments \pm SEM. *** p < 0.001, ** p < 0.01, * p < 0.05.

Figure 9

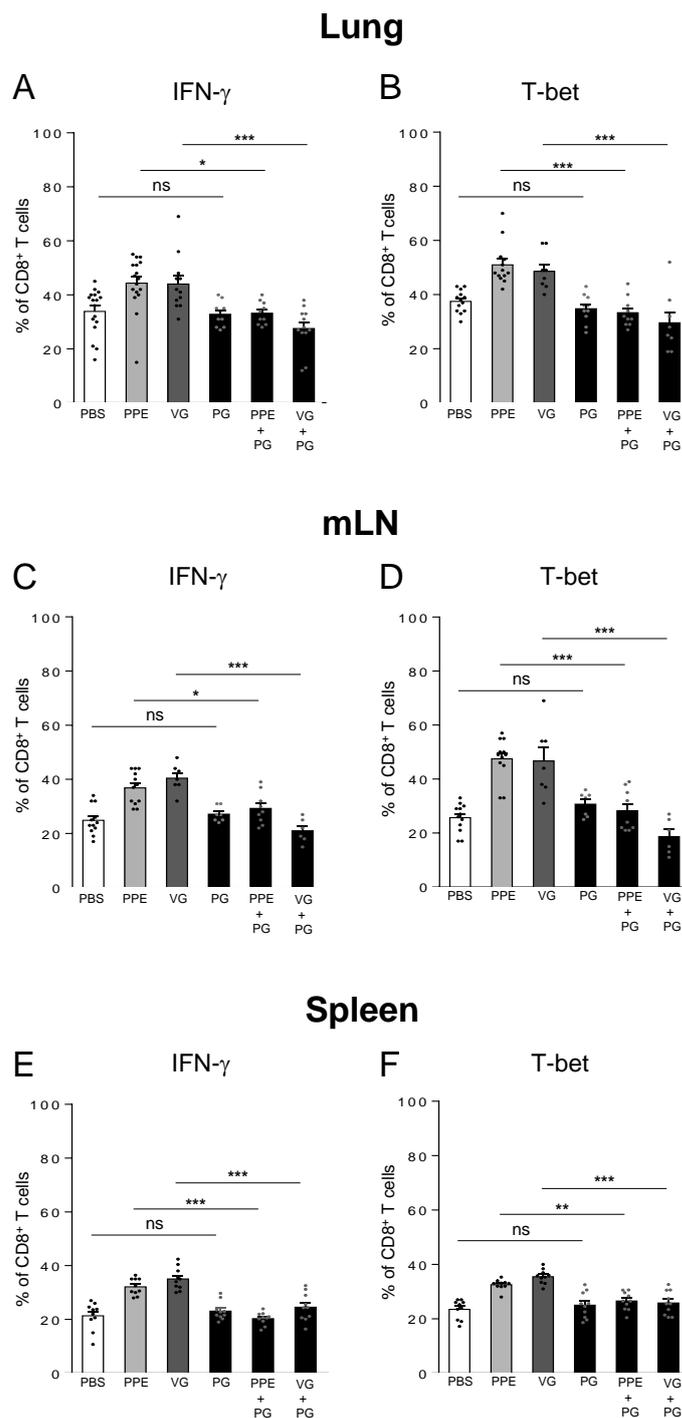


Fig.9. S-gal specific antagonist peptide PGAIP inhibits VGVAPG and PPE effects on Tc-1 response in lung mLN and spleen. Flow cytometry analysis of IFN γ - expression (A, C, and E) and T-bet expression (B, D, and F) performed after anti-CD3/CD28 stimulation of CD8⁺ T cells from lung, mLN and spleen of mice 21-days exposed to PBS, PPE, VGVAPG (VG), PGAIP (PG) or a mixture containing PPE and the PGAIP peptide (PPE+PG) or the VGVAPG and the PGAIP peptides (VG+PG). In these experiments, n = 7 to 17 mice per group and data represent mean of values from three separate experiments \pm SEM. *** p < 0.001, ** p < 0.01, * p < 0.05.

DISCUSSION

Several pieces of evidence are pointing towards an important role of T lymphocytes and elastin-derived peptides (EP) in the development and progression of pulmonary emphysema. The present study was designed to evaluate the effects of EP interaction with the elastin receptor S-gal on the Th and Tc responses during murine emphysema.

Induction of emphysema-like phenotype in mice following administration of EP, i.e. the VGVAPG peptide, is associated with an increased IFN- γ and IL-17a expression by lung and mLN-infiltrating CD4⁺ T cells. These data are consistent with increase of T cell content in the BALF of VGVAPG-exposed mice. Interestingly, it has been reported that the lung T cell response is initially localized in the mLN and spreads systemically after 4 days (21). Consistent with these data, we observed a Th-1 (IFN- γ) and Th-17 (IL-17a) differentiation in CD4⁺ splenic T cells of VGVAPG-treated mice. Moreover, we found that intrapulmonary and systemic Th cell phenotypes are driven by T-bet and ROR γ t transcription factors, confirming their polarization (20, 39). An increase of IFN- γ and T-bet transcription factor was also observed in activated CD8⁺ T cells isolated from lung, mLN and spleen of VGVAPG-treated mice, supporting recent data that showed a pro-inflammatory phenotype among Tc cells isolated from lung of cigarette smoke (CS)-exposed mice (10). Furthermore, we demonstrated in this study that mice exposed to PPE, a well described emphysema mice model also exhibited a Th-1/Th-17 and Tc-1 orientation of T cells, suggesting that various inducers can promote such a pro-inflammatory T response during emphysematous process. This analysis is supported by previous human and mice reports that described *i/* the coexistence of a Th-1 and Th-17-biased CD4⁺ T cell response in the pulmonary airspaces of chronic CS-exposed mice (15) and in the emphysematous lung of COPD patients (8, 14), and *ii/* an emphysema-associated Tc-1 response in CS-mice models (25) and COPD patients (7).

T helper response is known to be regulated by appropriated Treg counterbalance effects (42). In COPD, this condition remains to be clearly elucidated. In our experimental conditions, we found that Treg cell proportion is unchanged in VGVAPG- or PPE-treated mice compared to control mice. Similar results were obtained in an acute murine model of CS-induced emphysema (10), whereas a chronic CS-exposure of mice induces an increase in pulmonary Treg number (6). Such discrepancy is also noticed in COPD patients' studies (2, 22, 29, 38). These contradictory results could be easily explained by the differences in their experimental designs. A complete multicolor-phenotypic and functional exploration of Treg in COPD patients may resolve this controversy.

We have previously established a correlation between a type-1 profile and S-gal expression on EP treated human lymphocytes (5). In addition, we recently demonstrated in mice that VGVAPG-induced emphysema was associated with elastin breakdown, and that deleterious effects of soluble EP on lungs could be antagonized by analogous elastin peptides (34). Moreover, EP specific monoclonal antibodies treatment was previously described, by others, to suppress macrophages accumulation and airspace pathology development in PPE-recipient mice (19). In the present study, we demonstrated that EP- and PPE-instilled mice display a Th-1/Th-17 and Tc-1 cytokine expression pattern in lung, mLN and spleen. We therefore postulated that EP exert a central role in the development of a Th/Tc response during emphysema in mice whatever the etiologic inducer used.

In support to this hypothesis, the present study showed that the proportion of splenic T cells expressing type-1 or type-17 cytokines following VGVAPG or PPE instillation in mice was maximized after an *ex vivo* activation either by an elastin peptide mixture or the VGVAPG peptide. Given that this increase was also seen from the spleen of mice instilled with PBS, we can conclude that the results obtained from the spleens of VGVAPG- or PPE-instilled mice are not the consequence of the expansion of EP-specific T cell clones generated

following instillation but the consequence of EP/S-gal interaction independently of any EP presentation to the TCR. In line with these results, we previously demonstrated in human peripheral blood lymphocytes that S-gal occupancy by EP leads to the activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) and activation protein-1 (AP-1) DNA-binding, key actors in the coordination of IFN- γ transcription (5).

Based on the postulate of a correlation between type-1/ type-17 cytokine production and EP/S-gal interactions on T cells, we envisaged using an elastin receptor antagonist to prove the involvement of S-gal in pulmonary T lymphocytes response. In a previous report, we described that the PGAIP peptide antagonizes the VGVAPG/S-gal interactions and abolish in mice not only the EP-dependent pulmonary emphysema but also The PPE-induced emphysema (34). We demonstrated that the PGAIP peptide protects mice from the VGVAPG- and the PPE-dependent inflammatory cell infiltration in pulmonary tissue, MMP and desmosine accumulation in BALF, and parenchymal degradation. In this study, the S-gal-specific antagonist PGAIP peptide injected into murine lungs simultaneously with the VGVAPG peptide or PPE succeeded to impair the activity of etiologic inductor on Th-1/Th-17 and Tc-1 response. This result confirms the implication of S-gal receptor in T lymphocyte response during emphysema both when EP were directly administered or when they were induced par PPE biological effects. This regulation is also consistent with previously reported effects of PGAIP peptide on the protection of mice from the EP- or PPE-induced emphysema (34).

Integrated in the pathophysiological mechanisms of COPD, our results highlight an additional EP deleterious role in the generation and maintenance of the persistent inflammation observed in COPD patients. These results demonstrate that EP, whose genesis is perpetuated by induction of a self-amplification loop of inflammatory cells recruitment and proteases production, orchestrate an emphysema-associated inflammatory process through the

combined production of IFN- γ and IL-17, two cytokines linked to lung destruction (37) (Fig. 10). Via the production of IFN- γ , EP favour emphysema development, dysregulation of the pulmonary proteases/anti-proteases balance (43) and major the Th-1 pro-inflammatory response (33). Through the production of both IFN- γ and IL-17, EP enhance the recruitment of neutrophils into the airways (28).

Taken as a whole, our data confirm the critical role of Th-1, Th-17 and Tc-1 cells in the development of emphysema and highlight the effects of the EP/S-gal interactions on T cell orientation towards a pro-inflammatory profile. Our findings also provide evidence that this orientation might be controlled by S-gal specific antagonist peptides making them potential complementary therapeutic support to prevent the progression of the inflammatory process during emphysema. Studies are in progress, to investigate the potentiality of PGAIP to control a pre-existing inflammation induced by various emphysema inducers.

Figure 10

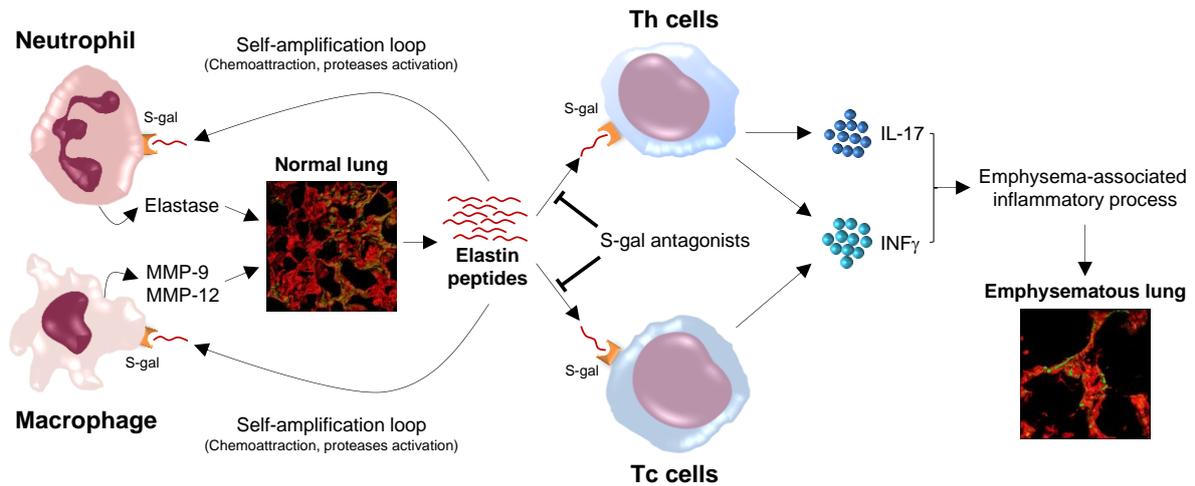


Fig.10. Key role of EP/S-gal interaction in the emphysema-associated inflammatory process. EP genesis perpetuated by a self-amplification loop of inflammatory cells recruitment (neutrophils and macrophages) and proteases release (neutrophil elastase, MMP-9 and MMP-12) is a key event to promote the combined production of $INF\gamma$ and IL-17 which orchestrate the inflammatory process associated with emphysema. EP effects are mediated via their interaction with the elastin receptor S-gal expressed on T cells and that can be controlled by S-gal specific antagonist peptides.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the University of Reims Champagne-Ardenne and by a grant-in-Aid "Contrat de Plan Etat-Région".

GRANTS

A.Meghraoui-Kheddar received a Grant for doctoral training from the French Ministry of Higher Education and Research and from the University of Reims Champagne-Ardenne.

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors

REFERENCES

1. Baranek T, Debret R, Antonicelli F, Lamkhioued B, Belaaouaj A, Hornebeck W, Bernard P, Guenounou M, and Le Naour R. Elastin receptor (spliced galactosidase) occupancy by elastin peptides counteracts proinflammatory cytokine expression in lipopolysaccharide-stimulated human monocytes through NF-kappaB down-regulation. *J Immunol* 179: 6184-6192, 2007.
2. Barcelo B, Pons J, Ferrer JM, Sauleda J, Fuster A, and Agusti AG. Phenotypic characterisation of T-lymphocytes in COPD: abnormal CD4+CD25+ regulatory T-lymphocyte response to tobacco smoking. *Eur Respir J* 31: 555-562, 2008.
3. Barczyk A, Pierzchala W, Kon OM, Cosio B, Adcock IM, and Barnes PJ. Cytokine production by bronchoalveolar lavage T lymphocytes in chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol* 117: 1484-1492, 2006.
4. Bhavani S, Tsai CL, Perusich S, Hesselbacher S, Coxson H, Pandit L, Corry DB, and Kheradmand F. Clinical and Immunological Factors in Emphysema Progression. Five-Year Prospective Longitudinal Exacerbation Study of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (LES-COPD). *Am J Respir Crit Care Med* 192: 1171-1178, 2015.
5. Debret R, Antonicelli F, Theill A, Hornebeck W, Bernard P, Guenounou M, and Le Naour R. Elastin-derived peptides induce a T-helper type 1 polarization of human blood lymphocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 1353-1358, 2005.
6. Demoor T, Bracke KR, Joos GF, and Brusselle GG. Increased T-regulatory cells in lungs and draining lymph nodes in a murine model of COPD. *Eur Respir J* 35: 688-689, 2010.

7. Di Stefano A, Caramori G, Capelli A, Gnemmi I, Ricciardolo FL, Oates T, Donner CF, Chung KF, Barnes PJ, and Adcock IM. STAT4 activation in smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 24: 78-85, 2004.
8. Di Stefano A, Caramori G, Gnemmi I, Contoli M, Vicari C, Capelli A, Magno F, D'Anna SE, Zanini A, Brun P, Casolari P, Chung KF, Barnes PJ, Papi A, Adcock I, and Balbi B. T helper type 17-related cytokine expression is increased in the bronchial mucosa of stable chronic obstructive pulmonary disease patients. *Clin Exp Immunol* 157: 316-324, 2009.
9. Dupont A, Dury S, Gafa V, Lebargy F, Deslee G, Guenounou M, Antonicelli F, and Le Naour R. Impairment of neutrophil reactivity to elastin peptides in COPD. *Thorax* 68: 421-428, 2013.
10. Eppert BL, Wortham BW, Flury JL, and Borchers MT. Functional characterization of T cell populations in a mouse model of chronic obstructive pulmonary disease. *J Immunol* 190: 1331-1340, 2013.
11. Freeman CM, Stolberg VR, Crudgington S, Martinez FJ, Han MK, Chensue SW, Arenberg DA, Meldrum CA, McCloskey L, and Curtis JL. Human CD56+ cytotoxic lung lymphocytes kill autologous lung cells in chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One* 9: e103840, 2014.
12. Ghuyssen-Itard AF, Robert L, and Jacob MP. [Effect of elastin peptides on cell proliferation]. *C R Acad Sci III* 315: 473-478, 1992.
13. Goldstein RA, and Starcher BC. Urinary excretion of elastin peptides containing desmosin after intratracheal injection of elastase in hamsters. *J Clin Invest* 61: 1286-1290, 1978.

14. Grumelli S, Corry DB, Song LZ, Song L, Green L, Huh J, Hacken J, Espada R, Bag R, Lewis DE, and Kheradmand F. An immune basis for lung parenchymal destruction in chronic obstructive pulmonary disease and emphysema. *PLoS Med* 1: e8, 2004.
15. Harrison OJ, Foley J, Bolognese BJ, Long E, 3rd, Podolin PL, and Walsh PT. Airway infiltration of CD4+ CCR6+ Th17 type cells associated with chronic cigarette smoke induced airspace enlargement. *Immunol Lett* 121: 13-21, 2008.
16. Hinek A. Nature and the multiple functions of the 67-kD elastin-/laminin binding protein. *Cell Adhes Commun* 2: 185-193, 1994.
17. Hodge G, Nairn J, Holmes M, Reynolds PN, and Hodge S. Increased intracellular T helper 1 proinflammatory cytokine production in peripheral blood, bronchoalveolar lavage and intraepithelial T cells of COPD subjects. *Clin Exp Immunol* 150: 22-29, 2007.
18. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, Cherniack RM, Rogers RM, Sciurba FC, Coxson HO, and Pare PD. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 350: 2645-2653, 2004.
19. Houghton AM, Quintero PA, Perkins DL, Kobayashi DK, Kelley DG, Marconcini LA, Mecham RP, Senior RM, and Shapiro SD. Elastin fragments drive disease progression in a murine model of emphysema. *J Clin Invest* 116: 753-759, 2006.
20. Ivanov, II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, and Littman DR. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 126: 1121-1133, 2006.

21. Lambrecht BN, Pauwels RA, and Fazekas De St Groth B. Induction of rapid T cell activation, division, and recirculation by intratracheal injection of dendritic cells in a TCR transgenic model. *J Immunol* 164: 2937-2946, 2000.
22. Lee SH, Goswami S, Grudo A, Song LZ, Bandi V, Goodnight-White S, Green L, Hacken-Bitar J, Huh J, Bakaeen F, Coxson HO, Cogswell S, Storness-Bliss C, Corry DB, and Kheradmand F. Antielastin autoimmunity in tobacco smoking-induced emphysema. *Nat Med* 13: 567-569, 2007.
23. Lombard C, Arzel L, Bouchu D, Wallach J, and Saulnier J. Human leukocyte elastase hydrolysis of peptides derived from human elastin exon 24. *Biochimie* 88: 1915-1921, 2006.
24. Majori M, Corradi M, Caminati A, Cacciani G, Bertacco S, and Pesci A. Predominant TH1 cytokine pattern in peripheral blood from subjects with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol* 103: 458-462, 1999.
25. Motz GT, Eppert BL, Sun G, Wesselkamper SC, Linke MJ, Deka R, and Borchers MT. Persistence of lung CD8 T cell oligoclonal expansions upon smoking cessation in a mouse model of cigarette smoke-induced emphysema. *J Immunol* 181: 8036-8043, 2008.
26. Owen CA. Proteinases and oxidants as targets in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2: 373-385; discussion 394-375, 2005.
27. Owen CA. Roles for proteinases in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 3: 253-268, 2008.
28. Prause O, Bozinovski S, Anderson GP, and Linden A. Increased matrix metalloproteinase-9 concentration and activity after stimulation with interleukin-17 in mouse airways. *Thorax* 59: 313-317, 2004.

29. Roos-Engstrand E, Ekstrand-Hammarstrom B, Pourazar J, Behndig AF, Bucht A, and Blomberg A. Influence of smoking cessation on airway T lymphocyte subsets in COPD. *COPD* 6: 112-120, 2009.
30. Saetta M, Di Stefano A, Turato G, Facchini FM, Corbino L, Mapp CE, Maestrelli P, Ciaccia A, and Fabbri LM. CD8+ T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 157: 822-826, 1998.
31. Schild K, Knobloch J, Yakin Y, Jungck D, Urban K, Muller K, and Koch A. IL-5 release of CD4+ non-effector lymphocytes is increased in COPD--modulating effects of moxifloxacin and dexamethasone. *Int Immunopharmacol* 11: 444-448, 2011.
32. Schriver EE, Davidson JM, Sutcliffe MC, Swindell BB, and Bernard GR. Comparison of elastin peptide concentrations in body fluids from healthy volunteers, smokers, and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 145: 762-766, 1992.
33. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, and Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 75: 163-189, 2004.
34. Sellami M, Meghraoui-Kheddar A, Terryn C, Fichel C, Bouland N, Diebold MD, Guenounou M, Hery-Huynh S, and Le Naour R. Induction and regulation of murine emphysema by elastin peptides. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 310: L8-23, 2016.
35. Senior RM, Griffin GL, Mecham RP, Wrenn DS, Prasad KU, and Urry DW. Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly, a repeating peptide in elastin, is chemotactic for fibroblasts and monocytes. *J Cell Biol* 99: 870-874, 1984.

36. Shan M, Cheng HF, Song LZ, Roberts L, Green L, Hacken-Bitar J, Huh J, Bakaeen F, Coxson HO, Storness-Bliss C, Ramchandani M, Lee SH, Corry DB, and Kheradmand F. Lung myeloid dendritic cells coordinately induce TH1 and TH17 responses in human emphysema. *Sci Transl Med* 1: 4ra10, 2009.
37. Shan M, Yuan X, Song LZ, Roberts L, Zarinkamar N, Seryshev A, Zhang Y, Hilsenbeck S, Chang SH, Dong C, Corry DB, and Kheradmand F. Cigarette smoke induction of osteopontin (SPP1) mediates T(H)17 inflammation in human and experimental emphysema. *Sci Transl Med* 4: 117ra119, 2012.
38. Smyth LJ, Starkey C, Vestbo J, and Singh D. CD4-regulatory cells in COPD patients. *Chest* 132: 156-163, 2007.
39. Szabo SJ, Sullivan BM, Stemmann C, Satoskar AR, Sleckman BP, and Glimcher LH. Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells. *Science* 295: 338-342, 2002.
40. Urbanowicz RA, Lamb JR, Todd I, Corne JM, and Fairclough LC. Enhanced effector function of cytotoxic cells in the induced sputum of COPD patients. *Respir Res* 11: 76, 2010.
41. Vestbo J, Hurd SS, Agusti AG, Jones PW, Vogelmeier C, Anzueto A, Barnes PJ, Fabbri LM, Martinez FJ, Nishimura M, Stockley RA, Sin DD, and Rodriguez-Roisin R. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med* 187: 347-365, 2013.
42. Wang H, Peng W, Weng Y, Ying H, Li H, Xia D, and Yu W. Imbalance of Th17/Treg cells in mice with chronic cigarette smoke exposure. *Int Immunopharmacol* 14: 504-512, 2012.

43. Wang Z, Zheng T, Zhu Z, Homer RJ, Riese RJ, Chapman HA, Jr., Shapiro SD, and Elias JA. Interferon gamma induction of pulmonary emphysema in the adult murine lung. *J Exp Med* 192: 1587-1600, 2000.
44. Xu C, Hesselbacher S, Tsai CL, Shan M, Spitz M, Scheurer M, Roberts L, Perusich S, Zarinkamar N, Coxson H, Krowchuk N, Corry DB, and Kheradmand F. Autoreactive T Cells in Human Smokers is Predictive of Clinical Outcome. *Front Immunol* 3: 267, 2012.

Impact of aging on inflammatory and immune responses during elastin-peptide-induced murine emphysema

L'emphysème est la forme principale de la BPCO et l'exposition à la fumée de cigarette en est le principal facteur étiologique. L'activation des cellules inflammatoires au cours de la BPCO conduit à la sécrétion de sérines protéases et de métallo-protéinases matricielles. Ces protéases sont impliquées dans la dégradation du tissu conjonctif du parenchyme pulmonaire. La forte excrétion de desmosine, marqueur spécifique de la dégradation de l'élastine, a permis de mettre en évidence une dégradation intense de l'élastine pulmonaire qui génère des peptides solubles d'élastine. Chez la souris, ces peptides d'élastine participent, via leur interaction avec le récepteur à l'élastine exprimé à la surface des lymphocytes T CD4⁺ et des lymphocytes T CD8⁺, à la polarisation des cellules T helper vers un phénotype Th1 et Th17 et des cellules T cytotoxiques vers un phénotype Tc1.

Le vieillissement physiologique s'accompagne de modifications au sein du système immunitaire avec pour conséquence principale une augmentation de l'activité des lymphocytes T mémoires CD28⁻ associée à une diminution de l'activité des lymphocytes T naïfs. Ces modifications engendrent un déséquilibre des processus de veille immunologique ce qui génère progressivement une inflammation chronique liée à l'âge. Par ailleurs, l'élastolyse et la dégradation des fibres élastiques sont également des phénomènes qui augmentent naturellement avec l'âge.

Ainsi, si l'exposition au tabac est le facteur de risque majoritaire de l'accumulation de cellules inflammatoires dans les poumons de patients atteints de BPCO, le vieillissement est également un facteur important à prendre en compte dans le développement de la maladie. La nécessité de cette prise en compte dans la compréhension de la pathologie est renforcée par le fait que la prévalence de la BPCO augmente avec l'âge et par les données de la littérature décrivant l'émergence au cours de la BPCO de clones lymphocytaires T CD4⁺ et T CD8⁺ n'exprimant plus ou exprimant peu le marqueur d'activation CD28.

Pour étudier le rôle du vieillissement au cours de la BPCO, nous avons instillé par voie intratrachéale le peptide d'élastine VGVAPG ou de l'élastase pancréatique porcine (PPE) à des souris jeunes de 6 semaines et à des souris âgées de 15 mois et nous avons exploré et comparé d'une part les paramètres associés à la mise en place du processus emphysémateux, d'autre part la signature cytokinique des lymphocytes Th et Tc (au niveau de l'expression d'IFN- γ et d'IL-17) au cours de ce processus, et enfin des paramètres immunitaires associés au vieillissement (perte du corécepteur CD28, modification de la réponse T mémoire au peptide VGVAPG).

Les principaux résultats obtenus au cours de cette étude sont les suivants :

1/ Les paramètres associés au développement de l'emphysème sont d'apparition plus précoces et plus intenses chez les souris âgées de 15 mois quand on les compare avec ceux des souris de 6 semaines dans les mêmes conditions expérimentales. Ainsi, l'infiltrat de cellules inflammatoires (polynucléaires neutrophiles, macrophages) est quantitativement plus important dans les LBA et le parenchyme pulmonaire des souris âgées de 15 mois. Ceci s'accompagne d'un remodelage plus précoce des voies aériennes (dès 14 jours après l'instillation) et d'une sécrétion plus importante de protéases élastinolytiques et de desmosine (marqueur spécifique de la dégradation de l'élastine) dans les LBA.

2/ La proportion de lymphocytes T CD4⁺CD28⁻ et de lymphocytes T CD8⁺CD28⁻ est plus importante chez les souris âgées emphysémateuses de 15 mois en comparaison avec la proportion de ces mêmes populations chez des souris âgées emphysémateuses de 6 semaines. L'origine tissulaire des lymphocytes T (poumon, ganglions ou rate) pour un même groupe d'âge ne semble pas influencer la proportion des sous-populations analysées. L'augmentation de ces deux sous-populations s'accompagne chez les souris âgées d'une moindre efficacité des lymphocytes T CD4⁺ et des lymphocytes T CD8⁺ à répondre à une activation par des anticorps anti-CD3/CD28.

3/ La proportion plus importante de populations lymphocytaires T CD4⁺CD28⁻ et T CD8⁺CD28⁻ chez les souris âgées développant un emphysème après instillation de peptides d'élastine s'accompagne d'une activité lymphocytaire T mémoire plus importante vis-à-vis des peptides d'élastine quand on la compare à celle des souris jeunes développant un emphysème sous l'effet du même inducteur.

Les résultats obtenus au cours de ce travail montrent que le vieillissement accélère le développement de l'emphysème et que cet effet semble très fortement lié à l'augmentation 1/ de la production de peptides d'élastine et de leurs effets sur la réponse inflammatoire et immunitaire au cours de la pathologie, et 2/ de l'émergence de populations T sénescents mémoires spécifiques des peptides d'élastine.

Impact of aging on inflammatory and immune responses during elastin peptide-induced murine emphysema

Alexandre Pierre,¹ Flora Lemaire,¹ Aïda Meghraoui-Kheddar,¹
Sandra Audonnet,² Richard Le Naour^{1,2}

Affiliations: ¹EA4683, SFR CAP-Santé, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France. ²Plateau technique de cytométrie en flux, Plateforme Santé, URCA, Reims, France.

Running head: Age-dependent immune response during murine emphysema

Address for reprint requests and other correspondence: Richard Le Naour, EA4683 "Immunité Adaptative et Fonctionnalité des Barrières Biologiques", UFR de Pharmacie, 1 rue du Maréchal Juin 51096 Reims cedex, France. E-mail: richard.lenaour@univ-reims.fr

Abstract

Excessive breakdown of lung elastin and genesis of soluble elastin peptides (EP) leading to a self-maintaining inflammatory process are now considered as key factors in the pathophysiology of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and its major component, emphysema. Alterations of lung and immune functions have been described as a consequence of aging in normal healthy individuals. We previously demonstrated that six-week old mice treated with EP exhibited emphysematous structural changes associated with T helper (Th) and T cytotoxic (Tc) pro-inflammatory responses. In this study, we endotracheally instilled young (six-week-old) and elderly (15-month-old) C57BL/6J mice with EP and we investigated the consequence of aging on inflammatory, immune and histological criteria associated with murine emphysema progression. Broncho-alveolar lavages and local/systemic T lymphocyte phenotypes were analyzed by flow cytometry at inflammatory cell profile and cytokine expression levels, respectively. Lungs were prepared to allow histological analysis by immunostaining and confocal microscopy. We observed that development of pulmonary emphysema is earlier in elderly mice compared to young mice following EP exposure, and that this age-dependent parenchymal tissue remodeling is associated with increased elastinolytic proteases expression and elastin degradation. In addition, we identified that both the proportion of CD28⁻ senescent T cells in the tissues of EP-treated mice and the EP-related expansion of specific memory T cell clones were significantly higher in elderly versus younger mice. This study demonstrates that aging accelerates emphysema development, and that this effect is linked to increased EP production and their effects on inflammatory and immune response.

Keywords: murine emphysema, aging, elastin peptides, proteases, T lymphocytes, cytokines

Introduction

Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) is a progressive and irreversible inflammatory state of the lung, characterized by clinical symptoms ranging from chronic inflammation to tissue proteolysis.¹ Lung inflammation is primarily due to infiltration of inflammatory cells, mainly macrophages and neutrophils, gradually responsible for destruction of pulmonary elastin by secretion of elastolytic proteases.^{2,3} Elevated levels of soluble elastin peptides (EP) in biological fluids of COPD patients reflect massive pulmonary elastin breakdown.⁴⁻⁶ EP produced in significant amounts during proteolytic degradation of lung are able to drive propagation and maintenance of inflammatory process during COPD^{7,4} and we previously demonstrated in mice that a single endotracheal instillation of EP resulted in an acute emphysematous state.⁸ Pathogenic T cells are also important in orchestration and perpetuation of the inflammatory damages in a context of COPD. The rate of activated CD4⁺ T cells that secrete T helper (Th)-1^{9,10}, Th-2^{11,12} or Th-17^{13,14} cytokine pattern correlates with activity and severity of the disease. IFN γ -producing CD8⁺ T cytotoxic (Tc) cell frequency in peripheral blood also correlates with disease activity in patients with COPD.^{15,16} We recently demonstrated in mice that Th-1, Th-17 and Tc-1 pro-inflammatory responses are observed during EP-induced emphysema.⁶

Increased elastolysis activity and degradation of elastin fibers are normal features of lung physiological aging associated with an alveolus dilatation and an airspace enlargement.^{17,18} T cell-mediated immunity also appears to be particularly susceptible to physiological aging with an increase of the expansion of memory CD4⁺ and CD8⁺ T cells and an increased production of highly differentiated CD4⁺CD28⁻ and CD8⁺CD28⁻ senescent T cells.¹⁹⁻²² While the loss of CD28 by CD8⁺ T cells is linked to immunosenescence²³, the origin of CD4⁺CD28⁻ T cells seems to be related both to immunosenescence and auto-immune processes.²⁴

Deterioration of lung and immune functions with age in healthy individuals is accelerated in patients with COPD²⁵. Besides, COPD preferentially affects elderly individuals, and aging is itself associated with an increased incidence of COPD occurrence.²⁶⁻²⁸ Accelerated cellular senescence during COPD results in reduced cellular proliferation, together with a strongly increased proteolytic activity resulting in progressive alveolar cell destruction and emphysema.²⁸ COPD is also associated with increased CD8⁺CD28⁻ senescent T cells in the peripheral blood of both current and ex-smoker COPD subjects^{29,30}, and enhanced presence of CD4⁺CD28⁻ senescent T cells is associated with impaired lung function in COPD.²⁹

The positive association between lung elastin breakdown and aging³¹ is consistent with the hypothesis that aging is a major risk factor of COPD development through EP-inducing elastin degradation and their consecutive deleterious effects. We previously described induction of emphysema-like phenotype in six-week-old mice instilled with EP.⁶ In the present study, we furthermore demonstrated that EP-induced emphysema is accelerated in elderly mice (15-month-old mice), and that aging is exacerbating the emphysema-associated pro-inflammatory profile through the expansion of EP-specific T cell clones.

Materials and Methods

Animal procedure. Six-week-old and 15-month-old C57BL/6J female mice purchased from Harlan Sprague Dawley (Harlan Laboratories, Gannat, France) were housed in an animal facility that was maintained at 22-26°C with 40-69% humidity and a 12-h light/dark cycle. Animals were fed with a commercial diet and received water *ad libitum*. Animals were humanely cared for, and all animal experiments were approved by the University of Reims Champagne-Ardenne Institutional Animal Care and Use Committee and were carried out in accordance with institutional guidelines and regulations. After appropriate sedation, mouse lungs were endo-tracheally instilled with either PBS, or 10 µg of the VGVAPG peptide (Genepep SA, Saint Jean de Védas, France), or 10 µg of VVGPGA (random permutation of the VGVAPG peptide, Genepep SA), or one unit (7.4 µg) of porcine pancreatic elastase (PPE) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) via a 22-gauge i.v. catheter in a total volume of 50 µl PBS as previously described.⁸ Animals were sacrificed by CO₂ inhalation at days 1, 3, 7, 14, 21 or 28. At these various time points, bronchoalveolar lavage fluids (BALF) were collected to analyze cell profiles and to determine MMP activities and desmosine concentrations. Mice peripheral blood was collected by cardiac puncture and *sera* stored at -80°C for further measurement of circulating desmosine concentrations. Then, the pulmonary and systemic circulation of euthanized mice was perfused with sterile PBS to remove the intravascular pool of cells. Lungs, mediastinal lymph nodes (mLN) and spleens were also collected to investigate the tissue specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells profiles. Lungs for appropriate mice were also inflated, removed and embedded in paraffin to allow morphological and elastin/collagen network analysis.

Synthesis, purification and characterization of elastine peptides. Synthesis of the elastin peptides used in this study (VGVAPG and PGAIP) was performed by Genepep (Genepep SA, Saint Jean de Védas, France). Crude peptides were purified by RP-HPLC and

peptide molecular weights were determined by ESI mass spectrometry as previously described.^{6,8} All peptides used in this study were solubilized or diluted in PBS.

Broncho-alveolar lavage. The trachea was inserted with a 22-gauge i.v. catheter, and the whole lungs were washed three times with 1 ml PBS. BALF was centrifuged at 300 g for 10 min at +4°C, and the supernatant was collected and stored at -80°C until required. Cell pellet was resuspended in 1 ml of PBS, and cell count was performed. Cell viability was more than 95% as determined by trypan blue exclusion. Aliquots of cells were then stained with fluorescent mAb specific for leucocytes (CD45, BD Biosciences, Le pont de Claix, France), neutrophils (Ly6G, BD Biosciences), macrophages (Mac3, BD Biosciences) and T lymphocyte sub-populations (CD3, CD4 and CD8, BD Biosciences). Flow cytometry analysis was performed and absolute number in cell populations was calculated.

Lung tissue preparation. The lungs were inflated for 10 min at a constant pressure of 25 cm H₂O in the presence of 10% neutral buffered formalin solution (Sigma-Aldrich) and then removed. Formalin inflated lungs were fixed in 4% PFA for 24 h at room temperature before embedding in paraffin. Then, transverse 3- μ m or 20- μ m sections of lung were cut for morphological or collagen/elastin network analysis, respectively.

Lung, mLN and spleen cell preparation and culture. Lungs were thoroughly chopped in using iridectomy scissors and incubated in digestion medium (Macs Miltenyi Biotec, Paris, France) for 30 min at 37°C under permanent agitation of 60 rpm. Lung fragments were resuspended in fresh digestion medium, passed through a successive 70- μ m and 40- μ m cell strainers and centrifuged. Red blood cells were then lysed using RBC Lysis Solution (Miltenyi Biotec) and washed with X-VIVO 15 serum free medium (Lonza, Verviers, Belgium). mLN were passed through a 70- μ m cell strainer, using a 1 mL syringe plunger, and washed in X-VIVO 15 serum free medium (Lonza). Spleens were also mechanically minced

with scissors, enzymatically digested with spleen dissociation medium (Stem Cell Technologies, Grenoble, France) following manufacturer's instructions and passed through a successive 70- μm and 40- μm cell strainers, using a 5 mL syringe plunger. Red blood cells were then lysed using RBC Lysis Solution (Miltenyi Biotec) and washed twice with X-VIVO 15 serum free medium (Lonza). The CD45⁺ leucocytes were isolated from lung single-cell suspensions by immuno-magnetic positive selection using mouse anti-CD45 microbeads according to the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec). Cell purity and viability were respectively over 98% and 90% as determined by flow cytometry analysis. Phenotypic analysis of mLN single-cell suspensions by flow cytometry revealed over 90% of CD45⁺ cells, so no sorting were performed. CD4⁺ and CD8⁺ T cells were separately isolated from spleen single-cell suspensions by immuno-magnetic depletion using mouse CD4⁺ Isolation Kit II and CD8⁺ T cell Isolation Kit respectively, according to the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec). Cell purity and viability were respectively over 90% and 95% as determined by flow cytometry analysis. CD11c⁺ Ia⁺ CD64⁺ DC were isolated from spleen single-cell suspensions by cell sorting. CD45⁺ leucocytes, either from lungs or mLN, and isolated CD4⁺ and CD8⁺ splenic T cells were respectively cultures in 96-well (4×10^6 CD45⁺ cells/ml) or 48-well culture plates (2×10^6 CD4⁺ or CD8⁺ T cells/ml) and incubated with Dynabeads mouse T-activator beads (Invitrogen, Illkirch, France) coated with antibodies against CD3 and CD28. After 48 h incubation, stimulated cells were stained and analyzed by flow cytometry. In some experiments, CD4⁺ and CD8⁺ splenic T cells isolated from VGVAPG-treated mice were 2 days co-cultured in 48-well culture plates (2×10^6 CD4⁺ or CD8⁺ T cells/ml) with VGVAPG-primed autologous DC (2×10^5 DC/ml) in a final volume of 500 μl . One hour before priming autologous DC with VGVAPG (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) during 2 days, DC were pre-incubated with the S-gal-specific antagonist peptide PGAIP (10 $\mu\text{l}/\text{ml}$). After 2

days co-incubation, culture supernatants were recovered to analyzed IFN- γ and IL-17a production by flow cytometry and CBA technology.

Morphological analysis. Serial mid-sagittal sections (3- μm thick) stained with Hematoxylin Phloxin Safran were used for morphological analysis. Ten randomly selected (100x) fields per slide were photographed using the ZEN imaging software (Carl Zeiss SAS, Marly-Le-Roi, France). The images were analyzed using the Image J software (NIH, Bethesda, MD, USA). From each fields ten areas of interest, free of airways and muscular blood vessels, were picked for measurement of the number of intersections of virtual lines of known length, with alveolar *septa*. An increase in the average distance between intercepts (mean linear intercept) indicates enlarged airspaces.

Collagen and elastin network acquisition and quantification. Serial unstained mid-sagittal sections (20- μm thick) were used for the simultaneous visualization of collagen and elastin in lung tissue section based on collection of second-harmonic generation (SHG) and two photons excited fluorescence (2PEF) signals, respectively, as described previously.⁸ Volume ratios of elastin and collagen structures were computed in term of the voxel volumes as previously described.⁸ The volume fraction estimation of elastin and collagen structures was performed after 3D reconstruction images from 2PEF/SHG data sets processing with the Imaris software (Bitplane AG, Zurich, Switzerland). The ratio index, calculated in order to evaluate the elastin destruction in lung tissue, is defined as follow: Ratio index = $(E_v - C_v)/(E_v + C_v)$, where E_v and C_v represent elastin and collagen voxel volumes, respectively. This ratio index approaches maximum value of +1 when only elastin is present, and this ratio index approaches minimum value of -1 when only collagen is present. This ratio index therefore provides an estimation of the extent of ECM remodeling in terms of collagen and elastin voxel volumes in the lung tissues undergoing emphysematous destruction.

MMP analysis. The gelatinolytic activity of MMP-2 and MMP-9 and the MMP-12 expression in BALF were respectively measured by gelatin zymography and western blot as previously described.^{32,33} For gelatin zymography, 10 µl of BALF were eluted in non-reducing sample buffer (Biorad, Marnes-La-Coquette, France) and subjected to electrophoresis in 10% SDS-polyacrylamide gels containing 1 mg/ml of gelatin as substrate. Following electrophoresis, the gels were washed twice in 2.5% Triton X-100 for 1 h at room temperature and further incubated at 37°C overnight in 50 mM Tris-HCl containing 5 mM CaCl₂ and 200 mM NaCl (pH 7.6). Proteolytic activity was visualized by staining the gels with 0.1% Coomassie blue containing 30% Propanol-2 and 10% acetic acid, followed by destaining in 7.5% acetic acid and methanol. MMP gelatinolytic activities were evidenced as white zones of lysis. Gelatinase activities were quantified by an automated image analyzer (Vuilber-Lourmat, Collégien, France). Linear range of enzyme activity was assessed using recombinant MMP-2 and MMP-9 as standard. For western blot analysis, equal amounts of proteins contained in BALF were heated for 5 min at 100°C in Laemmli sample buffer, separated by 10% SDS-PAGE under reducing conditions (Dithiotreitol) and transferred onto nitrocellulose membrane (Immobilon P, Millipore, Molsheim, France) with blotting apparatus (100 V, 110 min, Biorad). Transfert was verified by Ponceau staining. Membranes were blocked for 1 h at room temperature with buffer containing 5% non-fatty milk in Tween-Tris-buffered saline (50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, and 0.1% Tween 20). The blots were incubated overnight at +4°C with antibodies raised against MMP-12 (1:250, Santa-Cruz). After washing the blots with Tween-Tris-buffered saline, they were incubated with horseradish peroxidase-coupled anti-goat antibodies (1:1000, Santa-Cruz Biotechnology) for 1 h at room temperature and then washed again with Tween-Tris-buffered saline. Blots were developed by chemiluminescence (Kit ECL/RPN 2069, Amersham Pharmacia Biotech, South Shield, United Kingdom).

Desmosine quantification. Determination of desmosine concentrations in BALF and *sera* were performed in triplicate using a commercially available ELISA kit (Cusabio Biotech product, Interchim, Montluçon, France) according to manufacturer's instructions. The sensitivity of ELISA kit was 0.78 pg/ml.

Quantification of cytokine secretion. Determination of IFN- γ and IL-17a concentrations in the cell culture supernatants of activated CD4⁺ and CD8⁺ splenic T cells or in the co-culture of CD4⁺ and CD8⁺ splenic T cells co-cultured with VGVAPG-primed autologous DC was performed using commercially available Cytometric Bead Array (CBA) Flex Set technology (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions. CBA Flex Set capture bead is a single bead population with distinct fluorescence intensity and is coated with a capture antibody specific for a soluble protein. Preparation of samples was done according to the manufacturer's instructions. Briefly, serial dilutions (1/2, v/v) of the standard preparations were prepared whereas culture supernatants were used undiluted. Then, 50 μ L of mixed capture beads were added to each sample. After 1 h incubation period at room temperature, 50 μ L of PE detection reagent was added and samples were incubated for another 1 h at room temperature. Samples were then washed twice at 400 x g for 10 min and 150 μ L wash buffer was added. Flow cytometry analysis was performed using BD LSRFortessa cell analyzer and the CBA analysis FCAP software (BD Biosciences). A total of 700 events were acquired per analyte. The minimum detection level for IFN- γ , IL-17a and IL-4 was 0.5 pg/mL, 0.95 pg/mL and 0.3 pg/mL, respectively.

Flow cytometry analysis and cell sorting. Analysis of the surface antigens, intracellular cytokine and intra-nuclear transcription factor expressed on stimulated CD45⁺ leucocytes or sorted lymphocytes isolated from BALF, lung, mLN or spleen were performed as previously described.⁶ Briefly, cells were treated with Cytofix / CytoPerm or Transcriptional Factor buffer set (BD Biosciences) before incubation with intracytoplasmic antibodies or

intranuclear antibodies respectively. Whatever the experimental conditions used, incubation with antibodies was performed during 20 min at +4°C and in the dark. Following two successive centrifugations (300 x g, 10 min), pellets of stained cells were resuspended in 300 µL PBS containing 1% PFA, and stored in the dark at +4°C until analysis (at the latest 72 h after staining). In all protocols, fluorescence emission was assessed by flow cytometry using a BD LSRFortessa (BD Biosciences) cell analyzer and the BD Diva (BD Biosciences) and FlowJo (FlowJo, Ashland, USA) softwares. As compensation controls, OneComp eBeads were used (Biosciences Company, Paris, France) and isotype controls of each monoclonal antibody and fluorescence minus one tubes were used to assess negative population.

Statistical analysis. Data are presented as means ± SEM. Difference among groups was analyzed using one-way ANOVA followed by the Bonferroni *post hoc* test. For all analyses, a *p* value < 0.05 was considered as statistically significant. All statistical analyses were performed using the GraphPad Prism software (GraphPad software San Diego, CA, USA).

Results

Development of pulmonary emphysema is earlier in elderly mice compared to young mice following elastin peptide exposure. We previously demonstrated that six-week old mice instilled with the elastin hexa-peptide VGVAPG exhibited both lung accumulation of inflammatory and T cells and emphysematous structural changes^{6,8} Here, we delivered one single dose of the VGVAPG peptide (10 µg) into the trachea of 6-week-old and 15-month-old C57BL/6J mice and we performed differential cell counts on BAL fluids (BALF) obtained at days 1, 3, 7, 14, 21 and 28 after injection. As expected, flow cytometry analysis of BALF revealed that exposure of 6-week-old mice to the VGVAPG peptide induced acute cell infiltration of the airways, characterized by transitory increased macrophage, neutrophil and T lymphocyte content (Figures 1A and 1B). A maximal increase of infiltrating inflammatory cells (macrophages and neutrophils) and infiltrating CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes was observed respectively at day 1 (Figure 1A) and day 3 (Figure 1B) after injection. In the same experimental conditions, 15-month-old mice did not present differences in the kinetic of macrophage and neutrophil infiltration in BALF (Figure 1C) compared to 6-week-old mice (Figure 1A). However, macrophage and neutrophil cellularity at day-1 after exposure to VGVAPG was significantly higher in elderly mice (macrophages (x 10⁴): 10.9 ± 1.12 (older mice, Fig.1C) vs 7.21 ± 0.62 (younger mice, Fig. 1A); p<0.05; neutrophils (x 10⁵): 10.7 ± 1.56 (older mice, Fig.1C) vs 6.88 ± 0.55 (younger mice, Figure 1A); p<0.05). Furthermore, and despite no obvious quantitative differences in the T lymphocyte infiltrates between younger (Figure 1B) and older mice (Figure 1D), CD4⁺ and CD8⁺ T cell infiltration in the BALF of 15-month-old mice exposed to the VGVAPG peptide was delayed to reach a maximal value at day-6 after instillation (Figure 1D). Exposure to the VGVAPG peptide also induced pulmonary tissue infiltration of macrophages, neutrophils and T lymphocytes in both age groups of mice (Figure 2), with the elderly mice exhibiting significantly higher

quantitative infiltration of macrophages and neutrophils (Figure 2C) compared to the younger mice (Figure 2A). Furthermore, the kinetic profile clearly revealed that macrophage and neutrophil accumulation increased up to reach stable values around day 7 in older mice (Figure 2C) and day 14 in younger animals (Figure 2A). VGVAPG-dependent pulmonary tissue inflammation was also scored by T lymphocyte infiltration, with the elderly mice showing a number of infiltrated CD4⁺ and CD8⁺ T cells (Figure 2D) significantly lower at the earlier stage after peptide instillation (between days 1 and 6) compared to the younger mice (Figure 2B). However, at the latest times following instillation (between days 14 and 28) young and old mice no longer present statistical differences in the number of CD4⁺ and CD8⁺ T cells infiltrating lung (Figures 2B and 2D). In the two groups of age, PBS and the scramble VVGPGA peptide (data not shown) had no significant effect on both the cellular content of the BALF and the number of tissue infiltrated cells (Figures 1 and 2). Moreover, administration of a single dose of PPE (7.4 µg) resulted in kinetic and quantitative cell profiles comparable to those obtained after VGVAPG instillation (Figures 1 and 2).

Increase of inflammatory cell infiltrate and delay in lymphocytic infiltrate in 15-month-old mice exposed to the VGVAPG peptide were associated with an earlier breakdown of lung elastin and collagen compared to 6-week-old mice, as determined by auto-fluorescent analysis of elastin and collagen fibers at day-14 (Figure 3A). The ratio index that provides a quantification of the extent of extracellular matrix remodelling in terms of elastin and collagen structures decreased up to reach stabilized values around day-14 in elderly mice and day-21 in younger mice (Figure 3B). PBS-treated mice, of both groups, showed a normal distribution of both lung elastin and collagen. Earlier airspace remodelling in 15-month-old mice was also accompanied by an earlier airspace enlargement (Figure 3C), as confirmed by mean linear intercept values with elderly mice showing higher alveolar space size at day-14 after instillation compared to younger mice (Figure 3D). No significant differences were seen

in the ratio index or mean linear intercept between the groups of VGVAPG-treated mice and the groups exposed to PPE.

Figure 1

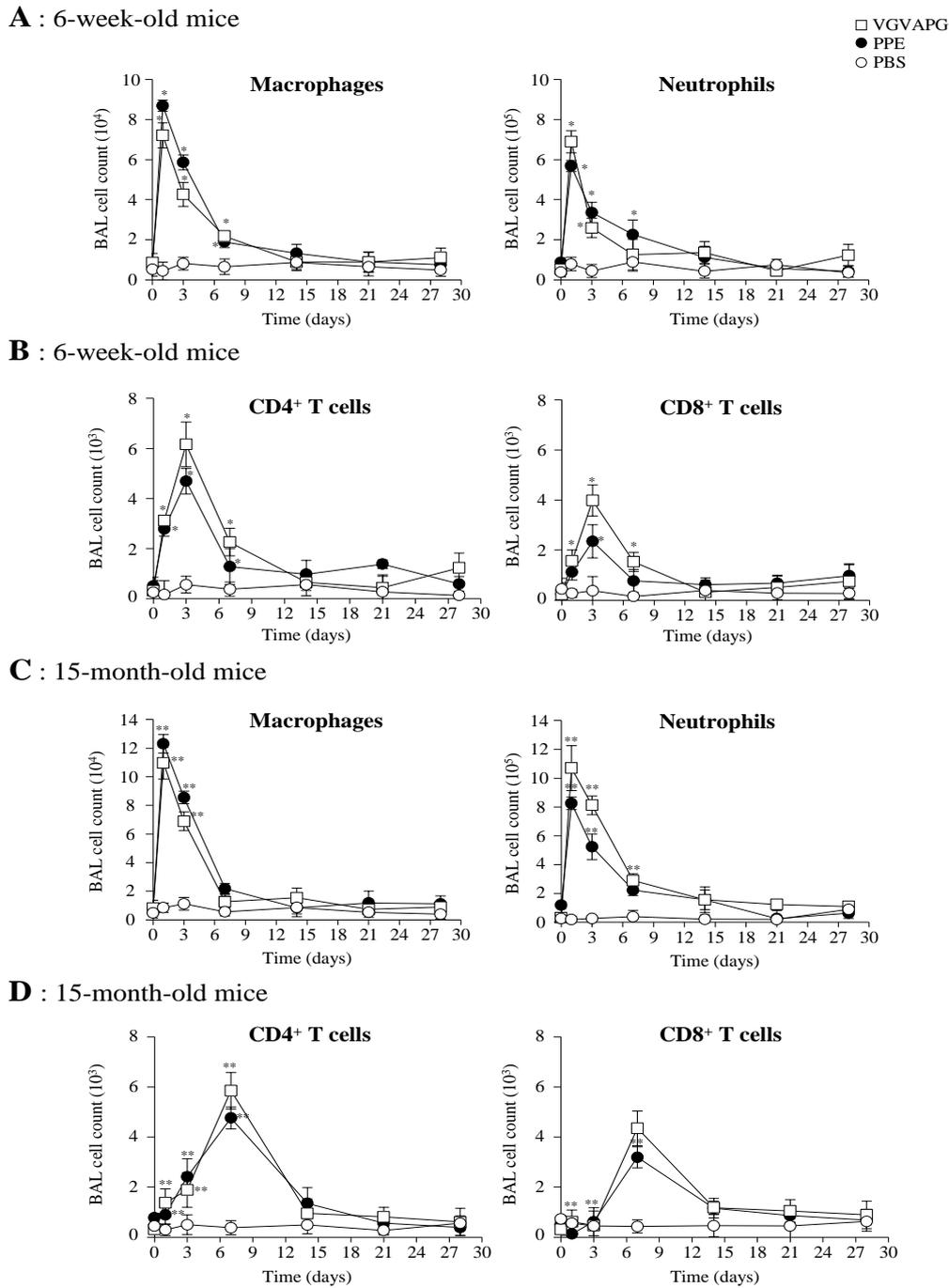
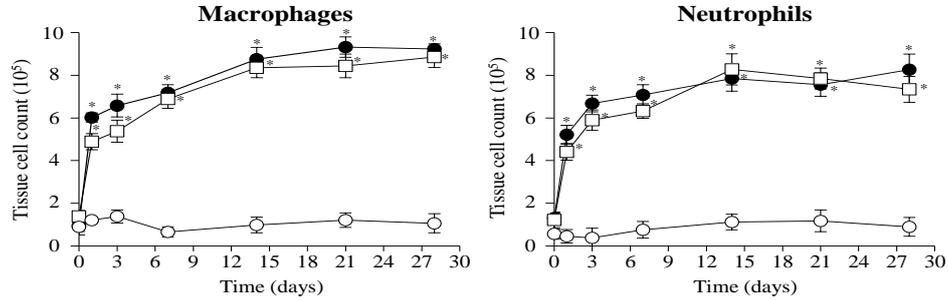


Figure 1. Increased inflammatory cell infiltrate and delayed lymphocytic infiltrate in the BALF of elderly versus younger mice exposed to the VGVAPG peptide. Flow cytometry analysis and specific cell count of macrophages, neutrophils and T lymphocytes were performed in the BALF of 6-week-old mice (A and B) and 15-month-old mice (C and D) exposed to a single injection of VGVAPG (10 μ g), PPE (7.4 μ g) or PBS. Cell counts were monitored between day 1 and day 28 following injection. In these experiments, $n = 6$ to 8 mice pooled per group and data represent mean of values from three separate experiments \pm SEM. *Significant difference comparing VGVAPG- or PPE- and PBS-treated mice ($p < 0.05$). **Significant difference comparing elderly versus younger mice in the same experimental conditions of time, induction (VGVAPG or PPE) and analysis ($p < 0.05$).

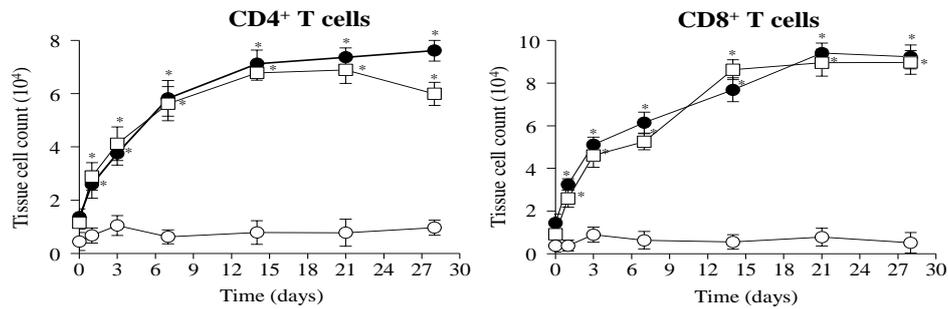
Figure 2

A : 6-week-old mice

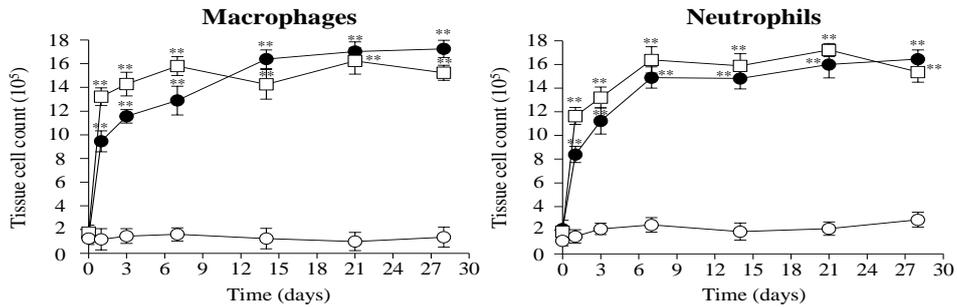
□ VGVAPG
● PPE
○ PBS



B : 6-week-old mice



C : 15-month-old mice



D : 15-month-old mice

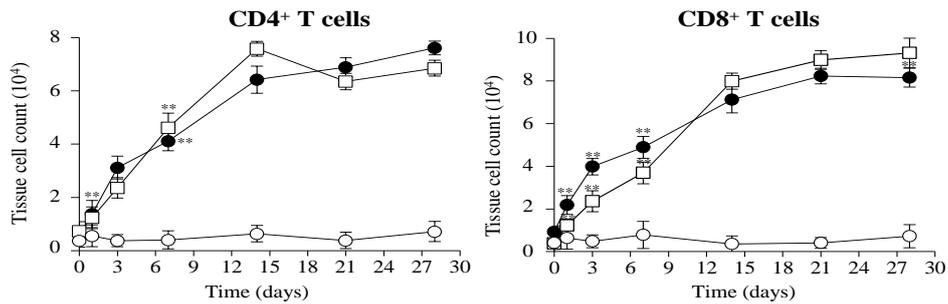


Figure 2. Increased inflammatory cell infiltrate and differential lymphocytic infiltrate in the pulmonary tissue of elderly versus younger mice exposed to the VGVAPG peptide. Flow cytometry analysis and specific cell count were performed from sorted macrophages, neutrophils and T lymphocytes isolated from lung of 6-week-old mice (A and B) and 15-month-old mice (C and D) exposed to a single injection of VGVAPG (10 µg), PPE (7.4 µg) or PBS. Cell counts were monitored between day 1 and day 28 following injection. In these experiments, n = 6 to 8 mice pooled per group and data represent mean of values from three separate experiments ± SEM. *Significant difference comparing VGVAPG- or PPE- and PBS-treated mice ($p < 0.05$). **Significant difference comparing elderly versus younger mice in the same experimental conditions of time, induction (VGVAPG or PPE) and analysis ($p < 0.05$).

Figure 3

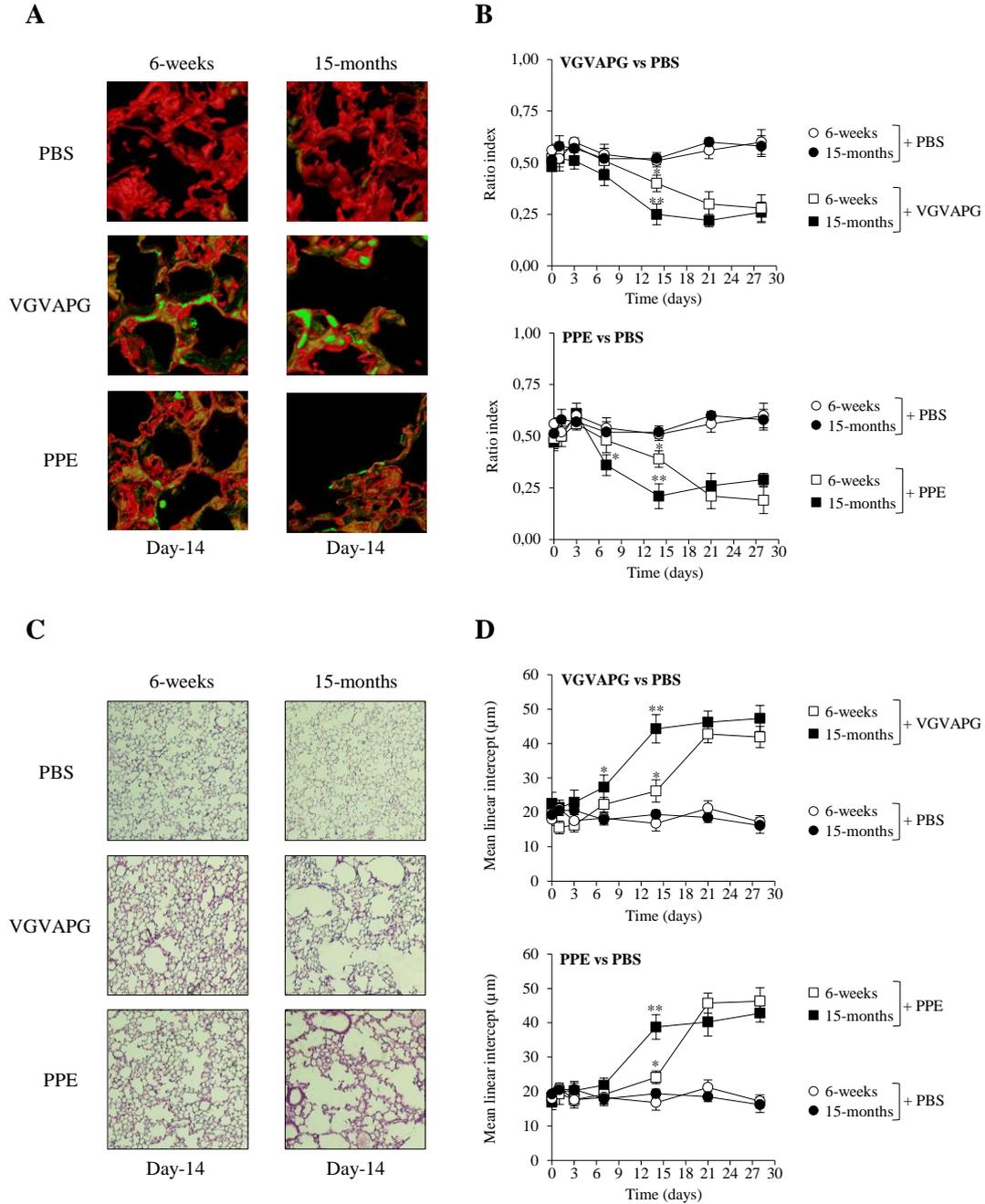


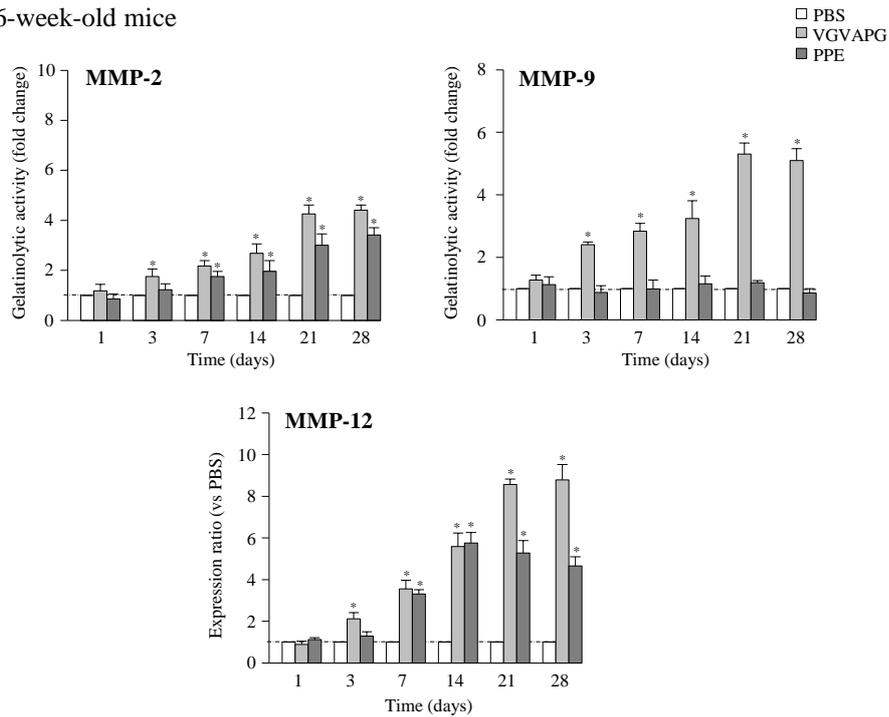
Figure 3. Earlier parenchymal degradation in the pulmonary tissue of elderly versus younger mice exposed to the VGVPAG peptide. Six-week-old mice and 15-month-old mice were exposed to a single injection of PBS, VGVPAG (10 µg) or PPE (7.4 µg). In these experiments, n = 6 to 8 mice pooled per group. A: auto-fluorescent analysis of elastin and collagen fibers organization in the lungs of mice at day-14 (63x). Photomicrographs are representative of three separate experiments. B: ratio index of the elastin-to-collagen structures measured from a 3D mapping of lung extracellular matrix components performed between day 1 and day 28 following injection. Data represent mean of values from three separate experiments ± SEM. C: morphological representation of Hematoxylin Phloxin Safran-stained lung sections obtained from mice at day-14 (100x). Photomicrographs are representative of three separate experiments. D: mean linear intercept measured from Hematoxylin Phloxin Safran-stained lung sections performed between day 1 and day 28 following injection. Data represent mean of values from four separate experiments ± SEM. *Significant difference comparing VGVPAG- or PPE- and PBS-treated mice in the same cohort of age ($p < 0.05$). **Significant difference comparing elderly versus younger mice ($p < 0.05$).

MMP and desmosine levels are increased in elderly mice compared to young mice following elastin peptide exposure. To better understand the role of aging in matrix protein degradation during pulmonary emphysema in mouse, we first evaluated in BALF the effects of aging on the expression of both neutrophil-derived matrix metalloproteinases (MMP)-2 and -9 and macrophage-derived MMP-12. Zymography analysis, performed at days 1, 3, 7, 14, 21 and 28 after instillation of the VGVAPG peptide, showed that exposure of six-week-old mice to the elastin peptide induced a significant increase of the gelatinolytic activities of MMP-2 and MMP-9 compared to PBS-treated mice (Figure 4A). Both activities increased from day 3 to a maximal value at day 21. In the same time points, western-blot analysis showed that MMP-12 expression in BAL fluids of six-week-old mice was gradually increased after VGVAPG injection to reach a maximal value around day 21 after instillation (Figure 4A). In similar experimental conditions, VGVAPG instillation in 15-month-old mice was associated with increased expression of MMP compared to 6-week old mice (Figure 4B). From day-1 to day-28, expressions of MMP-2, MMP-9 and MMP-12 were always significantly higher in elderly mice with levels reaching steady state values around day 14 in elderly mice against day 21 in younger mice (Figure 4). Except for MMP-9 protease activities that did not significantly differ from that observed in the PBS control group, MMP-2 and MMP-12 expressions in BALF of PPE-treated mice were delayed and consistently lower than those obtained after VGVAPG instillation in the two groups of age (Figures 4A and 4B). Comparison of MMP expressions in the BALF of PPE-treated young mice versus elderly mice revealed that MMP-2 and MMP-12 levels in the latter were significantly higher compared with the former group (Figures 4A and 4B). Although not shown, the scramble VVGPGA peptide had no significant effect on MMP expressions in the BALF of the two groups of age (data not shown). We next evaluated whether aging-dependent MMP expression levels in mice exposed to the VGVAPG peptide could be related with elastin fiber

degradation. Consistent with increase of MMP expression after exposure of 6-week-old mice to the VGVAPG peptide, there was an increase of desmosine concentrations in BALF and *sera* from VGVAPG-treated mice compared to PBS-exposed mice in the young cohort (Figure 5A). In both biological fluids, levels of desmosine were increased from day 7 to reach a maximal value at day 21 after instillation. Increase of desmosine levels was also found after instillation of PPE (Figure 5A). Such an increase in desmosine concentrations was also observed in BALF and *sera* from VGVAPG or PPE-treated elderly mice. This increase was even higher than in young mice, with desmosine levels detected as early as 3 days after peptide instillation (Figure 5B). In the two groups of age, PBS-sensitized mice had very low levels of desmosine in BALF and *sera* (Figures 5A and 5B).

Figure 4

A : 6-week-old mice



B : 15-month-old mice

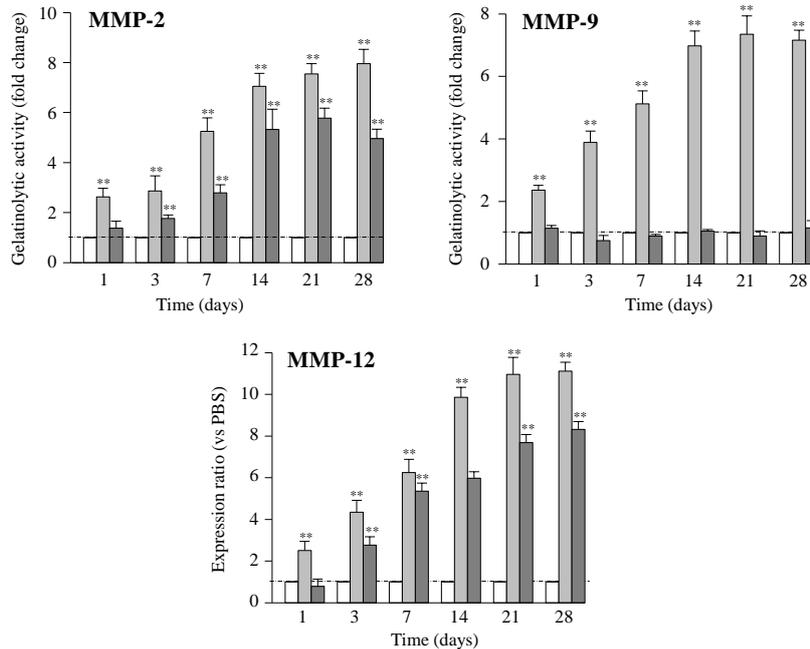
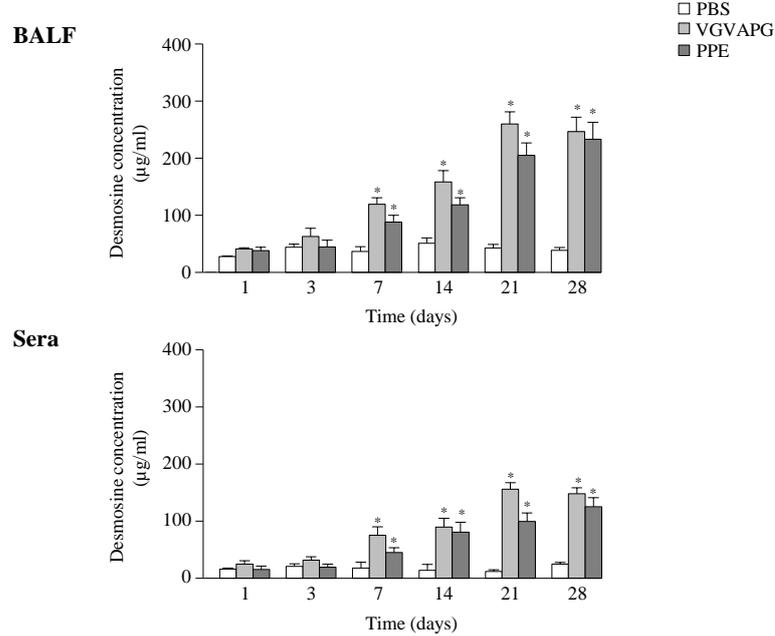


Figure 4. Increased expression of MMP in the BALF of elderly versus younger mice exposed to the VGVAPG peptide. Younger and elderly mice were exposed to a single injection of PBS, VGVAPG (10 μ g) or PPE (7.4 μ g). Expression of MMP-2, MMP-9 and MMP-12 were studied in BALF of six-week-old mice (A) and 15-month-old mice (B) collected between day 1 and day 28 following injection. In all experiments, $n = 6$ to 8 mice pooled per group and data represent mean of values from four separate experiments \pm SEM. *Significant difference comparing VGVAPG- or PPE- and PBS-treated mice ($p < 0.05$). **Significant difference comparing elderly versus younger mice in the same experimental conditions of time, induction (VGVAPG or PPE) and analysis ($p < 0.05$).

Figure 5

A : 6-week-old mice



B : 15-month-old mice

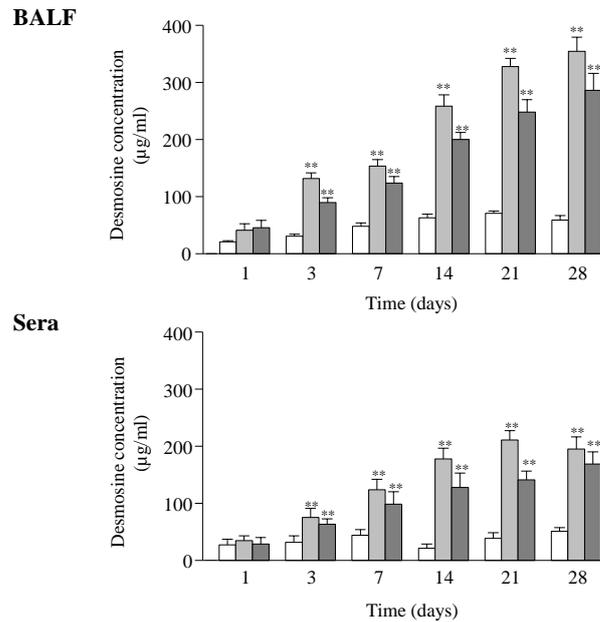


Figure 5. Increased desmosine concentrations in the BALF and *sera* of elderly versus younger mice exposed to the VGVAPG peptide. Younger and elderly mice were exposed to a single injection of PBS, VGVAPG (10 µg) or PPE (7.4 µg). Desmosine concentrations were measured in BALF and *sera* of six-week-old mice (A) and 15-month-old mice (B) collected between day 1 and day 28 following injection. In all experiments, n = 6 to 8 mice pooled per group and data represent mean of values from four separate experiments ± SEM. *Significant difference comparing VGVAPG- or PPE- and PBS-treated mice ($p < 0.05$). **Significant difference comparing elderly versus younger mice in the same experimental conditions of time, induction (VGVAPG or PPE) and analysis ($p < 0.05$).

The proportion of CD8⁺ T cells expressing IFN- γ is reduced in elderly mice compared to young mice following elastin peptide exposure. We previously demonstrated that exposure of 6-week-old mice to the VGVAPG peptide resulted in a significant increase in the proportion of anti-CD3/CD28-activated CD4⁺ and anti-CD3/CD28-activated CD8⁺ T cells expressing type 1 (IFN- γ) or type 17 (IL-17a) cytokines without effects on type 2 (IL-4) cytokines.⁶ To evaluate the effect of aging on the T helper (Th) and T cytotoxic (Tc) responses during murine elastin peptide-triggered pulmonary emphysema, we examined at day-21 the levels of IFN- γ and IL-17a expressed by activated CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes locally (lung tissue and mLN) and at systemic level (spleen). As expected, flow cytometry analysis of the T lymphocyte-dependent cytokine expression in 6-week-old mice exposed to the VGVAPG peptide showed that, in all three tissue types, expression of intracellular IFN- γ and IL-17a in CD4⁺ T cells (Figure 6A) and expression of intracellular IFN- γ in CD8⁺ T cells (Figure 7A) were significantly higher in VGVAPG- and PPE-treated mice than in PBS-treated mice. In the same experimental conditions, 15-month-old mice did not exhibit statistical differences in the proportion of CD4⁺ T cells expressing intracellular IFN- γ or intracellular IL-17a compared to 6-week-old mice (Figure 6B). In contrast and whatever was the tissue type analyzed, the proportion of CD8⁺ T cells expressing IFN- γ was lower in 15-month-old mice compared to 6-week-old mice (Figure 7B). According to our intracellular analysis, the expression of the transcriptional factor driving IFN- γ (T-bet) synthesis and the secretion of IFN- γ protein were lower in CD8⁺ T cells isolated from elderly mice (data not shown). Similar results were obtained after endotracheal administration of PPE (Figures 6B and 7B).

Figure 6

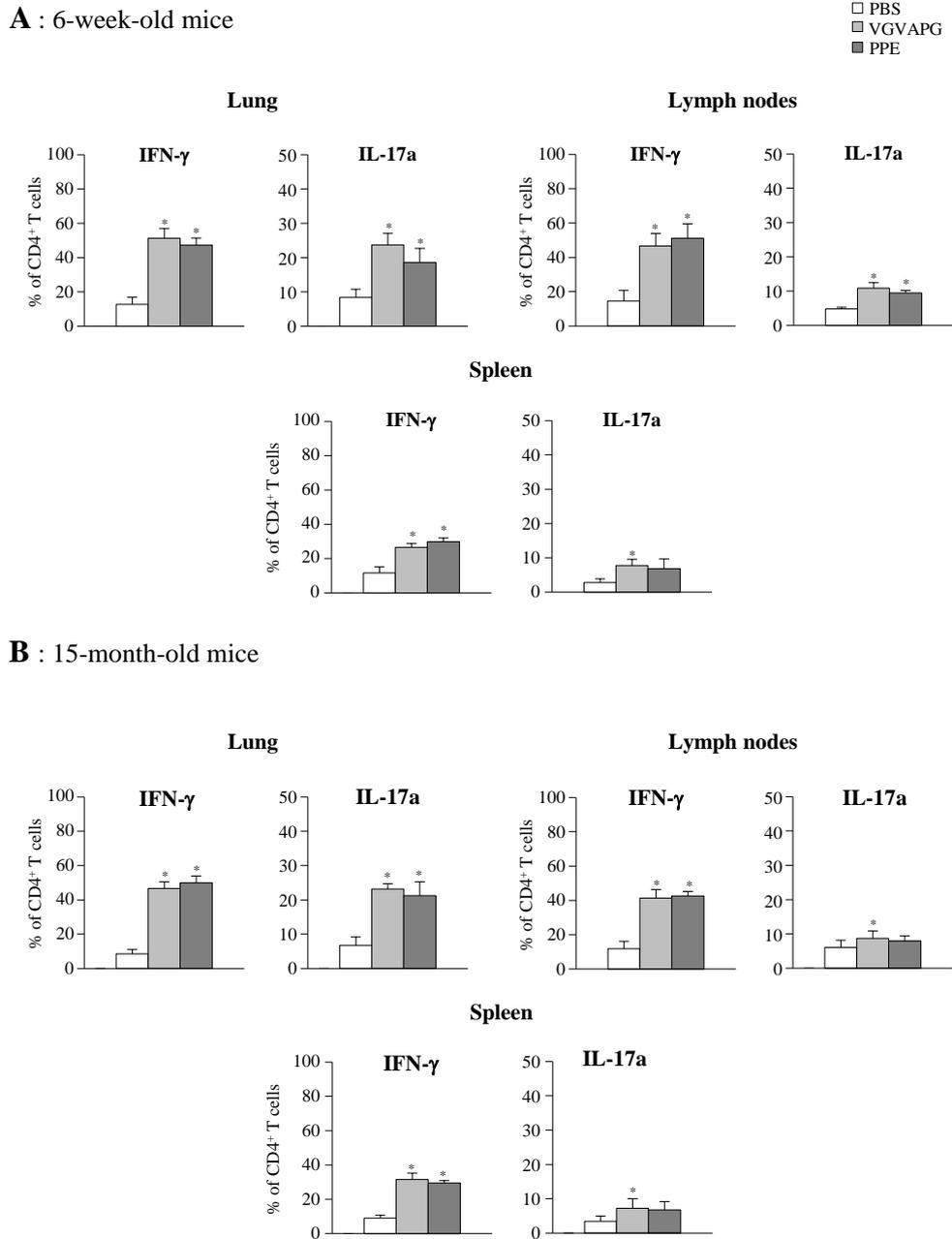


Figure 6. No significant difference in the proportion of CD4⁺ T cells expressing IFN- γ or IL-17 in lung, lymph nodes and spleen of elderly versus younger mice exposed to the VGVAPG peptide. Flow cytometry analysis of intracellular cytokine expression (IFN- γ and IL-17a) were performed after anti-CD3/CD28 stimulation of CD4⁺ T cells isolated from lung, lymph nodes and spleen of 6-week-old (A) or 15-month-old mice (B) 21-days exposed to PBS, VGVAPG or PPE. Values are expressed as percentage of activated CD4⁺ T cells expressing each cytokine. In these experiments, n = 6 to 10 mice per group and data represent mean of values from three separate experiments \pm SEM. *Significant difference comparing VGVAPG- or PPE- and PBS-treated mice ($p < 0.05$). **Significant difference comparing elderly versus younger mice in the same experimental conditions of time, induction (VGVAPG or PPE) and analysis ($p < 0.05$).

Figure 7

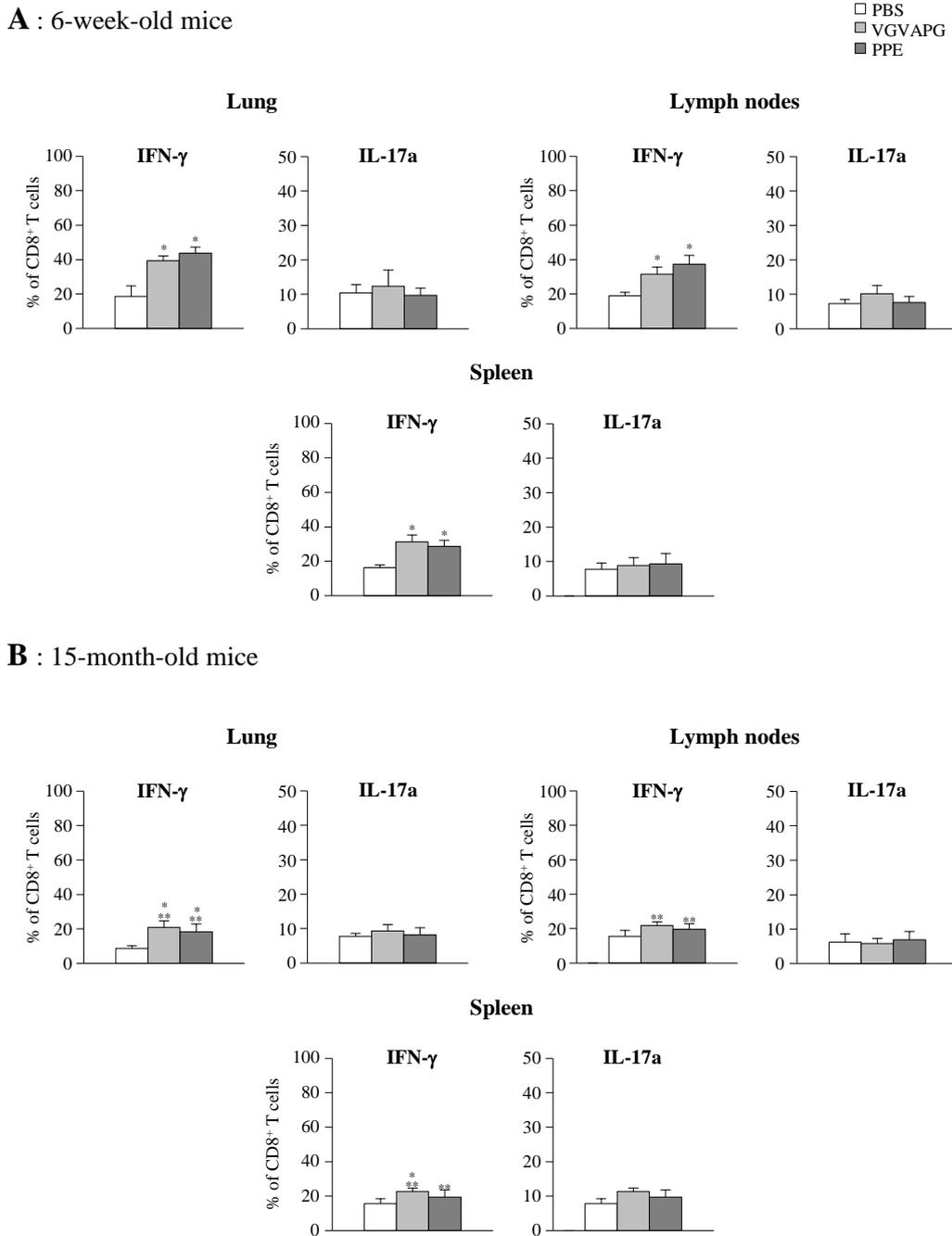
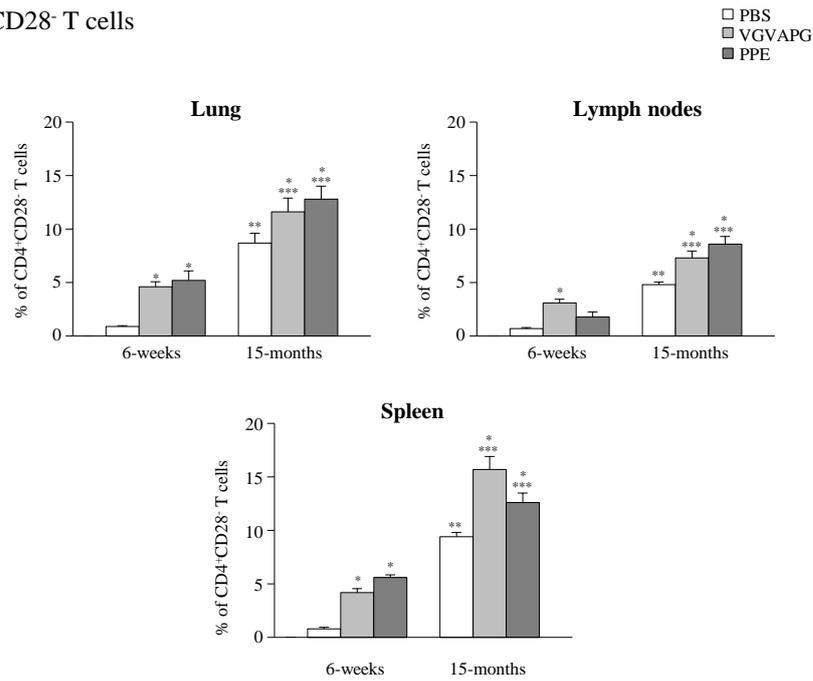


Figure 7. Decreased proportion of CD8⁺ T cells expressing IFN- γ in lung, lymph nodes and spleen of elderly versus younger mice exposed to the VGVAPG peptide. Flow cytometry analysis of intracellular cytokine expression (IFN- γ and IL-17a) were performed after anti-CD3/CD28 stimulation of CD8⁺ T cells isolated from lung, lymph nodes and spleen of 6-week-old (A) or 15-month-old mice (B) 21-days exposed to PBS, VGVAPG or PPE. Values are expressed as percentage of activated CD8⁺ T cells expressing each cytokine. In these experiments, n = 6 to 10 mice per group and data represent mean of values from three separate experiments \pm SEM. *Significant difference comparing VGVAPG- or PPE- and PBS-treated mice ($p < 0.05$). **Significant difference comparing elderly versus younger mice in the same experimental conditions of time, induction (VGVAPG or PPE) and analysis ($p < 0.05$).

The proportion of CD4⁺CD28⁻ and CD8⁺CD28⁻ T cells is increased in tissue of elderly mice compared to young mice following elastin peptide exposure. Loss of CD28 molecule expression at the surface of CD8⁺ T cells has been reported as a characteristic of both aging immune system and COPD-related immune response.^{19-22,29,30} Thus, we next investigated the consequence of aging on the proportion of CD4⁺CD28⁻ and CD8⁺CD28⁻ T cells in lung, lymph nodes and spleen isolated at day-21 from VGVAPG-treated mice. Flow cytometry analysis showed that the proportion of CD4⁺CD28⁻ and CD8⁺CD28⁻ T cells was significantly increased in lung isolated from VGVAPG-treated young mice compared to the control group exposed to PBS (Figures 8A and 8B). However, the proportion of CD8⁺CD28⁻ T cells among the cells isolated from lung of 6-week-old mice was significantly higher than that of CD4⁺CD28⁻ T cells (21.9% CD8⁺CD28⁻ T cells versus 4.6% CD4⁺CD28⁻ T cells). The VGVAPG effects on the proportion of lung CD4⁺CD28⁻ and CD8⁺CD28⁻ T cells were also confirmed in mLN (11.7% CD8⁺CD28⁻ T cells versus 3.1% CD4⁺CD28⁻ T cells) and spleen (25.3% CD8⁺CD28⁻ T cells versus 4.2% CD4⁺CD28⁻ T cells) (Figures 8A and 8B). At 15 months of age, the proportion of CD4⁺CD28⁻ and CD8⁺CD28⁻ T cells in lung, mLN and spleen isolated from PBS-treated mice was significantly higher than in PBS control group at 6 weeks (Figures 8A and 8B). In addition, in the VGVAPG-treated elderly mice the proportion of CD4⁺CD28⁻ and CD8⁺CD28⁻ T cells was maximized in the three tissues compared to PBS control in the same age group (Figures 8A and 8B). Interestingly, in all cases the proportion of CD4⁺CD28⁻ and CD8⁺CD28⁻ T cells in the tissues of VGVAPG-instilled mice was significantly higher in elderly versus younger mice (Figures 8A and 8B). Similar results that those described following VGVAPG instillation were obtained with cells isolated from tissue of PPE-treated mice (Figures 8A and 8B).

Figure 8

A : CD4⁺CD28⁻ T cells



B : CD8⁺CD28⁻ T cells

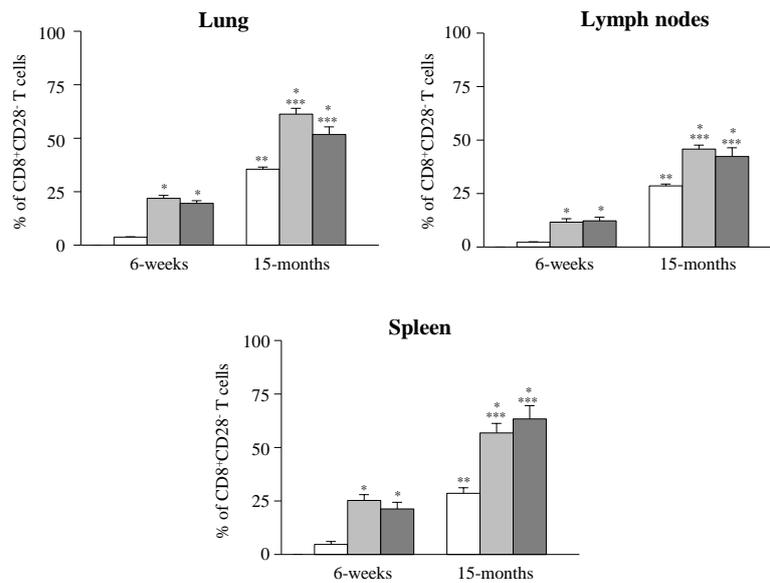


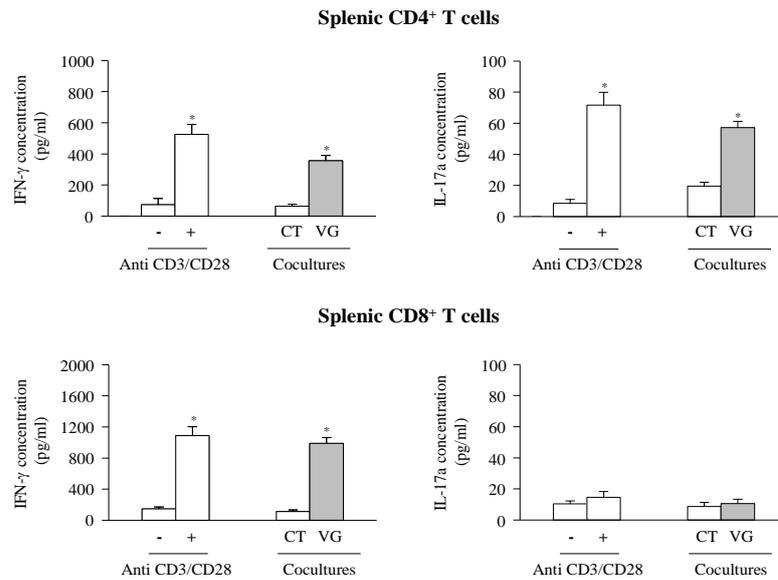
Figure 8. Increased proportion of CD4⁺CD28⁻ and CD8⁺CD28⁻ T cells in lung, lymph nodes and spleen of elderly versus younger mice exposed to the VGVAPG peptide. Flow cytometry analysis of the proportion of CD4⁺CD28⁻ T cells (A) and CD8⁺CD28⁻ T cells (B) were performed from T cells isolated from lung, lymph nodes and spleen of 6-week-old or 15-month-old mice 21-days exposed to PBS, VGVAPG or PPE. Values are expressed as percentage of CD4⁺CD28⁻ and CD8⁺CD28⁻ T cells among total CD4⁺ and CD8⁺ T cells, respectively. In these experiments, n = 6 to 10 mice per group and data represent mean of values from three separate experiments ± SEM. *Significant difference comparing VGVAPG- or PPE- and PBS-treated mice in the same age group ($p < 0.05$). **Significant difference comparing elderly versus younger mice in the PBS-treated groups ($p < 0.05$). ***Significant difference comparing elderly versus younger mice in the VGVAPG-treated groups or in the PPE-treated groups ($p < 0.05$).

IFN- γ levels are higher in the VGVAPG-specific T cell clones isolated from elderly mice compared to young mice.

Since increase of the frequency of memory CD4⁺ and CD8⁺ T cells has been reported during age-related immune system evolution^{21,22}, we next questioned whether aging could influence elastin peptide-dependent reactivation of specific T cell clones isolated from VGVAPG-exposed mice and consequently influence their cytokine expression. Splenic CD4⁺ and splenic CD8⁺ T cells were sorted from spleen of VGVAPG-treated mice. Those cells were either 48 h activated with anti-CD3/CD28 coated beads or 48 h co-cultured with VGVAPG-pretreated CD45⁺ CD64⁺ autologous DC in the presence of the S-gal-specific antagonist peptide PGAIP to avoid the VGVAPG/elastin receptor interactions at the DC surface. As expected, CBA assay showed that IFN- γ was detected in the splenic CD4⁺ and in the splenic CD8⁺ T cell cultures of both groups of mice 48 h after anti-CD3/CD28 activation while IL-17a was only detected in the splenic CD4⁺ T cell cultures, with the elderly mice exhibiting significantly lower levels of IFN- γ in the activated CD8⁺ T cells than the younger mice (Figures 9A and 9B). In the two groups of age, VGVAPG-specific IFN- γ levels were also significantly increased in the culture supernatants of splenic CD4⁺ T cell or CD8⁺ T cells co-cultured with VGVAPG-primed DC. Interestingly, IFN- γ levels in the culture supernatants of splenic CD4⁺ or CD8⁺ T cells isolated from elderly mice and co-cultured with VGVAPG-primed autologous DC (Figure 9B) were systematically significantly higher than those obtained with cells from younger mice (Figure 9A). In the same way, IL-17a levels in the culture supernatants of splenic CD4⁺ T cell co-cultured with VGVAPG-primed DC was higher in elderly mice (Figures 9A and 9B). Using the same experimental conditions, splenic CD4⁺ or splenic CD8⁺ T cells sorted from spleen of PBS-treated mice and co-cultured with VGVAPG-pulsed DC were unable to induce significant IFN- γ or IL-17a secretion in the cell culture supernatants (data not shown).

Figure 9

A : 6-week-old mice



B : 15-month-old mice

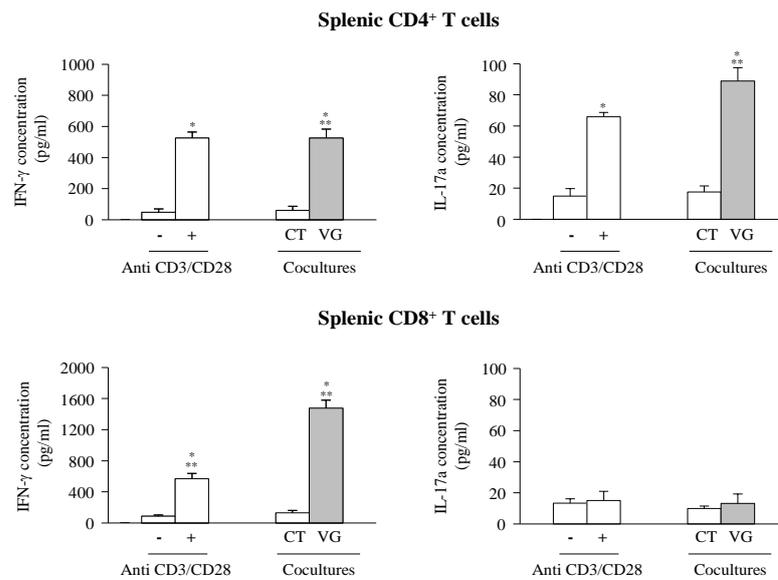


Figure 9. Increased IFN- γ levels in the VGVAPG-specific T cell clones isolated from spleen of elderly mice compared to young mice. Cytometric Bead Array analysis of IFN- γ and IL17-a production were performed either after anti-CD3/CD28 stimulation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells isolated from spleen of 6-week-old mice (A) or 15-month-old mice (B) 21-days exposed to VGVAPG or after co-culture of the same CD4⁺ and CD8⁺ T cells isolated from spleen of 6-week-old mice (A) or 15-month-old mice (B) with autologous DC pretreated with VGVAPG in the presence of the antagonist elastin peptide receptor, PGAIP. CT: co-culture with autologous DC only pretreated with the antagonist elastin peptide receptor, PGAIP. In these experiments, n = 7 to 10 mice per group and data represent mean of values from two separate experiments \pm SEM. *Significant difference comparing antiCD3/CD28 treatment of splenic T cells with untreated cells (-) or comparing co-culture of splenic T cells with autologous DC pretreated (VG) or not (CT) with VGVAPG ($p < 0.05$). **Significant difference comparing splenic T cells isolated from elderly versus younger mice in the same experimental conditions of treatment (antiCD3/CD28 activation or coculture with autologous DC) ($p < 0.05$).

Discussion

Several clinical observations support the hypothesis that aging may play a key role in the pathogenesis of COPD. Immunosenescence is referred to age-related modifications of the immune system, characterized by phenotypic and functional dysregulation of immune cells. It has been shown that EP could initiate in young mice emphysematous structural changes⁸ and could also orientate the immune response toward a pro-inflammatory profile.⁶ The present study was designed to assess the effects of aging on emphysema development and T cell response in a mouse model of EP exposure.

We clearly observed an accelerated emphysema process in elderly mice after instillation of EP, i.e. the VGVAPG peptide, leading to an increase of the inflammatory cell infiltration in BALF and lung tissue, as well as an earlier airway remodeling. These observations are consistent with recent data showing emphysema development after less than 3 months of cigarette smoke (CS) exposure in aged mice, whereas younger mice require at least 4 months of CS exposure to exhibit the same pathophysiological characteristics.³⁴ However, controversy remains regarding the contribution of aging in accelerating emphysema development, since another study does not highlight such differences in COPD development between young and old mice after a long-term CS exposure for 6 months.³⁵ These contradictory results could be explained by the differences in their experimental strategy and more specifically the period of time during which mice were exposed to CS. An extended CS exposure for 6 months can be supposed to induce a too high level of disease severity to observe significant differences in the two murine model of age. Furthermore, we demonstrated in this study that PPE, a well described inducer of the emphysematous process,^{36,37} also yielded to differences between young and old mice, revealing comparable aging effects on the emphysema development than those obtained after VGVAPG exposure. Contribution of macrophage- and neutrophil-derived proteases in initiating the emphysema

process has been clearly described.³⁸⁻⁴¹ Here we report that MMP-2, -9 and -12 are present in significant amounts in BALF during the initial (from day-3) and later (beyond day-14) phases of EP induced-pulmonary emphysema, and that these proteases are higher and earlier expressed in the BALF of elderly mice. In accordance with the levels of EP-induced MMP activities in elderly mice, a larger and earlier secretion of desmosine, a specific marker for elastin degradation, was found in BALF but also in *sera* of aged mice. These findings clearly suggest a direct correlation between the number of lung-infiltrating inflammatory cells, the combined elastolytic protease expression and elastin degradation and the earlier airway remodeling in aged animals.

Aging and cellular senescence raise inflammatory processes as shown by the increased production of inflammatory cytokines by major senescent cells.⁴² Consequently, a low-grade systemic inflammation settles with aging and this process that is called "inflammaging" actively contributes to immunosenescence and chronic disease development.^{43,44} Loss of CD28 by T cells is largely linked to immunosenescence.²³ Interestingly, in this study increased proportion of CD4⁺CD28⁻ and CD8⁺CD28⁻ T cells was observed in elderly mice treated with PBS when compared with young mice. This data is consistent with previous studies demonstrating that frequency of CD4⁺CD28⁻ and CD8⁺CD28⁻ T cells increases with aging,⁴⁵ and that senescent T cells cultures are > 95% CD28⁻ within the CD8⁺ T cell subset, as compared to over 90% positive in the starting population from healthy young donors.⁴⁶ Moreover, increased proportion of tissue-infiltrating CD4⁺CD28⁻ and CD8⁺CD28⁻ T cell subsets was detected 21 days after VGVAPG-instillation in the two age groups of mice, with the elderly mice exhibiting significantly higher percentage of CD4⁺CD28⁻ and CD8⁺CD28⁻ T cell subsets than young mice. Our data obtained in murine models corroborate those of other studies demonstrating in human that *i*) COPD is associated with increased CD8⁺CD28⁻ senescent T, and these cells are more cytotoxic/pro-inflammatory than CD8⁺CD28⁺ T cells,³⁰

and *ii*) the enhanced presence of CD4⁺CD28⁻ cells is associated with impaired lung function in COPD.²⁹

We also demonstrated in this study that the proportion of IFN- γ -expressing CD4⁺ T cells in lung, mLN and spleen after VGVAPG exposure was similar for both groups of mice. On the opposite, administration of VGVAPG to elderly mice was associated with a significant decrease in the percentage of tissue-infiltrating CD8⁺ T cells expressing IFN- γ when compared to VGVAPG-treated young mice. We found in the target tissues of VGVAPG-treated elderly mice a significant increased proportion of the CD4⁺ and CD8⁺ T cells having lost the CD28 marker. In addition, loss of CD28 expression in CD8⁺ T cells was systematically higher than in CD4⁺ T cells. In our experimental conditions, intracellular cytokine expression was analyzed 48 h after treatment of CD4⁺ or CD8⁺ T cells with beads coated with antibodies against CD3 and CD28. We can then hypothesize that such an experimental design can explain why we did not highlight difference in IFN- γ expression by CD4⁺ T cells between young and old mice whereas a significant decrease of this cytokine expression is observed in the CD8⁺ T cells. This hypothesis is supported by a previous study showing that CD4⁺ and CD8⁺ T cells express the CD28 molecule at birth,⁴² while getting older about 10-15% of CD4⁺ and 50-60% of CD8⁺ T cells lack CD28 expression.²² Based on this higher levels of CD8⁺CD28⁻ T cells during aging, we could explain that the proportion of IFN- γ -expressing CD8⁺CD28⁻ T cells isolated from elderly mice tissues was significantly reduced following anti-CD3/CD28 activation compared to younger mice. Similarly, no significant difference in anti-CD3/CD28 effects on IFN- γ expression by CD4⁺CD28⁻ T cells between young and old mice could be correlated by the low levels of CD4⁺CD28⁻ T cells with aging.

T cell-mediated immunity is particularly susceptible to aging, and T cells are driven to senescence in a fairly predictable manner with a deep and linear alteration in the frequency of

naive and memory CD4⁺ and CD8⁺ T cells.⁴⁷ We here demonstrated an increase with age of VGVAPG-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cell clones resulting in an increased production of Th1, Th17 and Tc1 pro-inflammatory cytokines. These results, that reinforce the critical role of aging in accumulation of late-differentiated memory CD4⁺ and CD8⁺ T cells,^{20,21} are in accordance with findings revealing *i*) that purified lung-resident CD4⁺ T cells incubated with irradiated allogeneic peripheral blood mononuclear cells exhibit higher proliferative response in the presence of human lung EP,⁴⁸ and *ii*) the contribution of EP to the clonal expansion of lung resident autoreactive CD4⁺ T cells from patients with severe COPD.⁴⁹

Taken as a whole, our data demonstrate that aging accelerates EP-induced emphysema development. Aging results in a chronic low-grade inflammatory state^{43,44} that promotes lung inflammatory cell recruitment and protease release, leading to elastin degradation and EP production.¹⁷ Age-related EP production progressively induces airway remodelling¹⁸ that is maximized in elderly mice exposed to exogenous EP. The resulting emphysema process involves EP-dependent IFN- γ and IL-17 production⁶. This pro-inflammatory cytokine profile is perpetuated by aging and the increased genesis of EP-specific senescent T cell clones.

Acknowledgements

This work was supported by the University of Reims Champagne-Ardenne and the Champagne-Ardenne region.

Grants

Alexandre Pierre received a Grant for doctoral training from the Champagne-Ardenne region.

Disclosures

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors

References

1. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease, Global initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) 2017. *www.Goldcopd.org*. Date last accessed: October 2017.
2. Owen CA. Proteinases and oxidants as targets in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*, 2:373-385, 2005.
3. Lombard C, Arzel L, Bouchu D, Wallach J, Saulnier J. Human leukocyte elastase hydrolysis of peptides derived from human elastin exon 24. *Biochimie*, 88:1915-1921, 2006.
4. Dupont A, Dury S, Gafa V, Lebargy F, Deslee G, Guenounou M, Antonicelli F, Le Naour R. Impairment of neutrophil reactivity to elastin peptides in COPD. *Thorax*, 68:421-428, 2013.
5. Schriver EE, Davidson JM, Sutcliffe MC, Swindell BB, Bernard GR. Comparison of elastin peptide concentrations in body fluids from healthy volunteers, smokers, and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis*, 145:762-766, 1992.
6. Meghraoui-Kheddar A, Pierre A, Sellami M, Audonnet S, Lemaire F, Le Naour R. Elastin receptor (S-gal) occupancy by elastin peptides modulates T-cell response during murine emphysema. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 313:L534-L547, 2017.
7. Houghton AM, Quintero PA, Perkins DL, *et al.* Elastin fragments drive disease progression in a murine model of emphysema. *J Clin Invest* 116: 753–759, 2006.

8. Sellami M, Meghraoui-Kheddar A, Terryn C, Fichel C, Bouland N, Diebold MD, Guenounou M, Hery-Huynh S, Le Naour R. Induction and regulation of murine emphysema by elastin peptides. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 310:L8-L23, 2016.
9. Hodge G, Nairn J, Holmes M, Reynolds PN, Hodge S. Increased intracellular T helper 1 proinflammatory cytokine production in peripheral blood, bronchoalveolar lavage and intraepithelial T cells of COPD subjects. *Clin Exp Immunol*, 150:22-29, 2007.
10. Majori M, Corradi M, Caminati A, Cacciani G, Bertacco S, Pesci A. Predominant Th1 cytokine pattern in peripheral blood from subjects with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol*, 103:458-462, 1999.
11. Barczyk A, Pierzchala W, Kon OM, Cosio B, Adcock IM, Barnes PJ. Cytokine production by bronchoalveolar lavage T lymphocytes in chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol*, 117:1484-1492, 2006.
12. Schild K, Knobloch J, Yakin Y, Jungck D, Urban K, Muller K, Koch A. IL-5 release of CD4⁺ non-effector lymphocytes is increased in COPD-modulating effects of moxifloxacin and dexamethasone. *Int Immunopharmacol*, 11:444-448, 2011.
13. Di Stefano A, Caramori G, Gnemmi I, Contoli M, Vicari C, Capelli A, Magno F, D'Anna SE, Zanini A, Brun P, Casolari P, Chung KF, Barnes PJ, Papi A, Adcock I, Balbi B. T helper type 17-related cytokine expression is increased in the bronchial mucosa of stable chronic obstructive pulmonary disease patients. *Clin Exp Immunol*, 157:316-324, 2009.
14. Shan M, Cheng HF, Song LZ, Roberts L, Green L, Hacken-Bitar J, Huh J, Bakaeen F, Coxson HO, Storness-Bliss C, Ramchandani M, Lee SH, Corry DB, Kheradmand F. Lung myeloid dendritic cells coordinately induce Th1 and Th17 responses in human emphysema. *Sci Transl Med*, 1:4-10, 2009.

15. Gadgil A, Zhu X, Scirba FC, Duncan SR. Altered T-cell phenotypes in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*, 3:487-488, 2006.
16. Gadgil A, Duncan SR. Role of T-lymphocytes and pro-inflammatory mediators in the pathogenesis of COPD. *Int J Chron Pulmon Dis*, 3:531-541, 2008.
17. Vrhovski B, Weiss AS. Biochemistry of tropoelastin. *Eur J Biochem*, 258:1-18, 1998.
18. Janssens JP, Pache JC, Nicod LP. Physiological changes in respiratory function associated with ageing. *Eur Respir J*, 13:197-205, 1999.
19. Lynch HE, Goldberg GL, Chidgey A, Van den Brink MR, Boyd R, Sempowski GD. Thymic involution and immune reconstitution. *Trends Immunol*, 30:366-373, 2009.
20. Saule P, Trauet J, Dutriez V, Lekeux V, Dessaint JP, Labalette M. Accumulation of memory T cells from childhood to old age: central and effector memory cells in CD4(+) versus effector memory and terminally differentiated memory cells in CD8(+) compartment. *Mech Ageing Dev*, 27:274-281, 2006.
21. Callahan JE, Kappler JW, Marrack P. Unexpected expansions of CD8-bearing cells in old mice. *J Immunol*, 151:6657-6669, 1993.
22. Fagnoni FF, Vescovini R, Mazzola M, Bologna G, Nigro E, Lavagetto G, Franceschi C, Passeri M, Sansoni P. Expansion of cytotoxic CD8⁺CD28⁻ T cells in healthy ageing people, including centenarians. *Immunology*, 88:501-507, 1996.
23. Vallejo AN, Brandes JC, Weyand CM, Goronzy JJ. Modulation of CD28 expression: distinct regulatory pathways during activation and replicative senescence. *J. Immunol*, 162 :6572-6579, 1999.

24. Thewissen M, Somers V, Venken K, Linsen L, van Paassen P, Geusens P, Damoiseaux J, Stinissen P. Analyses of immunosenescent markers in patients with autoimmune disease. *Clin Immunol*, 123:209-18, 2007.
25. Fletcher C, Peto R. The natural history of chronic airflow obstruction. *Br Med J*, 1:1645-1648, 1977.
26. Buist AS, McBurnie MA, Vollmer WM, Gillespie S, Burney P, Mannino DM, Menezes AMB, Sullivan SD, Lee TA, Weiss KB, Jensen RL, Marks GB, Gulsvik A, Nizankowska-Mogilnicka E. BOLD Collaborative Research Group. International variation in the prevalence of COPD (the BOLD Study): a population-based prevalence study. *Lancet*, 370:741-750, 2007.
27. Aoshiha K, Nagai A. Senescence hypothesis for the pathogenetic mechanism of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*, 6:596-601, 2009.
28. Faner R, Rojas M, MacNee W, Agusti I. Abnormal lung aging in chronic obstructive pulmonary disease and idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 186:306-13, 2012.
29. Lambers C, Hacker S, Posch M, Hoetzenecker K, Pollreisz A, Lichtenauer M, Klepetko W, Ankersmit HJ. T cell senescence and contraction of T cell repertoire diversity in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Exp Immunol*, 155:466-75, 2009.
30. Hodge G, Mukaro V, Reynolds PN, Hodge S. Role of increased CD8/CD28 (null) T cells and alternative co-stimulatory molecules in chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Exp Immunol*, 166:94-102, 2011.

31. Lindberg CA, Engström G, de Verdier MG, Nihlén U, Anderson M, Forsman-Semb K, Svartengren M. Total desmosines in plasma and urine correlate with lung function. *Eur Respir J*, 39:839-845, 2012.
32. Barthelemi S, Robinet J, Garnotel R, Antonicelli F, Schittly E, Hornebeck W, Lorimier S. Mechanical forces-induced human osteoblasts differentiation involves MMP-2/MMP-13/MT1-MMP proteolytic cascade. *J Cell Biochem*, 113:760-772, 2012.
33. Ntayi C, Labrousse A-L, Debret R, Birembaut P, Bellon G, Antonicelli F, Hornebeck W, Bernard P. Elastin-derived peptides upregulate matrix metalloproteinase-2-mediated melanoma cell invasion through elastin-binding protein. *J Invest Dermatol*, 122:256-265, 2004.
34. John-Schuster G, Günter S, Hager K, Conlon TM, Eickelberg O, Yildirim AÖ. Inflammaging increases susceptibility to cigarette smoke-induced COPD. *Oncotarget*. 2016 May 24;7(21):30068-83.
35. Zhou S, Wright JL, Liu J, Sin DD, Churg A. Aging does not enhance experimental cigarette smoke-induced COPD in the mouse. *PLoS One*, 8:e71410, 2013.
36. Shim YM, Paige M, Hanna H, Kim SH, Burdick MD, Strieter RM. Role of LTB₄ in the pathogenesis of elastase-induced murine pulmonary emphysema. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 299:L749-L759, 2010.
37. Snider GL, Lucey EC, Stone PJ. Animal models of emphysema. *Am Rev Respir Dis*, 133:149-169, 1985.
38. Zheng T, Zhu Z, Wang Z, Homer RJ, Ma B, Riese RJ Jr, Chapman HA Jr, Shapiro SD, and Elias JA. Inducible targeting of IL-13 to the adult lung causes matrix metalloproteinase- and cathepsin-dependent emphysema. *J Clin Invest*, 106:1081-1093, 2000.

39. Churg A, Zay K, Shay S, Xie C, Shapiro SD, Hendricks R, Wright JL. Acute cigarette smoke-induced connective tissue breakdown requires both neutrophils and macrophage metalloelastase in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 27:368–374, 2002.
40. Plantier L, Marchand-Adam S, Antico VG, Boyer L, De Coster C, Marchal J, Bachoual R, Mailleux A, Boczkowski J, Crestani B. Keratinocyte growth factor protects against elastase-induced pulmonary emphysema in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 293: L1230–L1239, 2007.
41. Yoshida S, Minematsu N, Chubachi S, Nakamura H, Miyazaki M, Tsuduki K, Takahashi S, Miyasho T, Iwabuchi T, Takamiya R, Tateno H, Mouded M, Shapiro SD, Asano K, Betsuyaku T. Annexin V decreases PS-mediated macrophage efferocytosis and deteriorates elastase-induced pulmonary emphysema in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 303:L852-L860, 2012.
42. Tsuji T, Aoshiba K, Nagai A. Alveolar cell senescence exacerbates pulmonary inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respiration*, 80:59-70, 2010.
43. Franceschi C, Bonafe M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, De Benedictis G. Inflammaging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci*, 908:244-254, 2000.
44. Franceschi C, Capri M, Monti D, Giunta S, Olivieri F, Sevini F, Panourgia MP, Invidia L, Celani L, Scurti M, Cevenini E, Castellani GC, Salvioli S. Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mech Ageing Dev*, 128:92-105, 2007.

45. Azuma M, Phillips JH, Lanier LL. CD28 co-stimulation of T-cell-mediated cytotoxicity. *Int J Cancer Supp*, 7:33-35, 1992. (Review)
46. Effros RB, Boucher N, Porter V, Zhu X, Spaulding C, Walford RL, Kronenberg M, Cohen D, Schächter F. Decline in CD28⁺ T cells in centenarians and in long-term T cell cultures: a possible cause for both in vivo and in vitro immunosenescence. *Exp Gerontol*, 29:601-609, 1994.
47. Lang PO, Govind S, Michel JP, Aspinall R, Mitchell WA. Immunosenescence: implications for vaccination programmes in adults. *Maturitas*, 68:322-330, 2011.
48. Hoetzenecker K, Mitterbauer A, Guenova E, Schweiger T, Altmann P, Zimmermann M, Hofbauer H, Beer L, Klepetko W, Ankersmit HJ. High levels of lung resident CD4⁺CD28null cells in COPD: implications of autoimmunity. *Wien Klin Wochenschr*, 125:150-155, 2013.
49. Lee SH, Goswami S, Grudo A, Song LZ, Bandi V, Goodnight-White S, Green L, Hacken-Bitar J, Huh J, Bakaeen F, Coxson HO, Cogswell S, Storness-Bliss C, Corry DB, Kheradmand F. Antielastin autoimmunity in tobacco smoking-induced emphysema. *Nat Med*, 13:567-9, 2007.

DISCUSSION, CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO) est une pathologie inflammatoire pulmonaire complexe dont l'emphysème est la composante majoritaire, et le tabac le principal facteur étiologique. Ainsi, 20 à 50% des fumeurs développeront une BPCO. Chez les fumeurs, l'activation progressive et constante des cellules inflammatoires au niveau pulmonaire (principalement macrophages et polynucléaires neutrophiles) conduit à une dérégulation pro-inflammatoire et à un déséquilibre de la balance protéases/anti-protéases en faveur d'une activité protéasique accrue, constituant ainsi une des hypothèses étiologiques les plus probables de la BPCO (Owen 2005). Certaines des protéases sécrétées sont responsables d'une forte dégradation des protéines de la matrice extracellulaire qui participe de l'architecture du tissu conjonctif du parenchyme pulmonaire. Les protéases à activité élastinolytique (élastase du neutrophile, MMP-2 et -9) vont dégrader l'élastine, protéine responsable de l'élasticité du poumon. Cette élastolyse du poumon génère des peptides solubles d'élastine (PE) qui sont retrouvés à des taux élevés dans les différents fluides biologiques de patients atteints d'emphysème (Schriver *et al.* 1992 ; Betsuyayaku *et al.* 1996 ; Dupont *et al.* 2013). Les peptides d'élastine sont doués d'activités biologiques qu'ils exercent via leur interaction avec un complexe récepteur spécifique de 67 kDa comprenant un site de liaison de haute affinité appelé S-gal (Hinek 1988 ; Hinek 1994). Le principal ligand du récepteur S-gal est l'hexapeptide VGVAPG (Sandberg *et al.* 1981 ; Grosso & Scott 1993).

L'équipe d'accueil EA 4683 étudie depuis une dizaine d'année le rôle des PE dans la régulation des cellules inflammatoires et immunitaires au cours de la BPCO. Les premiers travaux réalisés ont permis de montrer que les propriétés migratoires des polynucléaires neutrophiles et leur capacité à phagocyter et à détruire les agents pathogènes ainsi qu'à synthétiser des cytokines pro-inflammatoires en réponse au peptide VGVAPG sont altérées chez les patients BPCO (Dupont *et al.* 2013). Plus récemment, un modèle murin d'emphysème a été mis au point dans le laboratoire. Ce modèle a été obtenu par instillation intra-trachéale d'une dose unique du peptide d'élastine VGVPAG à des souris sauvages. Vingt et un jours après l'instillation, les souris développent une inflammation chronique et une dégradation du parenchyme pulmonaire similaires à celles obtenues après instillation d'élastase pancréatique porcine (PPE) décrite dans la littérature comme l'un des modèles de développement de l'emphysème chez la souris (Sellami *et al.* 2016). Par ailleurs, l'utilisation d'un peptide antagoniste du récepteur à l'élastine s'opposant aux effets délétères du peptide VGVAPG *in vitro*, a permis d'affirmer sans ambiguïté la relation existant entre les PE et le processus emphysémateux chez la souris (Sellami *et al.* 2016). Les travaux du laboratoire

ayant permis d'identifier la présence du récepteur de l'élastine à la surface des lymphocytes T et de montrer la capacité du peptide VGVAPG à polariser la réponse T helper vers un profil cytokinique de type Th1 (Debret *et al.* 2005), ont conduit à émettre l'hypothèse que les PE étaient capables d'influencer la polarisation des lymphocytes T au cours de l'emphysème. A partir du modèle murin d'emphysème obtenu par instillation intra-trachéale de PE, la signature cytokinique des populations lymphocytaires T CD4⁺ et T CD8⁺ isolées des poumons, des ganglions médiastinaux et de la rate de souris ayant développé un emphysème a été étudiée. Les résultats obtenus montrent la capacité des PE, générés au cours de la BPCO, à orienter la réponse T helper vers un profil cytokinique Th1 et Th17 et la réponse T cytotoxique vers un profil Tc1. Cette polarisation vers un profil pro-inflammatoire, qui est dépendante de l'interaction des PE avec leur récepteur spécifique exprimé à la surface des lymphocytes T, est contrôlée par des peptides antagonistes du récepteur à l'élastine (Meghraoui-Keddar *et al.* 2017). L'ensemble de ces résultats a permis de démontrer le rôle clé des PE dans la physiopathologie de la BPCO et la nécessité de prendre définitivement en compte le rôle de ces peptides dans l'initiation, l'entretien et l'évolution de la maladie emphysémateuse.

De la même façon que la dégradation des fibres élastiques est clairement identifiée dans les pathologies inflammatoires touchant les tissus riches en élastine (poumon, peau, artères), la dégradation de l'élastine est également décrite comme un processus physiologique survenant lors du vieillissement naturel. Compte tenu du fait que la BPCO se déclare plus fréquemment chez des sujets âgés de plus de cinquante ans et que la prévalence de la maladie augmente avec l'âge (Faner *et al.* 2012), cette pathologie s'apparente à une maladie du vieillissement. Ainsi, des taux élevés de desmosine (marqueur de dégradation de l'élastine) sont retrouvés dans les principaux liquides biologiques de sujets âgés (Lindbergh *et al.* 2012) et de patients développant une BPCO (Schriver *et al.* 1992 ; Betsuyaku *et al.* 1996). Par ailleurs, le vieillissement physiologique s'accompagne de modifications au niveau du système immunitaire (immunosénescence), ce qui engendre un déséquilibre des processus de veille immunologique conduisant progressivement à une inflammation chronique liée à l'âge (ou inflammaging), au cours de laquelle l'activité protéasique est augmentée. Des similitudes ont été constatées dans les mécanismes de dysfonctionnement des lymphocytes T survenant au cours du vieillissement physiologique et au cours de la BPCO (Fagnoni *et al.* 1996 ; Lambers *et al.* 2009). C'est sur la base de ces données et des travaux du laboratoire que nous avons émis l'hypothèse que le vieillissement pouvait être un facteur de risque majeur de la BPCO et

que, compte tenu de la relation existant entre le vieillissement et la dégradation accrue de l'élastine, les effets du vieillissement sur le développement de l'emphysème et sur la modulation de la réponse Th et Tc associée pouvaient impliquer les peptides d'élastine.

Afin de répondre à cette hypothèse de travail, nous avons instillé par voie intra-trachéale le peptide d'élastine VGVAPG à des souris jeunes de 6 semaines et à des souris âgées de 15 mois et nous avons comparé d'une part les paramètres associés à la mise en place du processus emphysémateux, d'autre part la signature cytokinique des lymphocytes Th et Tc au cours de ce processus, et enfin des paramètres immunitaires associés au vieillissement physiologique. Les résultats obtenus au cours de cette étude montrent, sur un plan inflammatoire et tissulaire, que les paramètres associés au développement de l'emphysème sont d'apparition plus précoce et plus intense chez les souris âgées de 15 mois quand on les compare avec ceux des souris de 6 semaines dans les mêmes conditions expérimentales. Ainsi, l'infiltrat de cellules inflammatoires est quantitativement plus important dans les LBA et le parenchyme pulmonaire des souris âgées et ceci s'accompagne d'un remodelage plus précoce des voies aériennes (dès 14 jours après l'instillation) et d'une sécrétion plus importante de protéases élastinolytiques et de desmosine dans les LBA. Ces résultats sont en accord avec d'autres travaux réalisés sur des modèles murins d'emphysème induits par la fumée de cigarette (Moriyama *et al.* 2010 ; John-Schuster *et al.* 2016). D'un point de vue immunologique, nos résultats montrent que l'instillation de PE augmente la proportion de lymphocytes T n'exprimant plus le marqueur de surface CD28 et ceci de façon plus importante chez les souris âgées que chez les souris jeunes. Ces résultats suggèrent fortement que les PE sont capables d'induire une sénescence plus précoce des cellules T au cours de l'emphysème et que ce phénomène vient très probablement s'ajouter à celui plus physiologique lié au vieillissement. Ces données sont en accord avec celles de la littérature associant processus emphysémateux, élastolyse et dérégulation du niveau d'expression de la molécule CD28 à la surface des lymphocytes T (Lambers *et al.* 2009 ; Hodge *et al.* 2011). Or la sénescence des cellules T, caractérisée par une augmentation de la proportion de cellules n'exprimant plus le corécepteur CD28, est reconnue comme étant très largement induite par une stimulation antigénique répétée, conduisant à l'émergence de populations lymphocytaires T mémoires clonales au détriment de populations lymphocytaires T naïves (Valenzuela *et al.* 2002 ; Vallejo *et al.* 2005). Compte tenu du rôle central joué par les PE dans notre modèle murin d'emphysème, nous avons alors recherché si l'apparition du processus emphysémateux sous l'effet des PE s'accompagnait de l'émergence de clones mémoires spécifiques de ces

peptides. Les résultats obtenus montrent que le développement de l'emphysème est associé à une activité lymphocytaire T mémoire vis-à-vis des PE et que cette activité est plus importante chez les souris âgées quand on la compare à celle des souris jeunes.

De l'ensemble du travail présenté dans ce manuscrit de thèse, il ressort que les PE générés au cours de la BPCO sont des acteurs essentiels du développement de la pathologie pulmonaire et des éléments biologiques importants mis en jeu au cours du vieillissement pour majorer le développement de cette pathologie. Ces peptides sont générés par les activités élastinolytiques des cellules inflammatoires qui infiltrent le tissu pulmonaire sous l'effet soit d'inducteurs chimio-attractants tels que ceux présents dans la fumée de cigarette, soit de mécanismes liés au processus d'inflammaging qui accompagnent le vieillissement cellulaire. Les PE sont eux-mêmes de puissants chimio-attracteurs et de puissants inducteurs de la synthèse de protéases, ce qui leur permet de participer, au cours de la BPCO, à une boucle d'auto-amplification du processus inflammatoire. La présence du récepteur à l'élastine à la surface des lymphocytes T et la capacité de ces peptides à être présentés aux lymphocytes T dans une restriction liée au TCR/CMH leur confère un double rôle d'une part dans l'orientation de la réponse immunitaire innée et adaptative au cours de la BPCO, et, d'autre part, dans la sélection de clones auto-réactifs spécifiques générés en grande quantité au cours du vieillissement physiologique associé à la pathologie. Ainsi, les PE via leur interaction avec leur récepteur spécifique, orientent la réponse T helper et la réponse T cytotoxique vers un profil pro-inflammatoire délétère dans l'évolution de la maladie. La capacité des PE à sélectionner et à réactiver des clones lymphocytaires T spécifiques produisant de l'IFN- γ et majoritairement présents lors du processus d'immunosénescence participe également à majorer le déséquilibre de la balance protéases/anti-protéases et à favoriser le développement de l'emphysème. Il est plus que probable que les PE puissent exercer ces deux effets complémentaires simultanément, ce qui renforce encore leur rôle dans l'initiation, l'entretien et la propagation de la BPCO et dans le vieillissement physiologique accompagnant la pathologie.

L'extension logique de ce travail de thèse sera :

i) de vérifier si la polarisation de la réponse lymphocytaire obtenue dans notre modèle murin d'emphysème est retrouvée au cours de la BPCO chez l'homme. Une étude dans le cadre d'un projet hospitalo-universitaire est en cours de réalisation sur ce thème.

ii) d'étudier les effets régulateurs des peptides d'élastine vis-à-vis des cellules lymphoïdes innées (ILC) de type 1, de type 2 et de type 17 dans notre modèle d'emphysème induit par les PE.

iii) de mieux comprendre la relation existant entre les populations lymphocytaires T CD28⁻, dont la proportion augmente fortement au cours de l'emphysème murin induit par instillation de PE à des souris âgées, et les caractéristiques phénotypiques des clones mémoires T sélectionnés par les PE chez les souris âgées emphysémateuses.

BIBLIOGRAPHIE

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS (1991). Cellular and molecular immunology. Philadelphia, Saunders.
- Abbas AK, Murphy KM, Sher A (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. 1996 Oct 31;383(6603):787-93.
- Abroug F, Ouanes-Besbes L, Nciri N, Sellami N, Addad F, Hamda KB, Amor AB, Najjar MF, Knani J (2006). Association of left-heart dysfunction with severe exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease: diagnostic performance of cardiac markers. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:990–996.
- Acuto O, Michel F (2003). CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nat Rev Immunol*. 2003 Dec;3(12):939-51.
- Agod Z, Fekete T, Budai MM, Varga A, Szabo A, Moon H, Boldogh I, Biro T, Lanyi A, Bacsi A, Pazmandi K (2017). Regulation of type I interferon responses by mitochondria-derived reactive oxygen species in plasmacytoid dendritic cells. *Redox Biol*. 2017 Oct;13:633-645.
- Aizen E, Gilhar A (2001). Smoking effect on skin wrinkling in the aged population. *Int J Dermatol*. 40:431–433.
- Amitani R, Wilson R, Rutman A, Read R, Ward C, Burnett D, Stockley RA, Cole PJ (1991). Effects of human neutrophil elastase and *Pseudomonas aeruginosa* proteinases on human respiratory epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991;4:26–32.
- Antonicelli F, Bellon G, Debelle L, Hornebeck W (2007). Elastin-elastases and inflamm-aging. *Curr Top Dev Biol*. 2007;79:99-155. Review.
- Antunes MA, Rocco PR. Elastase-induced pulmonary emphysema: insights from experimental models. *An Acad Bras Cienc*. 2011 Dec;83(4):1385-96.
- Aoshiha K, Nagai A (2009). Senescence hypothesis for the patho-genetic mechanism of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2009; 6:596–601.
- Atkinson RW, Anderson HR, Sunyer J, Ayres J, Baccini M, Vonk JM, Boumghar A, Forastiere F, Forsberg B, Touloumi G, Schwartz J, Katsouyanni K (2001). Acute effects of particulate air pollution on respiratory admissions: Results from APHEA 2 project. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:1860-6
- Auerbach O, Forman JB, Gere JB, Kassouny DY, Muehsam GE, Petrick TG, Smolin HJ, Stout AP (1957). Changes in the bronchial epithelium in relation to smoking and cancer of the lung; a report of progress. *N Engl J Med*. 1957 Jan 17; 256(3):97-104.
- Azuma M, Phillips JH, Lanier LL (1992). CD28 co-stimulation of T-cell-mediated cytotoxicity. *Int J Cancer Suppl*. 1992;7:33-5.
- Azuma M, Phillips JH, Lanier LL (1993). CD28- T lymphocytes. Antigenic and functional properties. *J Immunol*. 1993 Feb 15;150(4):1147-59.
- Bach PB, Brown C, Gelfand SE, McCrory DC (2001). Management of acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: a summary and appraisal of published evidence. *Ann Intern Med* 2001;134:600–620.
- Bachmann MF, Barner M, Viola A, Kopf M (1999). Distinct kinetics of cytokine production and cytolysis in effector and memory T cells after viral infection. *European Journal of Immunology*. 1999; 29(1):291–9.
- Bachmann MF, Rohrer UH, Kundig TM, Burki K, Hengartner H, Zinkernagel RM (1993). The influence of antigen organization on B cell responsiveness. *Science* 1993; 262:1448–51.
- Banchereau J, Steinman RM (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998 Mar 19;392(6673):245-52.
- Baranek T, Dalod M (2008). How opportunistic agents benefit from viral infections: the plasmacytoid dendritic cell connection. *Cell Host Microbe*. 2008 Oct 16;4(4):305-7.
- Baranek T, Debret R, Antonicelli F, Lamkhioued B, Belaouaj A, Hornebeck W, Bernard P, Guenounou M, Le Naour R (2007). Elastin receptor (spliced galactosidase) occupancy by elastin peptides counteracts

- proinflammatory cytokine expression in lipopolysaccharide-stimulated human monocytes through NF-kappaB down-regulation. *J Immunol.* 2007 Nov 1;179(9):6184-92.
- Barnes PJ (2004). Alveolar macrophages as orchestrators of COPD. *COPD.* 2004 Apr; 1(1):59-70.
- Barnes PJ (2009). The cytokine network in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009;41:631–638.
- Barnes PJ (2016). Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2016 Jul;138(1):16-27.
- Becker DM, Pattern P, Chien Y, Yokota T, Eshhar Z, Giedlin M, Gascoigne NR, Goodnow C, Wolf R, Arai K (1985). Variability and repertoire size of T-cell receptor V alpha gene segments. *Nature.* 1985 Oct 3-9;317(6036):430-4.
- Bedell-Hogan D, Trackman P, Abrams W, Rosenbloom J, Kagan H (1993). Oxidation, cross-linking, and insolubilization of recombinant tropoelastin by purified lysyl oxidase. *J Biol Chem.* 1993 May 15;268(14):10345-50.
- Belchamber KBR, Donnelly LE (2017). Macrophage Dysfunction in Respiratory Disease. *Results Probl Cell Differ.* 2017;62:299-313.
- Bellon G, Martiny L, Robinet A (2004). Matrix metalloproteinases and matrikines in angiogenesis. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2004 Mar;49(3):203-20.
- Berenson CS, Kruzel RL, Eberhardt E, Sethi S (2013). Phagocytic dysfunction of human alveolar macrophages and severity of chronic obstructive pulmonary disease. *J Infect Dis.* 2013 Dec 15;208(12):2036-45.
- Bernhard D, Moser C, Backovic A, Wick G (2007). Cigarette smoke: an aging accelerator? *Exp. Gerontol.* 42:160–165.
- Betsuyaku T, Nishimura M, Yoshioka A, Takeyabu K, Miyamoto K, Kawakami Y (1996). Elastin-derived peptides and neutrophil elastase in bronchoalveolar lavage fluid. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996 Sep;154(3 Pt 1):720-4.
- Bevan MJ (1995). Antigen presentation to cytotoxic T lymphocytes in vivo. *J. Exp. Med.* 182:639.
- Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science.* 1998;279:349–352.
- Borges VM, Vandivier RW, McPhillips KA, Kench JA, Morimoto K, Groshong SD, Richens TR, Graham BB, Muldrow AM, Van Heule L, Henson PM, Janssen WJ (2009). TNF α inhibits apoptotic cell clearance in the lung, exacerbating acute inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009;297:L586–L595.
- Borthwick NJ, Lowdell M, Salmon M, Akbar AN (2000). Loss of CD28 expression on CD8(+) T cells is induced by IL-2 receptor gamma chain signalling cytokines and type I IFN, and increases susceptibility to activation-induced apoptosis. *Int Immunol.* 2000 Jul;12(7):1005-13.
- Bosse R, Vestweber D (1994). Only simultaneous blocking of the L- and P-selectin completely inhibits neutrophil migration into mouse peritoneum. *Eur J Immunol.* 1994 Dec;24(12):3019-24.
- Brandsma CA, Timens W, Geerlings M, Jekel H, Postma DS, Hylkema MN, Kerstjens HA. Induction of autoantibodies against lung matrix proteins and smoke-induced inflammation in mice. *BMC Pulm Med.* 2010 Dec 13;10:64.
- Brassart B, Fuchs P, Huet E, Alix AJ, Wallach J, Tamburro AM, Delacoux F, Haye B, Emonard H, Hornebeck W, Debelle L (2001). Conformational dependence of collagenase (matrix metalloproteinase-1) up-regulation by elastin peptides in cultured fibroblasts. *J Biol Chem.* 2001 Feb 16;276(7):5222-7.
- Brassart B, Randoux A, Hornebeck W, Emonard H (1998). Regulation of matrix metalloproteinase-2 (gelatinase A, MMP-2), membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) and tissue inhibitor of

- metalloproteinases-2 (TIMP-2) expression by elastin-derived peptides in human HT-1080 fibrosarcoma cell line. *Clin Exp Metastasis*. 1998 Aug;16(6):489-500.
- Brown-Augsburger P, Broekelmann T, Rosenbloom J, Mecham RP (1996). Functional domains on elastin and microfibril-associated glycoprotein involved in elastic fibre assembly. *Biochem J*. 1996 Aug 15;318 (Pt 1):149-55. Erratum in: *Biochem J* 1997 May 1;323(Pt 3):863.
- Bryl E, Vallejo AN, Weyand CM, Goronzy JJ (2001). Down-regulation of CD28 expression by TNF- α The *Journal of Immunology*. 2001;167(6):3231–3238.
- Buist AS, McBurnie MA, Vollmer WM, Gillespie S, Burney P, Mannino DM, Menezes AMB, Sullivan SD, Lee TA, Weiss KB, Jensen RL, Marks GB, Gulsvik A, Nizankowska-Mogilnicka E ; BOLD Collaborative Research Group (2007). International variation in the prevalence
- Burnett D, Chamba A, Hill SL, Stockley RA (1987). Neutrophils from subjects with chronic obstructive lung disease show enhanced chemotaxis and extracellular proteolysis. *Lancet*, 2 (8567) (1987), pp. 1043-1046
- Burney PG, Patel J, Newson R, Minelli C, Naghavi M (2015). Global and regional trends in COPD mortality, 1990-2010. *Eur Respir J*. 2015 May;45(5):1239-47.
- Burstein HJ, Abbas AK (1991). T-cell-mediated activation of B cells. *Curr Opin Immunol*. 1991 Jun;3(3):345-9. Review.
- Burton DG, Krizhanovsky V (2014). Physiological and pathological consequences of cellular senescence. *Cell Mol Life Sci*. 2014 Nov;71(22):4373-86.
- Callahan JE, Kappler JW, Marrack P (1993). Unexpected expansions of CD8-bearing cells in old mice. *J Immunol*. 1993;151:6657–6669.
- Carter LL, Murphy KM (1999). Lineage-specific requirement for signal transducer and activator of transcription (Stat)4 in interferon gamma production from CD4(+) versus CD8(+) T cells. *J Exp Med*. 1999 Apr 19;189(8):1355-60.
- Castelo-Branco C, Soveral I (2014). The immune system and aging: a review. *Gynecol Endocrinol*. 2014 Jan;30(1):16-22.
- Chen C, Shen Y, Ni CJ, Zhu YH, Huang JA (2012). Imbalance of circulating T-lymphocyte subpopulation in COPD and its relationship with CAT performance. *J Clin Lab Anal*. 2012 Feb;26(2):109-14.
- Cheng SC, Joosten LA, Kullberg BJ, Netea MG (2012). Interplay between *Candida albicans* and the mammalian innate host defense. *Infect Immun*. 2012 Apr;80(4):1304-13. Review.
- Chiu WK, Fann M, Weng NP (2006). Generation and growth of CD28nullCD8+ memory T cells mediated by IL-15 and its induced cytokines. *J Immunol*. 2006 Dec 1;177(11):7802-10.
- Chrysofakis G, Tzanakis N, Kyriakoy D, Tsoumakidou M, Tsiligianni I, Klimathianaki M, Siafakas NM (2004). Perforin expression and cytotoxic activity of sputum CD8+ lymphocytes in patients with COPD. *Chest*. 2004 Jan;125(1):71-6.
- Chung KF. Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease (2001). *Eur Respir J Suppl*. 2001 Dec;34:50s-59s. Review.
- Coelho Horta B, Steinberg Perilo C, Caldeira Costa D, Nogueira-Machado JA, Martins Chaves M (2005). Aging: functional metabolic balance among cAMP, cGMP and reactive oxygen intermediate generation by human granulocytes. *Gerontology*. 2005 Nov-Dec;51(6):363-8.
- Collin M, McGovern N, Haniffa M (2013). Human dendritic cell subsets. *Immunology* 140(1):22–30.
- Cosio MG, Saetta M, Agusti A (2009). Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2009;360:2445–2454.

- Cougoule C, Le Cabec V, Poincloux R, Al Saati T, Mège JL, Tabouret G, Lowell CA, Laviolette-Malirat N, Maridonneau-Parini I (2010). Three-dimensional migration of macrophages requires Hck for podosome organization and extracellular matrix proteolysis. *Blood*. 2010 Feb 18;115(7):1444-52.
- Counter CM, Avilion AA, LeFeuvre CE, Stewart NG, Greider CW, Harley CB, Bacchetti S (1992). Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J*. 1992 May;11(5):1921-9.
- Crimmins EM, Hayward MD, Saito Y (1994). Changing mortality and morbidity rates and the health status and life expectancy of the older population. *Demography* 31, 159–175.
- Crockett-Torabi E, Fantone JC (1995). The selectins: insights into selectin-induced intracellular signaling in leukocytes. *Immunol Res*. 1995;14(4):237-51.
- Croft M, Carter L, Swain SL, Dutton RW (1994). Generation of polarized antigen-specific CD8 effector populations: reciprocal action of interleukin (IL)-4 and IL-12 in promoting type 2 versus type 1 cytokine profiles. *J Exp Med*. 1994 Nov 1;180(5):1715-28.
- Cruz CM, Rinna A, Forman HJ, Ventura ALM, Persechini PM, Ojcius DM (2007). ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages. *J. Biol. Chem*. 2007;282:2871–2879.
- Cui W, Kaech SM (2010). Generation of effector CD8+ T cells and their conversion to memory T cells. *Immunol Rev*. 2010;236:151–166.
- Dagarag M, Ng H, Lubong R, Effros RB, Yang OO (2003). Differential impairment of lytic and cytokine functions in senescent human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Virol*. 2003 Mar; 77(5):3077–83.
- Debelle L, Alix AJ (1999). The structures of elastins and their function. *Biochimie*. 1999 Oct;81(10):981-94.
- Debret R, Antonicelli F, Theill A, Hornebeck W, Bernard P, Guenounou M, Le Naour R (2005). Elastin-derived peptides induce a T-helper type 1 polarization of human blood lymphocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 Jul;25(7):1353-8.
- Debret R, Le Naour RR, Sallenave JM, Deshorgue A, Hornebeck WG, Guenounou M, Bernard P, Antonicelli FD (2006). Elastin fragments induce IL-1beta upregulation via NF-kappaB pathway in melanoma cells. *J Invest Dermatol*. 2006 Aug;126(8):1860-8.
- Derhovanessian E, Solana R, Larbi A, Paweler G (2008). Immunity, ageing and cancer. *Immun Ageing*. 2008;5:11.
- Di Stefano A, Capelli A, Lusuardi M, Balbo P, Vecchio C, Maestrelli P, Mapp CE, Fabbri LM, Donner CF, Saetta M (1998). Severity of airflow limitation is associated with severity of airway inflammation in smokers. *Am J Respir Crit Care Med*, 158:1277–85.
- Dintzis RZ, Middleton MH, Dintzis HM (1983). Studies on the immunogenicity and tolerogenicity of T-independent antigens. *J Immunol* 1983; 131:2196–203.
- Drannik AG, Pouladi MA, Robbins CS, Goncharova SI, Kianpour S, Stämpfli MR (2004). Impact of cigarette smoke on clearance and inflammation after *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:1164–1171.
- Drost EM, Skwarski KM, Saulea J, Soler N, Roca J, Agusti A, MacNee W (2005). Oxidative stress and airway inflammation in severe exacerbations of COPD. *Thorax*. 2005 Apr;60(4):293-300.
- Dubey C, Croft M, Swain SL (1995). Costimulatory requirements of naive CD4+ T cells. ICAM-1 or B7-1 can costimulate naive CD4 T cell activation but both are required for optimum response. *J Immunol*. 1995 Jul 1;155(1):45-57.

- Duca L, Debelle L, Debret R, Antonicelli F, Hornebeck W, Haye B (2002). The elastin peptides-mediated induction of pro-collagenase-1 production by human fibroblasts involves activation of MEK/ERK pathway via PKA- and PI(3)K-dependent signaling. *FEBS Lett.* 2002 Jul 31;524(1-3):193-8.
- Duca L, Floquet N, Alix AJ, Haye B, Debelle L (2004). Elastin as a matrikine. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2004 Mar;49(3):235-44.
- Dupont A, Dury S, Gafa V, Lebagry F, Deslée G, Guenounou M, Antonicelli F, Le Naour R (2013). Impairment of neutrophil reactivity to elastin peptides in COPD. *Thorax.* 2013 May;68(5):421-8.
- Effros RB, Boucher N, Porter V, Zhu X, Spaulding C, Walford RL, Kronenberg M, Cohen D, Schächter F (1994). Decline in CD28+ T cells in centenarians and in long-term T cell cultures: a possible cause for both in vivo and in vitro immunosenescence. *Exp Gerontol.* 1994 Nov-Dec;29(6):601-9.
- Effros RB, Dagarag M, Spaulding C and Man J (2005). The role of CD8+ T-cell replicative senescence in human aging. *Immunol Rev,* 205: 147-157
- Eisner MD, Anthonisen N, Coultas D, Kuenzli N, Perez-Padilla R, Postma D, Romieu I, Silverman EK, Balmes JR (2010); Committee on Nonsmoking COPD, Environmental and Occupational Health Assembly. An official American Thoracic Society public policy statement: Novel risk factors and the global burden of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010 Sep 1;182(5):693-718.
- Enelow RI, Mohammed AZ, Stoler MH, Liu AN, Young JS, Lou YH, Braciale TJ (1998). Structural and functional consequences of alveolar cell recognition by CD8+ T lymphocytes in experimental lung disease. *J Clin Invest.* 1998 Nov 1;102(9):1653-61.
- Eppert BL, Wortham BW, Flury JL, and Borchers MT (2013). Functional Characterization of T cell population in a mouse model of chronic obstructive disease. *J Immunol,* 2013, 190: 1331-1340.
- Fadok VA, Bratton DL, Guthrie L, Henson PM (2001). Differential effects of apoptotic versus lysed cells on macrophage production of cytokines: role of proteases. *J Immunol.* 2001 Jun 1; 166(11):6847-54.
- Fagiolo U, Cossarizza A, Scala E, Fanales-Belasio E, Ortolani C, Cozzi E, Monti D, Franceschi C, Paganelli R (1993). Increased cytokine production in mononuclear cells of healthy elderly people. *Eur J Immunol.* 1993; 23:2375-2378.
- Fagnoni FF, Vescovini R, Mazzola M, Bologna G, Nigro E, Lavagetto G, Franceschi C, Passeri M, Sansoni P (1996). Expansion of cytotoxic CD8+ CD28- T cells in healthy ageing people, including centenarians. *Immunology,* 88: 501-507
- Faner R, Rojas M, MacNee W, Agusti I (2012). Abnormal lung aging in chronic obstructive pulmonary disease and idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012 Aug 15;186(4):306-13.
- Fidler IJ (1975). Activation in vitro of mouse macrophages by syngeneic, allogeneic, or xenogeneic lymphocyte supernatants. *J Natl Cancer Inst.* 1975 Nov;55(5):1159-63.
- Fietta A, Bersani C, De Rose V, Grassi FA, Mangiarotti P, Uccelli M, Grassi C (1988). Evaluation of systemic host defense mechanisms in chronic bronchitis. *Respiration* 1988;53:37-43.
- Finkelstein R, Fraser RS, Ghezzi H, Cosio MG (1995). Alveolar inflammation and its relation to emphysema in smokers. *Am J Respir Crit Care Med,* 152:1666-72.
- Fletcher C, Peto R (1977). The natural history of chronic airflow obstruction. *Br Med J* 1977; 1: 1645-1648.
- Fooksman DR, Vardhana S, Vasiliver-Shamis G, Liese J, Blair DA, Waite J, Sacristán C, Victora GD, Zanin-Zhorov A, Dustin ML (2010). Functional anatomy of T cell activation and synapse formation. *Annu Rev Immunol.* 2010;28:79-105.
- Franceschi C, Bonafe M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, De Benedictis G (2000). Inflammaging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci.* 2000 Jun;908:244-54.

- Franceschi C, Capri M, Monti D, Giunta S, Olivieri F, Sevini F, Panourgia MP, Invidia L, Celani L, Scurti M, Cevenini E, Castellani GC, Salvioli S (2007). Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mech Ageing Dev.* 2007 Jan;128(1):92-105.
- Frasca L, Piazza C, Piccolella E (1998). CD4+ T cells orchestrate both amplification and deletion of CD8+ T cells. *Crit Rev Immunol.* 1998;18(6):569-94.
- Freund A, Orjalo AV, Desprez PY, Campisi J (2010). Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends Mol Med.* 2010 May; 16(5):238–46.
- Fry TJ, Mackall CL (2005). The many faces of IL-7: from lymphopoiesis to peripheral T cell maintenance. *J Immunol.* 2005;174:6571–6576.
- Fülöp T Jr, Wei SM, Robert L, Jacob MP (1990). Determination of elastin peptides in normal and arteriosclerotic human sera by ELISA. *Clin Physiol Biochem.* 1990;8(6):273-82.
- Fulop T, Dupuis G, Baehl S, Le Page A, Bourgade K, Frost E, Witkowski JM, Pawelec G, Larbi A, Cunnane S (2015). From inflamm-aging to immune-paralysis: a slippery slope during aging for immune-adaptation. *Biogerontology.* 2015 Oct 15.
- Fulop T, le Page A, Fortin C, Witkowski JM, Dupuis G, Larbi A (2014). Cellular signaling in the aging immune system. *Curr Opin Immunol.* 2014 Aug;29:105-11.
- Fusco D, Forastière F, Michelozzi P, Spadea T, Ostro B, Arcà M, Perucci CA (2001). Air pollution and hospital admissions for respiratory conditions in Rome, Italy. *Eur Respir J* 2001;17:1143-50
- Gadgil A, Zhu X, Sciruba FC, Duncan SR (2006). Altered T-cell phenotypes in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc.* 2006;3:487–488.
- Gaipl US, Sheriff A, Franz S, Munoz LE, Voll RE, Kalden JR, Herrmann M (2006). Inefficient clearance of dying cells and autoreactivity. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2006; 305():161-76.
- Garrod KR, Moreau HD, Garcia Z, Lemaître F, Bouvier I, Albert ML, Bousso P (2012). Dissecting T cell contraction in vivo using a genetically encoded reporter of apoptosis. *Cell Rep.* 2012 Nov 29;2(5):1438-47.
- Gavazzi G, Krause KH (2002). Ageing and infection. *Lancet Infect Dis.* 2002 Nov;2(11):659-66. Review.
- Gillooly M, Lamb D (1993). Airspace size in lungs of lifelong non-smokers: effect of age and sex. *Thorax* 48, 39–43.
- Glimcher LH, Townsend MJ, Sullivan BM, Lord GM (2004). Recent developments in the transcriptional regulation of cytolytic effector cells. *Nat Rev Immunol.* 2004 Nov;4(11):900-11.
- Gloire G, Legrand-Poels S, Piette J (2006). NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem Pharmacol.* 2006 Nov 30;72(11):1493-505.
- Goodwin K, Viboud C, Simonsen L (2006). Antibody response to influenza vaccination in the elderly: a quantitative review. *Vaccine.* 2006 Feb 20; 24(8):1159–69.
- Gottlieb DJ, Stone PJ, Sparrow D, Gale ME, Weiss ST, Snider GL, O'Connor GT (1996). Urinary desmosine excretion in smokers with and without rapid decline of lung function: the Normative Aging Study. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996 Nov;154(5):1290-5.
- Grillari J, Grillari-Voglauer R (2010). Novel modulators of senescence, aging, and longevity: Small non-coding RNAs enter the stage. *Exp Gerontol.* 2010 Apr;45(4):302-11. Review
- Grosso LE, Scott M (1993). PGAIPG, a repeated hexapeptide of bovine and human tropoelastin, is chemotactic for neutrophils and Lewis lung carcinoma cells. *Arch Biochem Biophys.* 1993 Sep;305(2):401-4
- Grumelli S, Corry DB, Song LZ, Song L, Green L, Huh J, Hacken J, Espada R, Bag R, Lewis DE, Kheradmand F (2004). An immune basis for lung parenchymal destruction in chronic obstructive pulmonary disease and emphysema. *PLoS Med.* 1: e8.

- Halbert RJ, Natoli JL, Gano A, Badamgarav E, Buist AS, Mannino DM (2006). Global burden of COPD: systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J*. 2006 Sep;28(3):523-32. Review.
- Hamada H, Garcia-Hernandez Mde L, Reome JB, Misra SK, Strutt TM, McKinstry KK, Cooper AM, Swain SL, Dutton RW (2009). Tc17, a unique subset of CD8 T cells that can protect against lethal influenza challenge. *J Immunol*. 2009 Mar 15;182(6):3469-81.
- Hance KA, Tataria M, Ziporin SJ, Lee JK, Thompson RW (2002). Monocyte chemotactic activity in human abdominal aortic aneurysms: role of elastin degradation peptides and the 67-kD cell surface elastin receptor. *J Vasc Surg*. 2002 Feb;35(2):254-61.
- Harding FA, Allison JP (1993). CD28-B7 interactions allow the induction of CD8+ cytotoxic T lymphocytes in the absence of exogenous help. *J Exp Med*. 1993 Jun 1;177(6):1791-6.
- Harty JT, Badovinac VP (2008). Shaping and reshaping CD8+ T-cell memory. *Nat Rev Immunol*. 2008 Feb;8(2):107-19.
- Haugland HK, Vukovic V, Pintilie M, Fyles AW, Milosevic M, Hill RP, Hedley DW (2002). Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha in cervical carcinomas: correlation with tumor oxygenation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002;53:854-861.
- Hayflick L (1980). Recent advances in the cell biology of aging. *Mech Ageing Dev*. 1980 Sep-Oct;14(1-2):59-79.
- Hayflick L, Moorhead P (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*. 1961; 25(3):585-621.
- Hazgui S, Bonnet N, Cutrona J, Nawrocki-Raby B, Polette M, Chouchane L, Birembaut P, Zahm JM (2005). 3D culture model and computer-assisted videomicroscopy to analyze migratory behavior of noninvasive and invasive bronchial epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005 Dec;289(6):C1547-52.
- He C, Klionsky DJ (2009). Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet*. 2009; 43():67-93.
- Heijink IH, Brandenburg SM, Postma DS, van Oosterhout AJ (2012). Cigarette smoke impairs airway epithelial barrier function and cell-cell contact recovery. *Eur Respir J*. 2012 Feb; 39(2):419-28.
- Henkart P (1994). Lymphocyte-mediated cytotoxicity: two pathways and multiple effector molecules. *Immunity*, 1:343-6.
- Heron M, Claessen AM, Grutters JC, van den Bosch JM (2010). T-cell activation profiles in different granulomatous interstitial lung diseases--a role for CD8+CD28(null) cells? *Clin Exp Immunol*. 2010 May;160(2):256-65.
- Hinek A, Wrenn DS, Mecham RP, Barondes SH (1988). The elastin receptor: a galactoside-binding protein. *Science* 1988;239:1539-41.
- Hinek A (1994). Nature and the multiple functions of the 67-kD elastin-/laminin binding protein. *Cell Adhes Commun* 2: 185-193, 1994.
- Hirschmann JV (2000). Do bacteria cause exacerbations of COPD? *Chest* 2000;118:193-203
- Hodge G, Mukaro V, Reynolds PN, Hodge S (2011). Role of increased CD8/CD28(null) T cells and alternative co-stimulatory molecules in chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Exp Immunol*. 2011 Oct;166(1):94-102.
- Hoenderdos K, Condliffe A (2013). The neutrophil in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2013 May;48(5):531-9.
- Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, Cherniack RM, Rogers RM, Sciurba FC, Coxson HO, Paré PD (2004). The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*, 350:2645-53.

- Hogquist KA, Gavin MA, Bevan MJ (1993). Positive selection of CD8+ T cells induced by major histocompatibility complex binding peptides in fetal thymic organ culture. *J Exp Med.* 1993 May 1;177(5):1469-73.
- Homann D, Teyton L, Oldstone MB (2001). Differential regulation of antiviral T-cell immunity results in stable CD8+ but declining CD4+ T-cell memory. *Nat Med.* 2001 Aug;7(8):913-9.
- Houghton AM, Quintero PA, Perkins DL, Kobayashi DK, Kelley DG, Marconcini LA, Mecham RP, Senior RM, Shapiro SD (2006). Elastin fragments drive disease progression in a murine model of emphysema. *J Clin Invest.* 2006 Mar;116(3):753-9.
- Huang W, August A (2015). The signaling symphony: T cell receptor tunes cytokine-mediated T cell differentiation. *J Leukoc Biol.* 2015 Mar;97(3):477-85.
- Hubbard RE, O'Mahony MS, Savva GM, Calver BL, Woodhouse KW (2009). Inflammation and frailty measures in older people. *J Cell Mol Med.* 2009 Sep; 13(9B):3103-9.
- Huber M, Heink S, Grothe H, Guralnik A, Reinhard K, Elflein K, Hünig T, Mittrücker HW, Brüstle A, Kamradt T, Lohoff M (2009). A Th17-like developmental process leads to CD8(+) Tc17 cells with reduced cytotoxic activity. *Eur J Immunol.* 2009 Jul;39(7):1716-25.
- Hunninghake GW, Davidson JM, Rennard S, Szapiel S, Gadek JE, Crystal RG (1981). Elastin fragments attract macrophage precursors to diseased sites in pulmonary emphysema. *Science.* 1981 May 22;212(4497):925-7.
- Ilumets H, Ryttilä PH, Sovijärvi AR, Tervahartiala T, Myllärniemi M, Sorsa TA, Kinnula V (2008)L. Transient elevation of neutrophil proteinases in induced sputum during COPD exacerbation. *Scand J Clin Lab Invest* 2008;68:618-623.
- Intlekofer AM, Banerjee A, Takemoto N, Gordon SM, Dejong CS, Shin H, Hunter CA, Wherry EJ, Lindsten T, Reiner SL (2008). Anomalous type 17 response to viral infection by CD8+ T cells lacking T-bet and eomesodermin. *Science.* 2008 Jul 18;321(5887):408-11.
- Ishii T, Abboud RT, Wallace AM, English JC, Coxson HO, Finley RJ, Shumansky K, Paré PD, Sandford AJ (2014). Alveolar macrophage proteinase/antiproteinase expression in lung function and emphysema. *Eur Respir J.* 2014 Jan;43(1):82-91.
- Ito K, Barnes PJ (2009). COPD as a disease of accelerated lung aging. *Chest* 2009; 135: 173-180.
- Jacob MP, Hornebeck W (1985). Isolation and characterization of insoluble and kappa-elastins. *Front Matrix Biol* 1985;10:92-129.
- Janeway CA Jr (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1989;54 Pt 1:1-13.
- Janoff A, Sloan B, Weinbaum G, Damiano V, Sandhaus RA, Elias J, Kimbel P (1977). Experimental emphysema induced with purified human neutrophil elastase: tissue localization of the instilled protease. *Am Rev Respir Dis.* 1977 Mar;115(3):461-78.
- Janssens JP, Pache JC, Nicod LP (1999). Physiological changes in respiratory function associated with ageing. *Eur Respir J* 1999; 13: 197-205.
- Jetten N, Verbruggen S, Gijbels MJ, Post MJ, De Winther MP, Donners MM (2014). Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis in vivo. *Angiogenesis.* 2014 Jan;17(1):109-18.
- John-Schuster G, Günter S, Hager K, Conlon TM, Eickelberg O, Yildirim AÖ (2016). Inflammaging increases susceptibility to cigarette smoke-induced COPD. *Oncotarget.* 2016 May 24;7(21):30068-83.
- Jörres RA, Kronseder A, Uhlmann S, Holz O, Welker L, Hessel H, Branscheid D, Magnussen H, Nowak D (2005). European Respiratory Society Annual Congress 2005, Copenhagen, Denmark, Replicative

- senescence of lung fibroblasts after exposure to hydrogen peroxide or cigarette smoke extract. 17–21 September 2005, Abstract 728.
- Joshi NS, Cui W, Chandele A, Lee HK, Urso DR, Hagman J, Gapin L, Kaech SM (2007). Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8(+) T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor. *Immunity*. 2007 Aug;27(2):281-95.
- Jung S, Unutmaz D, Wong P, Sano G, De los Santos K, Sparwasser T, Wu S, Vuthoori S, Ko K, Zavala F, Pamer EG, Littman DR, Lang RA (2002). In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity*. 2002 Aug;17(2):211-20.
- Just M, Ribera M, Monso E, Lorenzo JC, Ferrandiz C (2007). Effect of smoking on skin elastic fibres: morphometric and immunohistochemical analysis. *Br. J. Dermatol.* 156:85–91.
- Kaech SM, Cui W (2012). Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nat Rev Immunol.* 2012 Nov;12(11):749-61.
- Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R (2002). Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol.* 2002 Apr;2(4):251-62. Review.
- Kalia V, Sarkar S, Ahmed R (2010). CD8 T-cell memory differentiation during acute and chronic viral infections. *Adv Exp Med Biol.* 2010;684:79-95.
- Kamoun A, Landeau JM, Godeau G, Wallach J, Duchesnay A, Pellat B, Hornebeck W (1995). Growth stimulation of human skin fibroblasts by elastin-derived peptides. *Cell Adhes Commun.* 1995 Nov;3(4):273-81.
- Kappler JW, Roehm N, Marrack P (1987). T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell.* 1987 Apr 24;49(2):273-80.
- Katz DH, Benacerraf B (1972). The regulatory influence of activated T cells on B cell responses to antigen. *Adv Immunol.* 1972;15:1-94. Review
- Kennedy SM, Elwood RK, Wiggs BJ, Paré PD, Hogg JC (1984). Increased airway mucosal permeability of smokers. Relationship to airway reactivity. *Am Rev Respir Dis.* 1984 Jan; 129(1):143-8.
- Kheradmand F, Shan M, Xu C, Corry DB (2012). Autoimmunity in chronic obstructive pulmonary disease: clinical and experimental evidence. *Expert Rev Clin Immunol.* 2012 Mar;8(3):285-92. Review.
- Kim HR, Hwang KA, Park SH, Kang I (2008). IL-7 and IL-15: biology and roles in T-Cell immunity in health and disease. *Crit Rev Immunol.* 2008;28:325–339.
- Ko FWS, Hui DSC, Lai CKW (2008). Worldwide burden of COPD in high- and low-income countries. Part III. Asia-Pacific studies. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2008;12:713–717.
- Kojima H, Shinohara N, Hanaoka S, Someya-Shirota Y, Takagaki Y, Ohno H, Saito T, Katayama T, Yagita H, Okumura K, Shinkai Y, Alt FW, Matsuzawa A, Yonehara S, Takayama H (1994). Two distinct pathways of specific killing revealed by perforin mutant cytotoxic T lymphocytes. *Immunity*. 1994 Aug;1(5):357-64.
- Kolls JK, Lindén A (2004). Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity*. 2004 Oct;21(4):467-76.
- Kovacsovics-Bankowski M, Clark K, Benacerraf B, Rock KL (1993). Efficient major histocompatibility complex class I presentation of exogenous antigen upon phagocytosis by macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:4942.
- Krabbe KS, Pedersen M, Bruunsgaard H (2004). Inflammatory mediators in the elderly. *Exp Gerontol.* 2004 May;39(5):687-99.
- Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM (1995). CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*. 1995 Apr 6;374(6522):546-9.

- Kuhns MS, Badgandi HB. Piecing together the family portrait of TCR-CD3 complexes (2012). *Immunol Rev.* 2012 Nov;250(1):120-43.
- Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS (2010). The essence of senescence. *Genes Dev.* 24, 2463–2479.
- Kulski JK, Inoko H (2005). Major Histocompatibility Complex (MHC) Genes. *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES & 2005*, John Wiley & Sons, Ltd.
- Kumar, Abbas, Fausto, Mitchell (2007). *Robbins Basic Pathology*, 8th edition, pp. 109, Copyright Elsevier.
- Kuwabara T, Ishikawa F, Kondo M, Kakiuchi T (2017). The Role of IL-17 and Related Cytokines in Inflammatory Autoimmune Diseases. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:3908061. Review
- Lacy P, Eitzen G (2008). Control of granule exocytosis in neutrophils. *Front Biosci.* 2008 May 1;13:5559-70.
- Lages CS, Lewkowich I, Sproles A, Wills-Karp M, Choungnet C (2010). Partial restoration of T-cell function in aged mice by in vitro blockade of the PD-1/PD-L1 pathway. *Aging Cell.* 2010 Oct;9(5):785-98.
- Lambers C, Hacker S, Posch M, Hoetzenecker K, Pollreisz A, Lichtenauer M, Klepetko W, Ankersmit HJ (2009). T cell senescence and contraction of T cell repertoire diversity in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Exp Immunol.* 2009;155:466–75.
- Lamprecht B, McBurnie MA, Vollmer WM, Gudmundsson G, Welte T, Nizankowska-Mogilnicka E, Studnicka M, Bateman E, Anto JM, Burney P, Mannino DM, Buist SA, BOLD Collaborative Research Group (2011). COPD in never smokers: results from the population-based burden of obstructive lung disease study. *Chest.* 2011 Apr; 139(4):752-763.
- Lang A, Nikolich-Zugich J (2011). Functional CD8 T cell memory responding to persistent latent infection is maintained for life. *J Immunol.* 2011 Oct 1;187(7):3759-68.
- Laniado-Laborín R (2009). Smoking and Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). Parallel Epidemics of the 21st Century. *Int J Environ Res Public Health.* 2009 Jan; 6(1): 209–224.
- Lapis K, Tímár J (2002). Role of elastin-matrix interactions in tumor progression. *Semin Cancer Biol.* 2002 Jun;12(3):209-17.
- Lavasani M, Robinson AR, Lu A, Song M, Feduska JM, Ahani B, Tilstra JS, Feldman CH, Robbins PD, Niedernhofer LJ, Huard J (2012). Muscle-derived stem/progenitor cell dysfunction limits healthspan and lifespan in a murine progeria model. *Nat. Commun.* 3, 608.
- Le Cabec V, Van Goethem E, Guiet R, Maridonneau-Parini I (2011). [Phagocyte migration: an overview]. Article in French. *Med Sci (Paris).* 2011 Dec;27(12):1112-9.
- Leahy DJ. A structural view of CD4 and CD8. *FASEB J.* 1995 Jan;9(1):17-25.
- Lee SH, Goswami S, Grudo A, Song LZ, Bandi V, Goodnight-White S, Green L, Hacken-Bitar J, Huh J, Bakaeen F, Coxson HO, Cogswell S, Storness-Bliss C, Corry DB, Kheradmand F (2007). Anti-elastin autoimmunity in tobacco smoking-induced emphysema. *Nat Med.* 2007 May;13(5):567-9.
- Leng SX, Yang H, Walston JD (2004). Decreased cell proliferation and altered cytokine production in frail older adults. *Aging Clin Exp Res.* 2004 Jun;16(3):249-52.
- Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA (1996). CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 1996;14:233–258.
- Leopold PL, O'Mahony MJ, Lian XJ, Tilley AE, Harvey BG, Crystal RG (2009). Smoking is associated with shortened airway cilia. *PLoS One.* 2009 Dec 16; 4(12):e8157.
- Levine BL, Ueda Y, Craighead N, Huang ML, June CH (1995). CD28 ligands CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) induce long-term autocrine growth of CD4+ T cells and induce similar patterns of cytokine secretion in vitro. *Int Immunol.* 1995 Jun;7(6):891-904

- Lieberman D, Lieberman D, Ben-Yaakov M, Lazarovich Z, Hoffman S, Ohana B, Friedman MG, Dvoskin B, Leinonen M, Boldur I (2001). Infectious etiologies in acute exacerbation of COPD. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001;40:95–102.
- Lindberg CA, Engström G, de Verdier MG, Nihlén U, Anderson M, Forsman-Semb K, Svartengren M (2012). Total desmosines in plasma and urine correlate with lung function. *Eur Respir J*. 2012 Apr; 39(4):839-45.
- Linder R, Rönmark E, Pourazar J, Behndig A, Blomberg A, Lindberg A (2015). Serum metalloproteinase-9 is related to COPD severity and symptoms - cross-sectional data from a population based cohort-study. *Respir Res*. 2015 Feb 21;16:28.
- Linsley PS, Ledbetter JA (1993). The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Annu Rev Immunol*. 1993;11:191-212.
- Lombard C, Arzel L, Bouchu D, Wallach J, Saulnier J (2006). Human leukocyte elastase hydrolysis of peptides derived from human elastin exon 24. *Biochimie*. 2006 Dec;88(12):1915-21.
- Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G (2013). The hallmarks of aging. *Cell* 153, 1194–1217.
- Lowery EM, Brubaker AL, Kuhlmann E, Kovacs EJ (2013). The aging lung. *Clin Interv Aging* 2013; 8: 1489–1496.
- Lucey EC, Stone PJ, Breuer R, Christensen TG, Calore JD, Catanese A, Franzblau C, Snider GL (1985). Effect of combined human neutrophil cathepsin G and elastase on induction of secretory cell metaplasia and emphysema in hamsters, with in vitro observations on elastolysis by these enzymes. *Am Rev Respir Dis* 1985;132:362–366.
- Luisetti M, Ma S, Iadarola P, Stone PJ, Viglio S, Casado B, Lin YY, Snider GL, Turino GM (2008). Desmosine as a biomarker of elastin degradation in COPD: current status and future directions. *Eur Respir J*. 2008 Nov;32(5):1146-57.
- Lumsden AB, McLean A, Lamb D (1984). Goblet and Clara cells of human distal airways: evidence for smoking induced changes in their numbers. *Thorax*. 1984 Nov; 39(11):844-9.
- Lundbäck B, Lindberg A, Lindström M, Rönmark E, Jonsson AC, Jönsson E, Larsson LG, Andersson S, Sandström T, Larsson K, Obstructive Lung Disease in Northern Sweden Studies (2003). Not 15 but 50% of smokers develop COPD?--Report from the Obstructive Lung Disease in Northern Sweden Studies. *Respir Med*. 2003 Feb; 97(2):115-22.
- MacDonald HR, Lees RK, Schneider R, Zinkernagel RM, Hengartner H (1988). Positive selection of CD4+ thymocytes controlled by MHC class II gene products. *Nature*. 1988 Dec 1;336(6198):471-3.
- MacDonald HR, Radtke F, Wilson A (2001). T cell fate specification and alphabeta/gammadelta lineage commitment. *Curr Opin Immunol*. 2001 Apr;13(2):219-24.
- MacNee W, Donaldson K (2000). Exacerbations of COPD: environmental mechanisms. *Chest* 2000;117:390S–397S.
- Maeno T, Houghton AM, Quintero PA, Grumelli S, Owen CA, Shapiro SD (2007). CD8+ T Cells are required for inflammation and destruction in cigarette smoke-induced emphysema in mice. *J Immunol*. 2007 Jun 15;178(12):8090-6.
- Maggi E, Giudizi MG, Biagiotti R, Annunziato F, Manetti R, Piccinni MP, Parronchi P, Sampognaro S, Giannarini L, Zuccati G, Romagnani S (1994). Th2-like CD8+ T cells showing B cell helper function and reduced cytolytic activity in human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Exp Med*. 1994 Aug 1;180(2):489-95.
- Majo J, Ghezzi H, Cosio MG (2001). Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema. *Eur Respir J*, 17:946–53.

- Manzel LJ, Shi L, O'Shaughnessy PT, Thorne PS, Look DC (2011). Inhibition by cigarette smoke of nuclear factor- κ B-dependent response to bacteria in the airway. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011 Feb; 44(2):155-65.
- Maquart FX, Bellon G, Pasco S, Monboisse JC (2005). Matrikines in the regulation of extracellular matrix degradation. *Biochimie*. 2005 Mar-Apr;87(3-4):353-60.
- Maquart FX, Pasco S, Ramont L, Hornebeck W, Monboisse JC (2005). An introduction to matrikines: extracellular matrix-derived peptides which regulate cell activity. Implication in tumor invasion. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2004 Mar;49(3):199-202.
- Maquart FX, Siméon A, Pasco S, Monboisse JC (1999). [Regulation of cell activity by the extracellular matrix: the concept of matrikines]. *J Soc Biol*. 1999;193(4-5):423-8. Review. French.
- Marieb EN, Hoehn K, Moussakova L, Lachaine R (2014). *Anatomie et physiologie humaines, adaptation de la 9e édition américaine*. Pearson Education. Montréal.
- Marnaros AG, Olsen BR (2001). The role of collagen-derived proteolytic fragments in angiogenesis. *Matrix Biol* 2001;20:337-45.
- McGovern NN, Cowburn AS, Porter L, Walmsley SR, Summers C, Thompson AA, Anwar S, Willcocks LC, Whyte MK, Condliffe AM, Chilvers ER (2011). Hypoxia selectively inhibits respiratory burst activity and killing of *Staphylococcus aureus* in human neutrophils. *J Immunol* 2011;186:453-463.
- Medina E, Guzman CA (2001). Use of live bacterial vaccine vectors for antigen delivery: potential and limitations. *Vaccine* 19:1573.
- Meghraoui-Kheddar A, Pierre A, Sellami M, Audonnet S, Lemaire F, Le Naour R (2017). Elastin receptor (S-gal) occupancy by elastin peptides modulates T-cell response during murine emphysema. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 313:L534-L547, 2017.
- Meloni F, Paschetto E, Mangiarotti P, Crepaldi M, Morosini M, Bulgheroni A, Fietta A (2004). Acute *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* infections in community-acquired pneumonia and exacerbations of COPD or asthma: therapeutic considerations. *J Chemother* 2004;16:70-76.
- Menezes AMB, Perez-Padilla R, Hallal PC, Jardim JR, Muiño A, Lopez MV, Valdivia G, Pertuze J, Montes de Oca M, Tálamo C (2008), for the PLATINO Team Worldwide burden of COPD in high- and low-income countries. Part II. Burden of chronic obstructive lung disease in Latin America: the PLATINO study. *Int. J. Tuberc. Lung Dis*. 2008;12:709-712.
- Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A (2013). The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol* 31:563-604.
- Meyer KC, Rosenthal NS, Soergel P, Peterson K (1998). Neutrophils and lowgrade inflammation in the seemingly normal aging human lung. *Mech Ageing Dev* 1998;104:169-181.
- Milara J, Juan G, Peiro T, Serrano A, Cortijo J (2012). Neutrophil activation in severe, early onset COPD. Patients versus healthy non-smoker subjects in vitro: effects of anti-oxidant therapy. *Respiration*, 83 (2) (2012), pp. 147-158
- Mitchell WA, Lang PO, Aspinall R (2010). Tracing thymic output in older individuals. *Clin Exp Immunol*. 2010 Sep;161(3):497-503.
- Mittal CK, Murad F (1977). Activation of guanylate cyclase by superoxide dismutase and hydroxyl radical: a physiological regulator of guanosine 3',5'-monophosphate formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 Oct;74(10):4360-4.
- Mittrücker HW, Visekruna A, Huber M (2014). Heterogeneity in the differentiation and function of CD8⁺ T cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2014 Dec;62(6):449-58.

- Monaco C, Andreakos E, Kiriakidis S, Feldmann M, Paleolog E (2004). T-cell mediated signaling in immune, inflammatory and angiogenic processes: the cascade of events leading to inflammatory diseases. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 3:35–42.
- Mond JJ, Lees A, Snapper CM (1995). T cell-independent antigens type 2. *Annu Rev Immunol* 1995; 13:655–92.
- Morgan MJ, Liu ZG (2011). Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Res*. 2011 Jan;21(1):103-15. doi: 10.1038/cr.2010.178.
- Moriyama C, Betsuyaku T, Ito Y, Hamamura I, Hata J, Takahashi H, Nasuhara Y, Nishimura M (2010). Aging enhances susceptibility to cigarette smoke-induced inflammation through bronchiolar chemokines. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010; 42:304–311.
- Morrisette-Thomas V, Cohen AA, Fulop T, Riesco E, Legault V, Li Q, Milot E, Dusseault-Belanger F, Ferrucci L (2014). Inflamm-aging does not simply reflect increases in pro-inflammatory markers. *Mech Ageing Dev* 139:49–57
- Mosmann TR, Sad S (1996). The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today*. 1996 Mar;17(3):138-46.
- "Müller KC, Welker L, Paasch K, Feindt B, Erpenbeck VJ, Hohlfeld JM, Krug N, Nakashima M, Branscheid D, Magnussen H, Jörres RA, Holz O (2006). Lung fibroblasts from patients with emphysema show markers of senescence in vitro. *Respir Res*. 2006 Feb 21;7:32.
- "
- Müns G, Rubinstein I, Singer P (1995). Phagocytosis and oxidative burst of granulocytes in the upper respiratory tract in chronic and acute inflammation. *J Otolaryngol* 1995;24:105–110.
- Murphy TF, Sethi S, Niederman MS (2000). The role of bacteria in exacerbations of COPD. A constructive view. *Chest*. 2000 Jul;118(1):204-9. Review.
- Nakajima T, Schulte S, Warrington KJ, Kopecky SL, Frye RL, Goronzy JJ, Weyand CM (2002). T-cell-mediated lysis of endothelial cells in acute coronary syndromes. *Circulation*. 2002;105:570–5.
- Nauseef WM (2014). Myeloperoxidase in human neutrophil host defence. *Cell Microbiol*. 2014 Aug;16(8):1146-55.
- Naylor EJ, Bakstad D, Biffen M, Thong B, Calverley P, Scott S, Hart CA, Moots RJ, Edwards SW (2007). *Haemophilus influenzae* induces neutrophil necrosis: a role in chronic obstructive pulmonary disease? *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007 Aug;37(2):135-43.
- Nelson G, Wordsworth J, Wang C, Jurk D, Lawless C, Martin-Ruiz C, von Zglinicki T (2012). A senescent cell bystander effect: senescence-induced senescence. *Aging Cell* 11, 345–349.
- Netea MG, Quintin J, van der Meer JW (2011). Trained immunity: a memory for innate host defense. *Cell Host Microbe* 9:355–361
- Nocker RE, Schoonbrood DF, van de Graaf EA, Hack CE, Lutter R, Jansen HM, Out TA (1996). Interleukin-8 in airway inflammation in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Int Arch Allergy Immunol*. 1996 Feb;109(2):183-91.
- North RJ (1978). The concept of the activated macrophage. *J Immunol*. 1978 Sep;121(3):806-9.
- Ntayi C, Labrousse AL, Debret R, Birembaut P, Bellon G, Antonicelli F, Hornebeck W, Bernard P (2004). Elastin-derived peptides upregulate matrix metalloproteinase-2-mediated melanoma cell invasion through elastin-binding protein. *J Invest Dermatol*. 2004 Feb;122(2):256-65.
- O'Shaughnessy TC, Ansari TW, Barnes NC, Jeffery PK (1997). Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8+ T lymphocytes with FEV1. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 155: 852–857.

- Oeppen J, Vaupel JW (2002). Broken Limits to Life Expectancy. *Science*. 2002 May 10; 296(5570): 1029–31
- O'Garra A, Arai N (2000). The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. *Trends Cell Biol*. 2000 Dec;10(12):542-50.
- Omori M, Yamashita M, Inami M, Ukai-Tadenuma M, Kimura M, Nigo Y, Hosokawa H, Hasegawa A, Taniguchi M, Nakayama T (2003). CD8 T cell-specific downregulation of histone hyperacetylation and gene activation of the IL-4 gene locus by ROG, repressor of GATA. *Immunity*. 2003 Aug;19(2):281-94.
- Ostan R, Bucci L, Capri M, Salvioli S, Scurti M, Pini E, Monti D and Franceschi C (2008). Immunosenescence and immunogenetics of human longevity. *Neuroimmunomodulation*, 15: 224-240
- Ostensen M, Førre O (1988). Modulation of human natural killer cell function by cytokines and rheumatic disease. *Scand J Rheumatol Suppl*. 1988;76:183-8.
- Ostridge K, Williams N, Kim V, Bennett M, Harden S, Welch L, Bourne S, Coombs NA, Elkington PT, Staples KJ, Wilkinson TM (2016). Relationship between pulmonary matrix metalloproteinases and quantitative CT markers of small airways disease and emphysema in COPD. *Thorax*. 2016 Feb;71(2):126-32.
- Ostuni R, Piccolo V, Barozzi I, Polletti S, Termanini A, Bonifacio S, Curina A, Prosperini E, Ghisletti S, Natoli G (2013). Latent enhancers activated by stimulation in differentiated cells. *Cell* 152:157–171
- Owen CA (2005). Proteinases and oxidants as targets in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2005;2(4):373-85; discussion 394-5. Review.
- Owen AJ, Punt J, Stranford SA (2013). *Kuby Immunology*, 7th edition. WH Freeman & Co Ltd, New York.
- Paone G, Conti V, Vestri A, Leone A, Puglisi G, Benassi F, Brunetti G, Schmid G, Cammarella I, Terzano C (2011). Analysis of sputum markers in the evaluation of lung inflammation and functional impairment in symptomatic smokers and COPD patients. *Dis Markers* 2011;31:91–100.
- Papi A, Bellettato CM, Braccioni F, Romagnoli M, Casolari P, Caramori G, Fabbri LM, Johnston SL (2006). Infections and airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease severe exacerbations. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:1114–1121.
- Parish ST, Wu JE, Effros RB (2009). Modulation of T lymphocyte replicative senescence via TNF- α inhibition: role of caspase-3. *J Immunol*. 2009 Apr 1; 182(7):4237–43.
- Parish ST, Wu JE, Effros RB (2010). Sustained CD28 expression delays multiple features of replicative senescence in human CD8 T lymphocytes. *J Clin Immunol*. 2010 Nov; 30(6):798–805.
- Park W, Weyand CM, Schmidt D, Goronzy JJ (1997). Costimulatory pathways controlling activation and peripheral tolerance of human CD4⁺CD28⁻ T cells. *Eur J Immunol*. 1997;27:1082–90.
- Partridge SM, Davies HF, Adair GS (1955). The chemistry of connective tissues. 2. Soluble protein derived from partial hydrolysis of elastin. *Biochem J* 1955;61:11–21.
- Partridge SM, Elsdon DF, Thomas J, Dorfman A, Telser A, Ho PL (1964). Biosynthesis of the desmosine and isodesmosine cross-bridges in elastin. *Biochem J*. 1964 Dec;93(3):30C-33C.
- Patel IS, Seemungal TAR, Wilks M, Lloyd-Owen SJ, Donaldson GC, Wedzicha JA (2002). Relationship between bacterial colonisation and the frequency, character, and severity of COPD exacerbations. *Thorax* 2002;57:759-64
- Pauwels RA, Buist AS, Ma P, Jenkins CR, Hurd SS; GOLD Scientific Committee (2001). Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: National Heart, Lung, and Blood Institute and World Health Organization Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD): executive summary. *Respir Care*. 2001 Aug;46(8):798-825.
- Pawelec G, Akbar A, Caruso C, Solana R, Grubeck-Loebenstien B and Wikby A (2005). Human immunosenescence: is it infectious? *Immunol Rev*, 205: 257-268

- Perelson AS, Wiegel FW (1981). Theoretical considerations of the role of antigen structure in B cell activation. *Fed Proc* 1981; 40:1479–83.
- Petersen E, Wågberg F, Angquist KA (2002). Serum concentrations of elastin-derived peptides in patients with specific manifestations of atherosclerotic disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2002 Nov;24(5):440–4.
- Peterszegi G, Texier S, Robert L (1999). Cell death by overload of the elastin–laminin receptor on human activated lymphocytes: protection by lactose and melibiose. *Eur J Clin Invest* 1999;29:166–72.
- Pilette C, Colinet B, Kiss R, Andre S, Kaltner H, Gabius HJ, Delos M, Vaerman JP, Decramer M, Sibille Y (2007). Increased galectin-3 expression and intra-epithelial neutrophils in small airways in severe COPD. *Eur Respir J*. 2007;29:914–922.
- Pilette C, Godding V, Kiss R, Delos M, Verbeken E, Decaestecker C, De Paepe K, Vaerman JP, Decramer M, Sibille Y (2001). Reduced epithelial expression of secretory component in small airways correlates with airflow obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Jan; 163(1):185–94.
- Pipkin ME, Sacks JA, Cruz-Guilloty F, Lichtenheld MG, Bevan MJ, Rao A (2010). Interleukin-2 and inflammation induce distinct transcriptional programs that promote the differentiation of effector cytolytic T cells. *Immunity*. 2010 Jan 29;32(1):79–90.
- Plotkin SA (2003). Vaccines, vaccination, and vaccinology. *J. Infect. Dis.* 187:1349.
- Pocza P, Süli-Vargha H, Darvas Z, Falus A (2008). Locally generated VGVAPG and VAPG elastin-derived peptides amplify melanoma invasion via the galectin-3 receptor. *Int J Cancer*. 2008 May 1;122(9):1972–80.
- Podolin PL, Foley JP, Carpenter DC, Bolognese BJ, Logan GA, Long E 3rd, Harrison OJ, Walsh PT (2013). T cell depletion protects against alveolar destruction due to chronic cigarette smoke exposure in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2013 Mar 1;304(5):L312–23.
- Polosukhin VV, Lawson WE, Milstone AP, Egunova SM, Kulipanov AG, Tchuvakin SG, Massion PP, Blackwell TS (2007). Association of progressive structural changes in the bronchial epithelium with subepithelial fibrous remodeling: a potential role for hypoxia. *Virchows Arch* 2007;451:793–803.
- Prieto A, Reyes E, Bernstein ED, Martinez B, Monserrat J, Izquierdo JL, Callol L, de LUCAS P, Alvarez-Sala R, Alvarez-Sala JL, Villarrubia VG, Alvarez-Mon M (2001). Defective natural killer and phagocytic activities in chronic obstructive pulmonary diseases
- Privitera S, Prody CA, Callahan JW, Hinek A (1998). The 67-kDa enzymatically inactive alternatively spliced variant of beta-galactosidase is identical to the elastin/laminin-binding protein. *J Biol Chem*. 1998 Mar 13;273(11):6319–26.
- Provinciali M, Cardelli M, Marchegiani F (2011). Inflammation, chronic obstructive pulmonary disease and aging. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 17, S3–S10
- Rabin EM, Mond JJ, Ohara J, Paul WE (1986). B cell stimulatory factor 1 (BSF-1) prepares resting B cells to enter S phase in response to anti-IgM and lipopolysaccharide. *J Exp Med*. 1986 Aug 1;164(2):517–31.
- Raphael I, Nalawade S, Eagar TN, Forsthuber TG (2015). T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine*. 2015 Jul;74(1):5–17.
- Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, Futter M, Garcia-Arencibia M, Green-Thompson ZW, Jimenez-Sanchez M, Korolchuk VI, Lichtenberg M, Luo S, Massey DC, Menzies FM, Moreau K, Narayanan U, Renna M, Siddiqi FH, Underwood BR, Winslow AR, Rubinsztein DC (2010). Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 2010 Oct; 90(4):1383–435.
- Reiner SL (2007). Development in motion: helper T cells at work. *Cell*. 2007;129:33–36.
- Retamales I, Elliott WM, Meshi B, Coxson HO, Pare PD, Sciurba FC, Rogers RM, Hayashi S, Hogg JC (2001). Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Aug 1;164(3):469–73.

- Richens TR, Linderman DJ, Horstmann SA, Lambert C, Xiao YQ, Keith RL, Boé DM, Morimoto K, Bowler RP, Day BJ, Janssen WJ, Henson PM, Vandivier RW (2009). Cigarette smoke impairs clearance of apoptotic cells through oxidant-dependent activation of RhoA. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;179:1011–1021.
- Riley JL, June CH (2005). The CD28 Family: a T Cell Rheostat for Therapeutic Control of T Cell Activation. *Blood* 2005;105:13–21.
- Robert L (1997). [Relation between genetic and epigenetic mechanisms in aging]. *C R Seances Soc Biol Fil.* 1997;191(4):593-602. French.
- Robinet A, Fahem A, Cauchard JH, Huet E, Vincent L, Lorimier S, Antonicelli F, Soria C, Crepin M, Hornebeck W, Bellon G (2004). Elastin-derived peptides enhance angiogenesis by promoting endothelial cell migration and tubulogenesis through upregulation of MT1-MMP. *J Cell Sci.* 2005 Jan 15;118(Pt 2):343-56.
- Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF (1998). A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Jan 20;95(2):588-93.
- Rock KL, Goldberg AL (1999). Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu Rev Immunol* 1999;17: 739–779.
- Rock KL, Shen L (2005). Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance. *Immunol. Rev.* 207, 166–183
- Rocklin RE, Bendtzen K, Greineder D (1980). Mediators of immunity: lymphokines and monokines. *Adv Immunol.* 1980;29:55-136. Review
- Rodgers UR, Weiss AS (2005). Cellular interactions with elastin. *Pathol Biol (Paris).* 2005 Sep;53(7):390-8.
- Rodriguez-Roisin R (2000). Towards a consensus definition for COPD exacerbations. *Chest* 2000;117:398-401S
- Rosenstein Y, Ratnofsky S, Burakoff SJ, Herrmann SH (1989). Direct evidence for binding of CD8 to HLA class I antigens. *J Exp Med.* 1989 Jan 1;169(1):149-60.
- Rosso F, Giordano A, Barbarisi M, Barbarisi A (2004). From cell-ECM interactions to tissue engineering. *J Cell Physiol.* 2004 May;199(2):174-80. Review.
- Roth M (2008). Pathogenesis of COPD. Part III. Inflammation in COPD. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2008 Apr;12(4):375-80. Review.
- Russ BE, Prier JE, Rao S, Turner SJ (2013). T cell immunity as a tool for studying epigenetic regulation of cellular differentiation. *Front Genet.* 2013 Nov 12;4:218.
- Sad S, Krishnan L, Bleackley RC, Kägi D, Hengartner H, Mosmann TR (1997). Cytotoxicity and weak CD40 ligand expression of CD8+ type 2 cytotoxic T cells restricts their potential B cell helper activity. *Eur J Immunol.* 1997 Apr;27(4):914-22.
- Saeed S, Quintin J, Kerstens HH, Rao NA, Aghajani-refah A, Matarese F, Cheng SC, Ratter J, Berentsen K, van der Ent MA, Sharifi N, Janssen-Megens EM, Ter-Huurne M, Mandoli A, van Schaik T, Ng A, Burden F, Downes K, Frontini M, Kumar V, Giamarellos-Bourboulis EJ, Ouweland WH, van der Meer JW, Joosten LA, Wijmenga C, Martens JH, Xavier RJ, Logie C, Netea MG, Stunnenberg HG (2014). Epigenetic programming of monocyte-to-macrophage differentiation and trained innate immunity. *Science* 345:1251086
- Saetta M, Di Stefano A, Turato G, Facchini FM, Corbino L, Mapp CE, Maestrelli P, Ciaccia A, Fabbri LM (1998). CD8+ lymphocytes in the peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med,* 157:822–6.
- Sajjan US (2013). Susceptibility to viral infections in chronic obstructive pulmonary disease: role of epithelial cells. *Curr Opin Pulm Med.* 2013 Mar; 19(2):125-32.
- Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature.* 1999 Oct 14;401(6754):708-12.

- Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A (2012). Inflammaging: disturbed interplay between autophagy and inflammasomes. *Aging* (Albany NY). 2012 Mar;4(3):166-75.
- Sampsonas F, Karkoulis K, Kaparianos A, Spiropoulos K (2006). Genetics of chronic obstructive pulmonary disease, beyond α 1-antitrypsin deficiency. *Curr Med Chem*. 2006;13(24):2857-73.
- Sandberg LB, Soskel NT, Leslie JG (1981). Elastin structure, biosynthesis, and relation to disease states. *N Engl J Med*. 1981 Mar 5;304(10):566-79.
- Sapey E, Stockley R (2006). COPD exacerbations.2: Aetiology. *Thorax*. 2006 Mar;61(3):250-8.
- Satpathy AT, Wu X, Albring JC, Murphy KM (2012). Re(de)fining the dendritic cell lineage. *Nat Immunol* 13(12):1145–1154.
- Saule P, Trauet J, Dutriez V, Lekeux V, Dessaint JP, Labalette M. (2006). Accumulation of memory T cells from childhood to old age: central and effector memory cells in CD4(+) versus effector memory and terminally differentiated memory cells in CD8(+) com
- Schafer PH, Gandhi AK, Loveland MA, Chen RS, Man HW, Schnetkamp PP, Wolbring G, Govinda S, Corral LG, Payvandi F, Muller GW, Stirling DI (2003). Enhancement of cytokine production and AP-1 transcriptional activity in T cells by thalidomide-related immunomodulatory drugs. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003 Jun;305(3):1222-32.
- Schluns KS, Lefrançois L (2003). Cytokine control of memory T-cell development and survival. *Nat Rev Immunol*. 2003 Apr;3(4):269-79. Review.
- Schmidt D, Goronzy JJ, Weyand CM (1996). CD4+ CD7- CD28- T cells are expanded in rheumatoid arthritis and are characterized by autoreactivity. *J Clin Invest*. 1996 May 1;97(9):2027-37.
- Schmitz ML, Bacher S, Dienz O (2003). NF- κ B activation pathways induced by T cell costimulation. *The FASEB Journal*. 2003 Dec 1; 17(15):2187–93.
- Schriner EE, Davidson JM, Sutcliffe MC, Swindell BB, Bernard GR (1992). Comparison of elastin peptide concentrations in body fluids from healthy volunteers, smokers, and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis*. 1992 Apr;145(4 Pt 1):762-6.
- Sebzda E, Mariathasan S, Ohteki T, Jones R, Bachmann MF, Ohashi PS (1999). Selection of the T cell repertoire. *Annu Rev Immunol*. 1999;17:829-74.
- Sellami M, Meghraoui-Kheddar A, Terryn C, Fichel C, Bouland N, Diebold MD, Guenounou M, Héry-Huynh S, Le Naour R (2015). Induction and regulation of murine emphysema by elastin peptides. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2016 Jan 1;310(1):L8-L23.
- Senior RM, Griffin GL, Mecham RP (1980). Chemotactic activity of elastin-derived peptides. *J Clin Invest*. 1980 Oct;66(4):859-62.
- Senior RM, Griffin GL, Mecham RP, Wrenn DS, Prasad KU, Urry DW (1984). Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly, a repeating peptide in elastin, is chemotactic for fibroblasts and monocytes. *J Cell Biol*. 1984 Sep;99(3):870-4.
- Sethi S, Murphy T (2008). Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 359: 2355–2365
- Shapiro SD (1994). Elastolytic metalloproteinases produced by human mononuclear phagocytes. Potential roles in destructive lung disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994 Dec;150(6 Pt 2):S160-4.
- Sharma G, Hanania NA, Shim YM (2009). The aging immune system and its relationship to the development of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2009;6:573–580.
- Shaw AC, Goldstein DR, Montgomery RR (2013). Age-dependent dysregulation of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 13:875–887

- Shaykhiev R, Otaki F, Bonsu P, Dang DT, Teater M, Strulovici-Barel Y, Salit J, Harvey BG, Crystal RG (2011). Cigarette smoking reprograms apical junctional complex molecular architecture in the human airway epithelium in vivo. *Cell Mol Life Sci.* 2011 Mar; 68(5):877-92.
- Shifren A, Mecham RP (2006). The stumbling block in lung repair of emphysema: elastic fiber assembly. *Proc Am Thorac Soc.* 2006 Jul;3(5):428-33. Review.
- Simons A, Zharhary D (1989). The role of IL-4 in the generation of B lymphocytes in the bone marrow. *J Immunol.* 1989 Oct 15;143(8):2540-5.
- Singh T, Newman AB (2011). Inflammatory markers in population studies of aging. *Ageing Res Rev.* 2011 Jul;10(3):319-29
- Smallman LA, Hill SL, Stockley RA (1984). Reduction of ciliary beat frequency in vitro by sputum from patients with bronchiectasis: a serine proteinase effect. *Thorax* 1984;39:663–667.
- Solana R, Tarazona R, Gayoso I, Lesur O, Dupuis G, Fulop T (2012). Innate immunosenescence: effect of aging on cells and receptors of the innate immune system in humans. *Semin Immunol* 24:331–341
- Spaulding C, Guo W, Effros RB (1999). Resistance to apoptosis in human CD8+ T cells that reach replicative senescence after multiple rounds of antigen-specific proliferation. *Exp Gerontol.* 1999; 34(5):633–44.
- Spiller KL, Anfang RR, Spiller KJ, Ng J, Nakazawa KR, Daulton JW, Vunjak-Novakovic G (2014). The role of macrophage phenotype in vascularization of tissue engineering scaffolds. *Biomaterials.* 2014 May;35(15):4477-88.
- Sprent J, Surh CD (2002). T cell memory. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:551-79.
- Stănescu D, Sanna A, Veriter C, Kostianev S, Calcagni PG, Fabbri LM, Maestrelli P (1996). Airways obstruction, chronic expectoration, and rapid decline of FEV1 in smokers are associated with increased levels of sputum neutrophils. *Thorax* 1996;51:267–271.
- Starr TK, Jameson SC, Hogquist KA (2003). Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:139-76.
- Stone PJ, Franzblau C, Kagan HM (1982). Proteolysis of insoluble elastin. *Methods Enzymol.* 1982;82 Pt A:588-605
- Stranks AJ, Hansen AL, Panse I, Mortensen M, Ferguson DJ, Puleston DJ, Shenderov K, Watson AS, Veldhoen M, Phadwal K, Cerundolo V, Simon AK (2015). Autophagy Controls Acquisition of Aging Features in Macrophages. *J Innate Immun.* 2015;7(4):375-91
- Strindhall J, Skog M, Ernerudh J, Bengner M, Löfgren S, Matussek A, Nilsson BO, Wikby A (2013). The inverted CD4/CD8 ratio and associated parameters in 66-year-old individuals: the Swedish HEXA immune study. *Age (Dordr).* 2013 Jun;35(3):985-91.
- Stringer KA, Tobias M, O'Neill HC, Franklin CC (2007). Cigarette smoke extract-induced suppression of caspase-3-like activity impairs human neutrophil phagocytosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;292:L1572–L1579.
- Sullivan SD, Ramsey SD, Lee TA (2000). The economic burden of COPD. *Chest* 2000;117:5S–9S.
- Surh CD, Sprent J (2008). Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity* 2008;29:848–862.
- Taggart CC, Greene CM, Carroll TP, O'Neill SJ, McElvaney NG (2005). Elastolytic proteases: inflammation resolution and dysregulation in chronic infective lung disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005 May 15;171(10):1070-6.
- Tajima M, Wakita D, Satoh T, Kitamura H, Nishimura T (2011). IL-17/IFN- γ double producing CD8+ T (Tc17/IFN- γ) cells: a novel cytotoxic T-cell subset converted from Tc17 cells by IL-12. *Int Immunol.* 2011 Dec;23(12):751-9.

- Taraseviciene-Stewart L, Scerbavicius R, Choe KH, Moore M, Sullivan A, Nicolls MR, Fontenot AP, Tuder RM, Voelkel NF (2005). An animal model of autoimmune emphysema. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005 Apr 1;171(7):734-42
- Tashkin DP, Clark VA, Coulson AH, Simmons M, Bourque LB, Reems C, Detels R, Sayre JW, Rokaw SN (1984). The UCLA population studies of chronic obstructive respiratory disease. VIII. Effects of smoking cessation on lung function: a prospective study of a free-living population. *Am Rev Respir Dis.* 1984 Nov;130(5):707-15.
- Taylor AE, Finney-Hayward TK, Quint JK, Thomas CM, Tudhope SJ, Wedzicha JA, Barnes PJ, Donnelly LE (2010). Defective macrophage phagocytosis of bacteria in COPD. *Eur Respir J.* 2010 May; 35(5):1039-47.
- Tedder TF, Steeber DA, Pizcueta P (1995). L-selectin-deficient mice have impaired leukocyte recruitment into inflammatory sites. *J Exp Med.* 1995 Jun 1;181(6):2259-64.
- Teramoto S, Ishill M (2007). Aging, the aging lung, and senile emphysema are different. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 175:197–198.
- Thewissen M, Somers V, Venken K, Linsen L, van Paassen P, Geusens P, Damoiseaux J, Stinissen P (2007). Analyses of immunosenescent markers in patients with autoimmune disease. *Clin Immunol.* 2007;123:209–18.
- Thomas J, Elsdon DF, Partridge SM (1963). Partial structure of two major degradation products from cross-linkages in elastin. *Nature.* 1963 Nov 16;200:651-2.
- Thompson CB, Lindsten T, Ledbetter JA, Kunkel SL, Young HA, Emerson SG, Leiden JM, June CH (1989). CD28 activation pathway regulates the production of multiple T-cell-derived lymphokines/cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Feb;86(4):1333-7.
- Thurlbeck WM, Angus GE (1975). Growth and aging of the normal human lung. *Chest* 1975; 67(suppl):3S–6S.
- Timar J, Lapis K, Fulop T, Varga ZS, Tixier JM, Robert L, Hornebeck W (1991). Interaction between elastin and tumor cell lines with different metastatic potential; in vitro and in vivo studies. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1991;117(3):232-8.
- Tosi MF, Zakem H, Berger M (1990). Neutrophil elastase cleaves C3bi on opsonized pseudomonas as well as CR1 on neutrophils to create a functionally important opsonin receptor mismatch. *J Clin Invest* 1990;86:300–308.
- Tsuji T, Aoshiba K, Nagai A (2006). Alveolar cell senescence in patients with pulmonary emphysema. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006 Oct 15;174(8):886-93. Epub 2006 Aug 3.
- Tsuji T, Aoshiba K, Nagai A (2010). Alveolar cell senescence exacerbates pulmonary inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respiration; inter-national review of thoracic diseases.* 2010; 80:59–70.
- Turner JM, Mead J, Wohl ME (1968). Elasticity of human lungs in relation to age. *J Appl Physiol* 1968; 25: 664–671.
- Tyznik AJ, Sun JC, Bevan MJ (2004). The CD8 population in CD4-deficient mice is heavily contaminated with MHC class II-restricted T cells. *J Exp Med.* 2004 Feb 16;199(4):559-65
- Uitto J (1979). Biochemistry of the elastic fibers in normal connective tissues and its alterations in diseases. *J Invest Dermatol.* 1979 Jan;72(1):1-10. Review.
- United Nations Department of Economic and Social Affairs Population Division. (2013). *World Population Ageing 2013.*
- Urbanowicz RA, Lamb JR, Todd I, Corne JM, Fairclough LC (2010). Enhanced eff ector function of cytotoxic cells in the induced sputum of COPD patients. *Respir Res* 2010; 11: 76.

- Valenzuela HF, Effros RB (2002). Divergent telomerase and CD28 expression patterns in human CD4 and CD8 T cells following repeated encounters with the same antigenic stimulus. *Clin Immunol* 2002;105(2):117–125.
- Vallejo AN (2005). CD28 extinction in human T cells: altered functions and the program of T-cell senescence. *Immunol Rev* 2005;205:158–169.
- Van Deursen JM (2014). The role of senescent cells in ageing. *Nature* 509:439–446
- Van Goethem E, Poincloux R, Gauffre F, Maridonneau-Parini I, Le Cabec V (2010). Matrix architecture dictates three-dimensional migration modes of human macrophages: differential involvement of proteases and podosome-like structures. *J Immunol*. 2010 Jan 15;184(2):1049-61.
- Vaziri H, Schächter F, Uchida I, Wei L, Zhu X, Effros R, Cohen D, Harley CB (1993). Loss of telomeric DNA during aging of normal and trisomy 21 human lymphocytes. *Am J Hum Genet*. 1993 Apr; 52(4):661–7.
- Villadangos JA, Schnorrer P (2007). Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nat Rev Immunol*. 2007 Jul;7(7):543-55.
- Vos Q, Lees A, Wu ZQ, Snapper CM, Mond JJ (2000). B cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms. *Immunol Rev* 2000; 176:154–70.
- Vrhovski B, Weiss AS (1998). Biochemistry of tropoelastin. *Eur J Biochem* 1998; 258: 1–18.
- Wallace AM, Sandford AJ, English JC, Burkett KM, Li H, Finley RJ, Müller NL, Coxson HO, Paré PD, Abboud RT (2008). Matrix metalloproteinase expression by human alveolar macrophages in relation to emphysema. *COPD*. 2008 Feb;5(1):13-23.
- Walters MS, De BP, Salit J, Buro-Auriemma LJ, Wilson T, Rogalski AM, Lief L, Hackett NR, Staudt MR, Tilley AE, Harvey BG, Kaner RJ, Mezey JG, Ashbridge B, Moore MA, Crystal RG (2014). Smoking accelerates aging of the small airway epithelium. *Respir Res*. 2014 Sep 24;15:94.
- Walunas TL, Bakker CY, Bluestone JA (1996). CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. *J Exp Med*. 1996 Jun 1;183(6):2541-50.
- Wang JQ, Jeelall YS, Ferguson LL, Horikawa K (2014). Toll-Like Receptors and Cancer: MYD88 Mutation and Inflammation. *Front Immunol*. 2014 Jul 31;5:367.
- Watts C, Powis S (1999). Pathways of antigen processing and presentation. *Rev. Immunogenet*. 1:60.
- Wedzicha JA (2004). Role of viruses in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2004;1:115–120.
- Werb Z, Banda MJ, McKerrow JH, Sandhaus RA (1982). Elastases and elastin degradation. *J Invest Dermatol*. 1982 Jul;79 Suppl 1:154s-159s.
- Wherry EJ, Ahmed R (2004). Memory CD8 T-Cell Differentiation during Viral Infection. *Journal of Virology*. 2004 Jun 1; 78(11):5535–45.
- Whitmire JK, Flavell RA, Grewal IS, Larsen CP, Pearson TC, Ahmed R (1999). CD40-CD40 ligand costimulation is required for generating antiviral CD4 T cell responses but is dispensable for CD8 T cell responses. *J Immunol*. 1999 Sep 15;163(6):3194-201.
- Wikby A, Månsson IA, Johansson B, Strindhall J, Nilsson SE (2008). The immune risk profile is associated with age and gender: findings from three Swedish population studies of individuals 20-100 years of age. *Biogerontology*. 2008 Oct;9(5):299-308.
- Woolhouse IS, Bayley DL, Lator P, Adams DH, Stockley RA (2005). Endothelial interactions of neutrophils under flow in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*, 25 (4) (2005), pp. 612-617

- Woolhouse IS, Bayley DL, Stockley RA (2002). Sputum chemotactic activity in chronic obstructive pulmonary disease: effect of alpha(1)-antitrypsin deficiency and the role of leukotriene B(4) and interleukin 8. *Thorax*. 2002 Aug;57(8):709-14.
- Xu WH, Hu XL, Liu XF, Bai P, Sun YC (2016). Peripheral Tc17 and Tc17/Interferon- γ Cells are Increased and Associated with Lung Function in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Chin Med J (Engl)*. 2016 Apr 20;129(8):909-16.
- Yamamoto C, Yoneda T, Yoshikawa M, Fu A, Tokuyama T, Tsukaguchi K, Narita N (1997). Airway inflammation in COPD assessed by sputum levels of interleukin-8. *Chest*. 1997 Aug;112(2):505-10.
- Yen HR, Harris TJ, Wada S, Grosso JF, Getnet D, Goldberg MV, Liang KL, Bruno TC, Pyle KJ, Chan SL, Anders RA, Trimble CL, Adler AJ, Lin TY, Pardoll DM, Huang CT, Drake CG (2009). Tc17 CD8 T cells: functional plasticity and subset diversity. *J Immunol*. 2009 Dec 1;183(11):7161-8.
- Yeo CJ, Fearon DT (2011). T-bet-mediated differentiation of the activated CD8+ T cell. *Eur J Immunol*. 2011 Jan;41(1):60-6.
- Yewdell JW, Norbury CC, Bennink JR (1999). Mechanisms of exogenous antigen presentation by MHC class I molecules in vitro and in vivo: implications for generating CD8+ T cell responses to infectious agents, tumors, transplants, and vaccines. *Adv. Immunol*. 73:1.
- Zhou R, Tardivel A, Thorens B, Choi I, Tschopp J (2010). Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat. Immunol*. 2010;11:136–140.
- Zhou S, Wright JL, Liu J, Sin DD, Churg A (2013). Aging does not enhance experimental cigarette smoke-induced COPD in the mouse. *PLoS One*. 2013; 8:e71410.
- Zhu X, Gadgil AS, Givelber R, George MP, Stoner MW, Scirba FC, Duncan SR (2009). Peripheral T cell functions correlate with the severity of chronic obstructive pulmonary disease. *J Immunol*. 2009; 182:3270–3277.
- Zizzo G, Hilliard BA, Monestier M, Cohen PL (2012). Efficient clearance of early apoptotic cells by human macrophages requires M2c polarization and MerTK induction. *J Immunol*. 2012 Oct 1;189(7):3508-20.

Rôle du vieillissement et des peptides d'élastine sur la réponse inflammatoire et immunitaire au cours de la Broncho-Pneumopathie chronique Obstructive (BPCO)

La BPCO est une affection de l'appareil respiratoire associée à une réponse inflammatoire chronique. La BPCO associe une bronchite chronique, avec obstruction des voies aériennes, et un emphysème caractérisé par la destruction du parenchyme pulmonaire. Si l'exposition au tabac est le facteur de risque principal de la BPCO, plusieurs observations cliniques sont en faveur du rôle du vieillissement dans la pathogénèse de la maladie. La dégradation des fibres élastiques du poumon en peptides solubles d'élastine (PE) est une caractéristique constante de la BPCO, et le vieillissement physiologique du poumon est associé à une augmentation de son activité élastinolytique. Nous avons montré dans un travail précédent que l'instillation de PE à des souris induit un emphysème aigu. La relation existant entre l'élastolyse et le vieillissement conforte l'hypothèse que le vieillissement pourrait représenter un risque majeur de la BPCO par le biais de production de PE. Le travail de thèse présenté dans ce manuscrit a porté sur l'étude comparative des paramètres histologiques, inflammatoires et immunitaires liés à l'emphysème induit par les PE dans des souris jeunes et des souris âgées. Les résultats obtenus montrent que l'emphysème est d'apparition plus précoce chez les souris âgées et que cette précocité s'accompagne d'une augmentation de la production de PE et de clones T CD28⁻ mémoires spécifiques des PE et du processus d'immunosénescence.

Mots-clés : emphysème murin, vieillissement, peptides d'élastine, lymphocytes

Role of aging and elastin peptides on inflammatory and immune response during Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD)

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a progressive and irreversible inflammatory state of the lung. COPD includes chronic bronchitis, with obstruction of small airways, and emphysema, characterized by the destruction of lung parenchyma. Although cigarette smoke exposure is the best known risk factor for COPD development, several clinical observations support the hypothesis that aging also play a key role in the pathogenesis of COPD. Degradation of lung elastin fibers, generating soluble elastin peptides (EP), is a feature of COPD development, and normal physiological aging of the lung is associated with increased elastolysis. We previously demonstrated in mice that endotracheal instillation of EP resulted in an acute emphysema establishment. The positive association between lung elastin breakdown and aging is consistent with the hypothesis that aging is a major risk factor of COPD through EP production. The work done during this thesis focused on the comparative study of histological, inflammatory and immune parameters related to PE-induced emphysema in young and elderly mice. The results we obtained show that emphysema development is earlier in the elderly mice and that this earliness is associated with an increase of EP-specific CD28⁻ senescent memory T cell clones.

Keywords: murine emphysema, aging, elastin peptides, T lymphocytes

Discipline : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Spécialité : IMMUNOLOGIE

Université de Reims Champagne-Ardenne

IMAB - EA 4683

1 rue du Maréchal Juin, 51098 Reims cedex