Écoles Doctorales Sciences Fondamentales Santé

UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES FONDAMENTALES - SANTÉ N°619

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

FUSELIER ELOÏSE

Le 30 mars 2021

Rôle de l'IL-17 locale dans l'induction de la NETose et l'obstruction pulmonaire au cours la Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO).

Thèse dirigée par **Dr LAMKHIOUED BOUCHAÏB**

JURY

M. **Hamid** MORJANI	Professeur	Université de Reims Champagne Ardennes, France	**Président**
M. Bouchaïb LAMKHIOUED	Maître de Conférences HDR	Université de Reims Champagne Ardennes, France	**Directeur de thèse**
Mme Delphine ALDEBERT	Maître de Conférences HDR	Université de Grenoble, France	**Rapporteur**
M. Mustapha CHAMEKH	Professeur	Université libre de Bruxelles, Belgique	**Rapporteur**
M. Abdelilah Soussi Gounni	Professeur	Université de Manitoba, Canada	**Examinateur**

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr Aldebert Delphine et le Pr Chamekh Mustapha d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail de thèse. Je remercie également le Pr. Morjani Hamid et le Pr. Soussi Gounni Abdelilah d'avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse.

Je remercie le Pr. Le Naour Richard de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire IRMAIC, EA 7509 et de m'avoir fourni les moyens et un environnement favorable pour mener ces recherches à bien. Je remercie également mon directeur de thèse, le Dr Lamkhioued Bouchaïb, de m'avoir confié ce sujet.

Je remercie Sandra Audonnet, ma maman labo pour son aide précieuse en cytométrie en flux mais pas que… Merci de ton soutien, de m'avoir guidé et aidé. Ta bonne humeur et ton humour vont beaucoup me manquer.

Je remercie Mélanie Vittier, ma deuxième maman labo (oui j'ai deux mamans labo, j'ai beaucoup de chance), merci de ton soutien et d'avoir été là lorsqu'il le fallait. Tu as beaucoup fait pour moi.

Je remercie Stéphanie, pour sa gentillesse et nos discussions toujours très intéressantes.

Merci aux thésards qui ont partagé mon bureau. A Flora, pour cette première année de thèse en ta compagnie très agréable et chaleureuse. A Stéphane, d'avoir eu les bons mots et d'avoir partagé mon bureau quelques semaines ce qui nous a permis de nous rendre compte que l'on aimait beaucoup trop la bouffe. Merci à Cédric, pour ta bonne humeur, pour ton écoute et tout ce que tu as apporté au labo et à l'équipe. Je te souhaite d'effectuer de très beaux travaux de thèse auprès de Stéphane et sur cela je n'ai aucun doute. Merci à Sarah, pour ta positivité, ta gentillesse, tes conseils et tous les services rendus en si peu de temps. Fake it until you make it.

Merci à Caro, pour ton soutien sans faille et tes paroles toujours très bienveillantes, reste comme tu es. Je remercie également Seb, Kevin, Delphine, Céline, pour vos conseils en NETose. Je remercie aussi Arnaud, pour m'avoir fait part de ses expériences et fait rêver par la même occasion.

Merci également aux collègues de « la pause café », pour votre bonne humeur. Merci aux collègues des autres lab du 3ème étage avec qui j'ai eu l'occasion d'échanger.

De façon plus personnelle, difficile de mettre des mots sur ce que je ressens lorsque je me dis que je finis (enfin) mes études… J'éprouve à la fois un certain soulagement et à la fois de la nostalgie. La quête du savoir, ma grande curiosité et l'envie de rendre fiers mes parents m'ont menés jusqu'ici. Cela n'a pas toujours été simple mais de toutes ces années d'études et d'expériences en tout genre, je retiendrais que, dans la vie rien est acquis et qu'il faut très

souvent se battre pour obtenir ce que l'on veut. Ce combat bien qu'il ait été souvent singulier, ne s'est pas fait sans le soutien de nombreuses personnes.

Au commencement était l'Amour… cet Amour est celui sans lequel je n'aurais pas existé, celui de mes grands-parents. Je vous remercie donc, bien que vous ne puissiez pas lire ces mots… Mémère et Pépère, j'ai tellement d'admiration pour vous, merci des valeurs que vous avez transmis à vos enfants et petits-enfants… J'espère que de là où vous êtes, vous sentirez toute la gratitude que j'éprouve pour vous. Mamie j'aurais tellement aimé te connaître…

Papa, merci de ton soutien financier au cours de ces longues études, j'espère au moins t'avoir rendu fier. Merci de m'avoir transmis certains traits de caractère qui m'ont aidé à affronter les épreuves de la vie. Maman, Mamoure, je remercie Dieu d'avoir une mère comme toi. Merci d'avoir toujours été là pour moi, de m'avoir apporté autant d'Amour et de tendresse. Merci de m'avoir transmis ces valeurs de tolérance et d'Amour inconditionnel. Je suis bien consciente qu'à ce jour, c'est à moi d'être là pour toi et je le serai.

Aymeric, mon grand frère, je tenais à te dire que je t'admire énormément, je pense que tu es la définition même de la Force et je suis très fière de t'avoir comme grand frère. Merci d'être toi et de me rappeler chaque jour que « ce qui ne te tue pas, te rend plus fort ».

Bérangère, ma grande sœur, merci de ton soutien sans faille tout au long de ma vie, quelle chance j'ai de t'avoir comme grande sœur. Je ne te le dis pas assez mais MERCI d'être la figure forte que tu es et pour tous ce que tu fais pour moi et la famille en général, je n'ai jamais vu un cœur aussi généreux que le tien.

Un grand merci, à ma famille, vous êtes très nombreux, je ne pourrais pas tous vous citer. Cependant je tiens particulièrement à remercier Jeremy et Manuela, merci de m'avoir accueilli durant mes études en Immunologie à Paris, sans lesquelles je n'aurais surement pas eu l'opportunité d'effectuer une thèse dans ce domaine. Merci à mes cousines/cousins, vous êtes comme mes sœurs/frères, merci d'avoir été là dans tous les moments de ma vie plus ou moins heureux.

A mes amies, Auré, Maé, Nono, Ané, Tasia et Carole, merci pour votre soutien moral ainsi que votre soutien matériel, vous m'avez permis de relativiser, reconsidérer certaines choses et vous m'avez souvent rappelé d'avoir confiance en moi.

Je remercie Dieu, d'avoir enlevé certaines personnes de ma vie pour en laisser d'autres entrer, et qui je l'espère resteront indéfiniment auprès de moi et me feront devenir quelqu'un de meilleur.

Je finis ces remerciements par les deux personnes qui m'ont donné mes plus grandes leçons de vie, mes neveux. Vous n'avez même pas le tiers de mon âge et pourtant vous m'avez appris tellement de chose. Noham, notre première rencontre m'a fait découvrir ce qu'était le véritable Amour, celui qui est inconditionnel, inintéressé et pure. Merci mon Nono. Thélyo, merci de cette leçon de courage et de ténacité que tu m'as donné lorsqu'à ton si jeune âge tu as du mener un combat hors norme. Mes très chères neveux, continuez à grandir et me rappeler chaque jour que la vie passe vite mais qu'elle vaut vraiment la peine d'être vécue et appréciée à sa juste valeur. Que Dieu vous bénisse et vous protège.

TABLE DES MATIÈRES

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr Aldebert Delphine et le Pr Chamekh Mustapha d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail de thèse. Je remercie également le Pr. Morjani Hamid et le Pr. Soussi Gounni Abdelilah d'avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse.

Je remercie le Pr. Le Naour Richard de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire IRMAIC, EA 7509 et de m'avoir fourni les moyens et un environnement favorable pour mener ces recherches à bien. Je remercie également mon directeur de thèse, le Dr Lamkhioued Bouchaïb, de m'avoir confié ce sujet.

Je remercie Sandra Audonnet, ma maman labo pour son aide précieuse en cytométrie en flux mais pas que… Merci de ton soutien, de m'avoir guidé et aidé. Ta bonne humeur et ton humour vont beaucoup me manquer.

Je remercie Mélanie Vittier, ma deuxième maman labo (oui j'ai deux mamans labo, j'ai beaucoup de chance), merci de ton soutien et d'avoir été là lorsqu'il le fallait. Tu as beaucoup fait pour moi.

Je remercie Stéphanie, pour sa gentillesse et nos discussions toujours très intéressantes.

Merci aux thésards qui ont partagé mon bureau. A Flora, pour cette première année de thèse en ta compagnie très agréable et chaleureuse. A Stéphane, d'avoir eu les bons mots et d'avoir partagé mon bureau quelques semaines ce qui nous a permis de nous rendre compte que l'on aimait beaucoup trop la bouffe. Merci à Cédric, pour ta bonne humeur, pour ton écoute et tout ce que tu as apporté au labo et à l'équipe. Je te souhaite d'effectuer de très beaux travaux de thèse auprès de Stéphane et sur cela je n'ai aucun doute. Merci à Sarah, pour ta positivité, ta gentillesse, tes conseils et tous les services rendus en si peu de temps. Fake it until you make it.

Merci à Caro, pour ton soutien sans faille et tes paroles toujours très bienveillantes, reste comme tu es. Je remercie également Seb, Kevin, Delphine, Céline, pour vos conseils en NETose. Je remercie aussi Arnaud, pour m'avoir fait part de ses expériences et fait rêver par la même occasion.

Merci également aux collègues de « la pause café », pour votre bonne humeur. Merci aux collègues des autres lab du 3ème étage avec qui j'ai eu l'occasion d'échanger.

De façon plus personnelle, difficile de mettre des mots sur ce que je ressens lorsque je me dis que je finis (enfin) mes études… J'éprouve à la fois un certain soulagement et à la fois de la nostalgie. La quête du savoir, ma grande curiosité et l'envie de rendre fiers mes parents m'ont menés jusqu'ici. Cela n'a pas toujours été simple mais de toutes ces années d'études et d'expériences en tout genre, je retiendrais que, dans la vie rien est acquis et qu'il faut très

souvent se battre pour obtenir ce que l'on veut. Ce combat bien qu'il ait été souvent singulier, ne s'est pas fait sans le soutien de nombreuses personnes.

Au commencement était l'Amour… cet Amour est celui sans lequel je n'aurais pas existé, celui de mes grands-parents. Je vous remercie donc, bien que vous ne puissiez pas lire ces mots… Mémère et Pépère, j'ai tellement d'admiration pour vous, merci des valeurs que vous avez transmis à vos enfants et petits-enfants… J'espère que de là où vous êtes, vous sentirez toute la gratitude que j'éprouve pour vous. Mamie j'aurais tellement aimé te connaître…

Papa, merci de ton soutien financier au cours de ces longues études, j'espère au moins t'avoir rendu fier. Merci de m'avoir transmis certains traits de caractère qui m'ont aidé à affronter les épreuves de la vie. Maman, Mamoure, je remercie Dieu d'avoir une mère comme toi. Merci d'avoir toujours été là pour moi, de m'avoir apporté autant d'Amour et de tendresse. Merci de m'avoir transmis ces valeurs de tolérance et d'Amour inconditionnel. Je suis bien consciente qu'à ce jour, c'est à moi d'être là pour toi et je le serai.

Aymeric, mon grand frère, je tenais à te dire que je t'admire énormément, je pense que tu es la définition même de la Force et je suis très fière de t'avoir comme grand frère. Merci d'être toi et de me rappeler chaque jour que « ce qui ne te tue pas, te rend plus fort ».

Bérangère, ma grande sœur, merci de ton soutien sans faille tout au long de ma vie, quelle chance j'ai de t'avoir comme grande sœur. Je ne te le dis pas assez mais MERCI d'être la figure forte que tu es et pour tous ce que tu fais pour moi et la famille en général, je n'ai jamais vu un cœur aussi généreux que le tien.

Un grand merci, à ma famille, vous êtes très nombreux, je ne pourrais pas tous vous citer. Cependant je tiens particulièrement à remercier Jeremy et Manuela, merci de m'avoir accueilli durant mes études en Immunologie à Paris, sans lesquelles je n'aurais surement pas eu l'opportunité d'effectuer une thèse dans ce domaine. Merci à mes cousines/cousins, vous êtes comme mes sœurs/frères, merci d'avoir été là dans tous les moments de ma vie plus ou moins heureux.

A mes amies, Auré, Maé, Nono, Ané, Tasia et Carole, merci pour votre soutien moral ainsi que votre soutien matériel, vous m'avez permis de relativiser, reconsidérer certaines choses et vous m'avez souvent rappelé d'avoir confiance en moi.

Je remercie Dieu, d'avoir enlevé certaines personnes de ma vie pour en laisser d'autres entrer, et qui je l'espère resteront indéfiniment auprès de moi et me feront devenir quelqu'un de meilleur.

Je finis ces remerciements par les deux personnes qui m'ont donné mes plus grandes leçons de vie, mes neveux. Vous n'avez même pas le tiers de mon âge et pourtant vous m'avez appris tellement de chose. Noham, notre première rencontre m'a fait découvrir ce qu'était le véritable Amour, celui qui est inconditionnel, inintéressé et pure. Merci mon Nono. Thélyo, merci de cette leçon de courage et de ténacité que tu m'as donné lorsqu'à ton si jeune âge tu as du mener un combat hors norme. Mes très chères neveux, continuez à grandir et me rappeler chaque jour que la vie passe vite mais qu'elle vaut vraiment la peine d'être vécue et appréciée à sa juste valeur. Que Dieu vous bénisse et vous protège.

REMERCIEMENTS 1
TABLE DES MATIÈRES 3
LISTE DES FIGURES : 7
LISTE DES TABLEAUX : 7
LISTE DES ABREVIATIONS 8
INTRODUCTION 10
I. La broncho-pneumopathie chronique obstructive 11
1. Définition et épidémiologie 11
2. Étiologie et facteurs de risque 12
a) Les facteurs individuels 12
b) Les facteurs environnementaux 13
3. La physiopathologie de la BPCO. 14
a) Anatomie du système respiratoire 14
b) Initiation de l'inflammation 15
c) Remodelage de l'épithélium bronchique 16
d) Obstruction pulmonaire 18
e) Destruction du parenchyme pulmonaire 19
4. Exacerbation 20
a) Exacerbation de la BPCO d'origine virale 20
b) Exacerbation de la BPCO d'origine bactérienne 21
c) Exacerbation de la BPCO d'origine non-infectieuse 22
5. Conséquence pour le malade et prise en charge 22
II. L'immunité dans la BPCO 23
1. La réponse immunitaire innée 23
a) Les cellules épithéliales bronchiques 23
b) Les macrophages alvéolaires 24
c) Les polynucléaires neutrophiles 25
d) Les cellules lymphoïdes innées 26
2. La transition vers l'immunité adaptative 28
a) Les cellules dendritiques 29
3. La réponse immunitaire adaptative 29
a) Lymphocytes T 30
b) Lymphocytes B 31
4. Auto-immunité et environnement cytokinique 31
a) L'auto-immunité dans la BPCO 31
b) Les médiateurs de l'inflammation de la BPCO 32
III. Les polynucléaires neutrophiles 37
1. Granulopoïèse neutrophile 37
2. Diversité des PMNs 38
a) Hétérogénéité dans la moelle osseuse 38
b) Hétérogénéité dans le sang 38
c) Hétérogénéité et rôle des PMNs dans les maladies 39
3. Rôle dans l'inflammation 42
a) Recrutement au site de l'infection et activation 42
b) Phagocytose 44
c) Granules et dégranulation 45
d) NETose 47

4. Armes de défense 47
a) Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) 47
b) Les peptides antimicrobiens 48
5. Résolution de l'inflammation 50
IV. La cytokine IL-17 51
1. La famille des cytokines IL-17 51
2. Récepteurs à l'IL-17 et voie de signalisation 52
a) Les différents récepteurs 52
b) Distribution et régulation 52
c) Voie de signalisation 53
d) Sources et cibles de l'IL-17 54
3. Le lymphocyte Th17 55
a) Différentiation des cellules Th17 55
b) Fonctions effectrices des cellules Th17 dans la maladie 57
c) L'IL-17 dans le recrutement des PMNs 60
d) L'IL-17 dans la BPCO 61
V. Le Virus Respiratoire Syncitial 63
1. Le VRS : agent principal associé à la bronchiolite 63
2. Le cycle infectieux du VRS 64
a) Attachement 64
b) Fusion 65
c) Transcription 65
d) Assemblage et bourgeonnement 65
3. Structure des protéines virales du VRS et récepteurs principaux 66
a) Structure de la protéine G d'attachement du VRS 66
b) Structure de la protéine de fusion du VRS 67
c) Les récepteurs du VRS 67
4. Physiopathologie du VRS 68
a) Obstruction des voies respiratoires inférieures 68
b) Exacerbation par le VRS des maladies respiratoires préexistantes 69
5. Réponse immunitaire contre le VRS 71
a) Réponse immunitaire innée 71
b) IL-17 et VRS 72
c) Réponse immunitaire adaptative 74
6. Stratégies thérapeutiques antivirales 75
VI. La NETose 77
1. Découverte et définition 77
2. Structure des NETs 78
3. Mécanisme de la NETose 79
a) Inducteur de la NETose 80
b) La NETose dépendante de la voie Nox 80
c) La NETose indépendante de la voie Nox 81
d) La NETose vitale 83
4. ETosis 84
a) Eosinophiles 84
b) Basophiles 85
c) Mastocytes 85
d) Monocytes et Macrophages 86
5. Effets bénéfiques des NETs 87

a) La séquestration des pathogènes 88
b) La destruction des pathogènes 88
c) L'inactivation des facteurs de virulence 89
d) Signaux de danger 89

6. Implication physiopathologique 90
a) Effets cytotoxiques des NETs 90
b) NETose et maladies thrombotiques 91
c) Role des NETs dans le cancer 92
d) La NETose associée aux maladies auto-immunes 93
e) Rôle des NETs dans les pathologies pulmonaires 94

BUT DU TRAVAIL 97

MATERIELS ET METHODES 100

RESULTATS 108

DISCUSSION et PERSPECTIVES 120

CONCLUSION 127

REFERENCES 130

LISTE DES FIGURES :

Figure 1 : Anatomie du système pulmonaire..... 15
Figure 2 : Principaux types cellulaires de l'épithélium pulmonaire..... 16
Figure 3 : Composition de l'épithélium bronchique du sujet sain et sujet atteint de la BPCO.18
Figure 4 : Schéma représentatif des caractéristiques physiopathologiques de la BPCO……..19
Figure 1 : Les différents groupes d'ILC. Source : Hergen Spits, fevrier 2013…….27
Figure 6 : Réactions chimiques du stress oxydatif.……33
Figure 7 : Les différents stades cellulaires de la granulopoïèse. 37
Figure 8 : Schéma de la migration transendotheliale.. 44
Figure 9 : Les différentes IL-17 et leurs récepteurs. 51
Figure 10 : Schéma du récepteur à l'IL-17A et des voies de signalisation activées 54
Figure 11 : Représentation schématique du VRS. 64
Figure 12 : Image en microscopie electronique à balayage en haute résolution de NETs..... 78
Figure 13 : Voies de signalisation de la NETose..... 83
Figure 14 : NETose suicidaire et NETose "vitale" 84
Figure 15 : Microscopie à fluorescence de neutrophile en présence de RSV fluorescent 96
Figure 16 : Schéma du dispositif permettant le génération du CSE 102
Figure 17 : Méthode de quantification par l'application d'Image J..... 105
Figure 18 : Cytographes illustrant les résultats des phénotypes des récepteurs à l'IL-17 sur les PMNs en sang total. 109
Figure 19 Cytographes illustrant les résultats des phénotypes des récepteurs à l'IL-17 sur les PMNs isolés..... 110
Figure 20 : Analyse des produits de RT-PCR par electrophorèse sur gel d'agarose et révélé avec le BET.. 111
Figure 21 : Rapport des médianes de fluorescence de l'APC couplé aux anticorps dirigés contre les récepteurs de l'IL-17 sur les PMNs isolés par MACSxpress puis primés avec du TNF-α 112
Figure 22 :Image de microscopie des PMNs dans différentes conditions de stimulation 113
Figure 23 : Etude de la NETose des PMNs isolés induite par l'IL-17A avec quantification par imagerie. 114
Figure 24 : Graphique representant les résultats de quantification de l'ADN relargué par les NETs après digestion par la Mnase..... 115
Figure 25 : Graphique représentant le rapport de la concentration de l'ADN issus des PMNs stimulés avec le CSE (0,5 et 1,5%) combiné ou non avec l'IL-17A (50ng/mL) avec la concentration d'ADN libéré par les PMNs non stimulés. 116
Figure 26 : Graphique illustrant la quantification de l'ADN relargué dans le surnageant suite au traitement des NETs avec la Mnase sur les PMNs isolés, primés ou non avec du TNF-α (20ng/mL) pendant 1 heure et stimulés durant 3 heures avec de l'IL-17A recombinante à différentes concentrations 117
Figure 27 : Image des PMN isolés et stimulés avec différentes concentrations de Protéine G recombinante du VRS puis colorés avec du DAPI (bleu) et du sytox (rouge) afin de révèler la présence des NETs. 118
Figure 28 : Quantification de l'ADN relargué dans le surnageant suite au traitement des NETs avec la Mnase sur les PMNs isolés et stimulés durant 4 heures avec la protéine G recombinante du VRS a différente concentration..... 118
Figure 29 : Image de microscopie à fluorescence des PMNs stimulés avec la sG en combinaison avec le CSE ou l'IL-17A. 119

LISTE DES TABLEAUX :

Tableau 1 Classification de la BPCO selon le GOLD (adaptée de www.cep.splf.fr)..... 12
Tableau 2 : Differents inducteurs de la NETose..... 87

LISTE DES ABREVIATIONS

AAT : alpha 1 anti-trypsine
ADN : acide désoxyribonucléique
ANCA : anticorps anticytoplasme des polynucléaires neutrophiles
APC : allophycocyanine
APRIL : proliferation-inducing ligand
ARN : acide ribonucléique
BAFF : B-cell activzting factor
BPCO : broncho-pneumopathie chronique obstructive
BPI : bactericidal/permeability-increasing protein
C/EBP : CCAAT-enhancer-binding proteins
cAMP : "adénosine monophosphate cyclique »
CAP37 : « cationic antimicrobial protein of 37 kd »
CD : cellule dendritique
CG : cathépsine G
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
CPA : cellule présentatrice d'antigène
CS : « cigarette smoke »
CTEPH : hypertension pulmonaire thromboembolique chronique
Ctla8 : IL-17
CVF : capacité vitale forcée
DAMP : « *Damage Associated Molecular Pattern* »
DNase : Désoxyribonucléase
DNP : Dinitrophenol
EAE : « Experimental autoimmune encephalomyelitis »
EDTA : Éthylènediaminetétraacétique
EGF : « *epidermal growth factor* »
ERK : "Extracellular signal-regulated kinases"
FEV : volume expiratoire forcé
FGF : « fibroblast growth factors »
fMLF : N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine
FRO : formes réactives de l'oxygène
GAG : glycosaminoglycane
G-CSF : Facteur de stimulation des colonies de granulocytes
GM-CSF : Facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages
GOLD : «*Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*»
HBD: human beta defensin
hCAP-18 : "Human cathelicidin 18"
HS : "heparan sulfate"
iCOS : "Inducible T-cell COStimulator"
IKKi : "I-kappa-B kinase inhibitor"
IL : Interleukine
ILC : « *innate lymphoid cell* »
IRF4 : "Interferon Regulatory Factor 4"
JNK : "c-Jun N-terminal kinases"
LBA : lavage broncho-alvéolaire
LCR : liquid céphalo-rachidien
LES : lupus érythémateux systémique
LPS : lipopolysaccharide
LB : lymphocyte B
LT : lymphocyte T
LTFh : Lymphocytes T Follicular helper
MICI : Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
MMP : matrix metalloprotéinase
MO : moelle osseuse
MPO : myelopexorydase
MUC : mucin
NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NE : « neutrophil elastase » élastase des neutrophiles
NEK : « NIMA related kinases »
NET : « *neutrophil extracellular trap* »
NF-κB : "nuclear factor-kappa B"
NGAL : "neutrophil gelatinase-associated lipocalin"
NK : « natural killer »
Nox : « NADPH oxydase »
NSP : « non-structural protein »
OMS : Organisation mondiale de la Santé
PAD4 : « Protein arginine deiminase 4 »
PAF : paraformaldehyde
PBS : tampon phosphate salin
PCR : « polymerase chain reaction »
pDC : cellules dendritiques plasmacytoïdes
PDL-1 : "PD-1 ligand"
PGE2 : « Prostaglandin E2 »
PI3K : « Phosphoinositide 3-kinase »
PMA : phorbol 12-myristate 13- acétate
PMN : polymorphonucléaire
PR3 : protéinase 3
PRR : « Pattern recognition receptor »
RNP : ribonucléoprotéine

RORγt : “RAR-related orphan receptor gamma”
ROS : Reactive oxygen species
RT-PCR : « reverse transcriptase polymerase chain reaction »
RvE1 : Resolvin E1
SDRA : syndrome de détresse respiratoire aigue
SEP : sclérose en plaque
STAT : « Signal Transducers and Activators of Transcription
TAN : “Tumor associated neutrophil”
TBK1 : “TANK-binding kinase 1”
TLR : « toll like receptor »
TNF : « tumor necrosis factor »
TRAF : “TNF receptor associated factor”
TRALI : « transfusion-related acute lung injury » syndrome de détresse respiratoire aigu post-transfusionnel
TSLP : lymphopoïétine stromale thymique
VEMS : Volume expiratoire maximal par seconde
VIH : virus de l’immunodéficience humaine
VRS : virus respiratoire syncytial

INTRODUCTION

I. La broncho-pneumopathie chronique obstructive

1. Définition et épidémiologie

La broncho-pneumopathie chronique obstructive, ou BPCO, est définie de façon générale comme étant une maladie inflammatoire chronique localisée au niveau pulmonaire. Le comité international GOLD (Global Initiative for chronic obstructive lung disease) définie cette pathologie comme étant une maladie courante, évitable et traitable, caractérisée par des symptômes respiratoires persistants et une limitation des échanges gazeux[1]. Le GOLD a défini 5 stades de la maladie établis en fonction des paramètres cliniques observés chez les patients. Parmi ces paramètres figurent les mesures de VEMS (Volume Expiratoire Maximal à la première Seconde) et de CVF (Capacité Vitale Forcée) tous deux déterminés par la spirométrie et qui reflètent les capacités respiratoires. A partir de ces deux valeurs le rapport VEMS/CVF est calculé. Ce rapport ainsi que l'évaluation des symptômes tels que la toux et les expectorations sont alors utilisés pour déterminer le stade de la BPCO (**Tableau 1**). Selon le dernier rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) datant de 2004, la BPCO concernait 64 millions de personnes et 3 millions de personnes en sont mortes[2]. En 2010, la région qui comptait le plus de décès des suites de cette maladie est l'Asie du sud (notamment l'Inde, le Pakistan, l'Afghanistan et la Chine)[3]. L'OMS estime que la BPCO deviendra la troisième cause mondiale de décès en 2030[2].

La limitation des capacités respiratoires est due à l'obstruction des voies aériennes causée par une inflammation chronique anormale suite à l'exposition répétée à des particules et aux gaz nocifs[1]. Cette maladie s'installe progressivement. L'épithélium respiratoire subit un remodelage, engendrant une hyper-sécrétion de mucus, qui une fois accumulé dans les bronches les obstrue, empêchant les échanges gazeux[4]. L'inflammation chronique va également entrainer une atrophie des cellules musculaires lisses ainsi qu'un épaississement de la paroi des bronches, et conduire à une perte de leur élasticité, diminuant les capacités pulmonaires[5]. Cette inflammation persistante peu conduire dans les formes les plus sévère de la maladie à la destruction irréversible du parenchyme pulmonaire, engendrant un emphysème[6].

D'après une étude épidémiologique menée en 2010, la France présentait une prévalence de 7,5 % pour la BPCO[7]. Toutefois, la prévalence est difficile à évaluer, car la maladie est sous-diagnostiquée à cause d'une banalisation des premiers symptômes chez les fumeurs[1]. La prévalence de la BPCO en France figure parmi les plus basses d'Europe[8]. L'incidence chez

l'homme semble se stabiliser, tandis que chez la femme, elle est en constante augmentation. Cette augmentation est probablement due aux changements d'habitudes tabagiques. Des variations de taux de mortalité ont été également observées entre différentes régions en France. Ainsi, certaines régions comme celle du Nord (Nord et Pas-de- Calais), de l'Est (Lorraine et Alsace) et de l'Ouest (principalement en Bretagne) sont plus touchées et d'autres comme la Guadeloupe, la Martinique et la Guyane le sont moins[7].

Stade de la BPCO	Caractéristiques Cliniques
Gold 0 : à risque	Spirométrie normale Symptômes chroniques tels que la toux et les expectorations
GOLD 1 : BPCO débutante	VEMS / CVF < 70% VEMS > ou égale 80% des valeurs prédites Obstruction bronchique légère
GOLD 2 : BPCO modérée	VEMS / CVF < 70% VEMS entre 50% et 80% des valeurs prédites Obstructions brochiques modérée
Gold 3 : BPCO sévère	VEMS / CVF < 70% VEMS entre 30% et 50% des valeurs prédites Obstructions bronchiques sévère
Gold 4 : BPCO très sévère	VEMS / CVF < 70% VEMS < 30% des valeurs prédites ou VEMS < 50% des valeurs prédites Obstruction bronchique très sévère

Tableau 1 Classification de la BPCO selon le GOLD (adaptée de www.cep.splf.fr)

2. Étiologie et facteurs de risque

La BPCO compte plusieurs facteurs de risque qui peuvent être classés en deux parties, les facteurs liés à l'hôte ou individuels et les facteurs environnementaux.

a) Les facteurs individuels

Parmi les facteurs individuels figurent les prédispositions génétiques. Ainsi, le déficit de l'inhibiteur de sérine protéase alpha-1 anti-trypsine (AAT) est identifié à l'heure actuelle comme étant la seule anomalie génétique liée à la BPCO. Cette mutation cause un déséquilibre de la balance protéase/anti-protéase conduisant à la destruction du parenchyme pulmonaire et par la suite à la BPCO[9].

Des études plus récentes ont également identifié certaines mutations génétiques comme étant associées au risque de développer une BPCO, notamment le polymorphisme du promoteur du TNF-α (Facteur de Nécrose Tumorale alpha)[10], et celui du récepteur β2-adrenergic (récepteur couplé aux protéines G) induisant une diminution de l'expression de ce dernier dans les cellules musculaires lisses [11]. Des études génétiques menées sur les mucines

sécrétoires des cellules épithéliales des voies respiratoires ont révélé également une association entre la longueur d'un des gènes satellites de MUC8, codant pour la mucine secrétée au niveau pulmonaire, et le risque de développer une BPCO[12]. Ces résultats constituent un nouvel espoir pour le diagnostic de la maladie bien qu'ils méritent d'être confirmés.

Les épisodes d'infections respiratoires durant l'enfance semblent également être un facteur de risque pour développer cette maladie. Certaines infections respiratoires durant l'enfance entraînent une diminution des fonctions respiratoires et augmentent le risque de développer une BPCO[13]. Ce risque est plus élevé chez les enfants prématurés qui présentent des problèmes respiratoires dès la naissance[14]. Il a été démontré en effet que la prématurité est à l'origine de symptômes respiratoires et que les fonctions respiratoires (CVF et FEV) diminuent surtout lorsque le nouveau-né est de faible poids. Ces derniers présentent fréquemment une dysplasie broncho-pulmonaire avec une toux chronique, une respiration sifflante ainsi qu'une obstruction des voies aériennes[14]. A l'âge adulte, l'obstruction irréversible des voies aériennes peut contribuer au développement d'une BPCO[14].

b) Les facteurs environnementaux

Le facteur de risque majeur, est le tabagisme[15]. Celui-ci peut être passif ou actif lors de la consommation de cigarette, de cigare ou de tabac à chiquer. Le tabagisme passif consiste à l'exposition aux fumées de cigarette de manière involontaire tandis que le tabagisme actif consiste en l'inhalation direct de la fumée lors de la consommation du tabac. A noter que la cigarette est constituée de nombreux composants toxiques comme la nicotine, les produits de combustions tels que le monoxyde de carbone et les radicaux libres[16]. Ces substances vont induire une inflammation et un remodelage des voies pulmonaires[17].

Durant l'exposition passive à la fumée, le tabagisme de la mère lors de la gestation peut provoquer un mauvais développement du fœtus. Cette consommation entraîne des risques d'un développement pulmonaire anormale qui peut évoluer vers une BPCO[18]. De même, l'exposition à la fumée de cigarette durant l'enfance ou l'âge adulte augmente les risques de développer la maladie[19]. Quant-au tabagisme actif, il augmente considérablement les risques de développer une BPCO (15 à 50% des fumeurs développeront la maladie)[20,21]. Des études récentes, ont montré qu'en 2017, 37% des patients décédés suite à une BPCO étaient des fumeurs actifs[22].

D'autres fumées émanant de la combustion du gaz manufacturé pour l'usage domestique, contribuent à la pollution de l'air intérieur et constituent également un facteur de risque[15]. De même dans le cas de certains métiers dits « à risque », l'exposition répétée aux polluants industriels, aux particules métalliques, aux particules fines et aux polluants organiques peut induire le développement de maladies respiratoires comme la BPCO.

La pollution atmosphérique, liée aux gaz d'échappement des véhicules et des industries est également un facteur de risque. L'Inde, l'un des pays les plus pollués, possède un pourcentage de décès des suite de la BPCO de 9,7%, ce qui classe cette maladie en deuxième position des causes décès dans ce pays[23].

3. La physiopathologie de la BPCO.

La BPCO est une maladie qui s'installe progressivement au sein de l'appareil respiratoire. Elle débute par une inflammation chronique localisée, conduisant peu à peu au remodelage et à la dégradation du parenchyme pulmonaire. C'est une maladie des voies respiratoires basses, c'est-à-dire au niveau des bronchioles.

a) Anatomie du système respiratoire

L'appareil respiratoire, appelé également système respiratoire, est composé des voies aériennes supérieures et des voies broncho-pulmonaires, séparées par le larynx. Les voies aériennes supérieures sont composées du nez, des sinus, du nasopharynx et de la trachée. Le rôle de ces voies aériennes supérieures est de pré-conditionner l'air au contact de la muqueuse. Lorsque l'air pénètre au niveau de la fausse nasale, il y est réchauffé, humidifié et filtré. La filtration de l'air s'effectue grâce aux poils présents sur les fosses nasales qui capturent les particules et une partie des microbes. L'air pénètre ensuite dans la trachée pour rejoindre les voies aériennes inférieures et continue à être filtré, réchauffé et humidifié. La trachée, formée d'une armature cartilagineuse, se divise en deux bronches principales (droite et gauche). Chacune des bronches se subdivise dans chaque poumon jusqu'à la formation de bronchioles puis en lobules constitués d'alvéoles. Le poumon abrite près de 350 millions d'alvéoles. Les poumons reposent sur le diaphragme. Lorsque l'air arrive dans les alvéoles, il est traité par le poumon périphérique, au niveau des lobules pulmonaires qui constituent les unités physiologiques du poumon où s'effectuent les échanges gazeux (O_2, N_2, CO_2) (Figure 1).

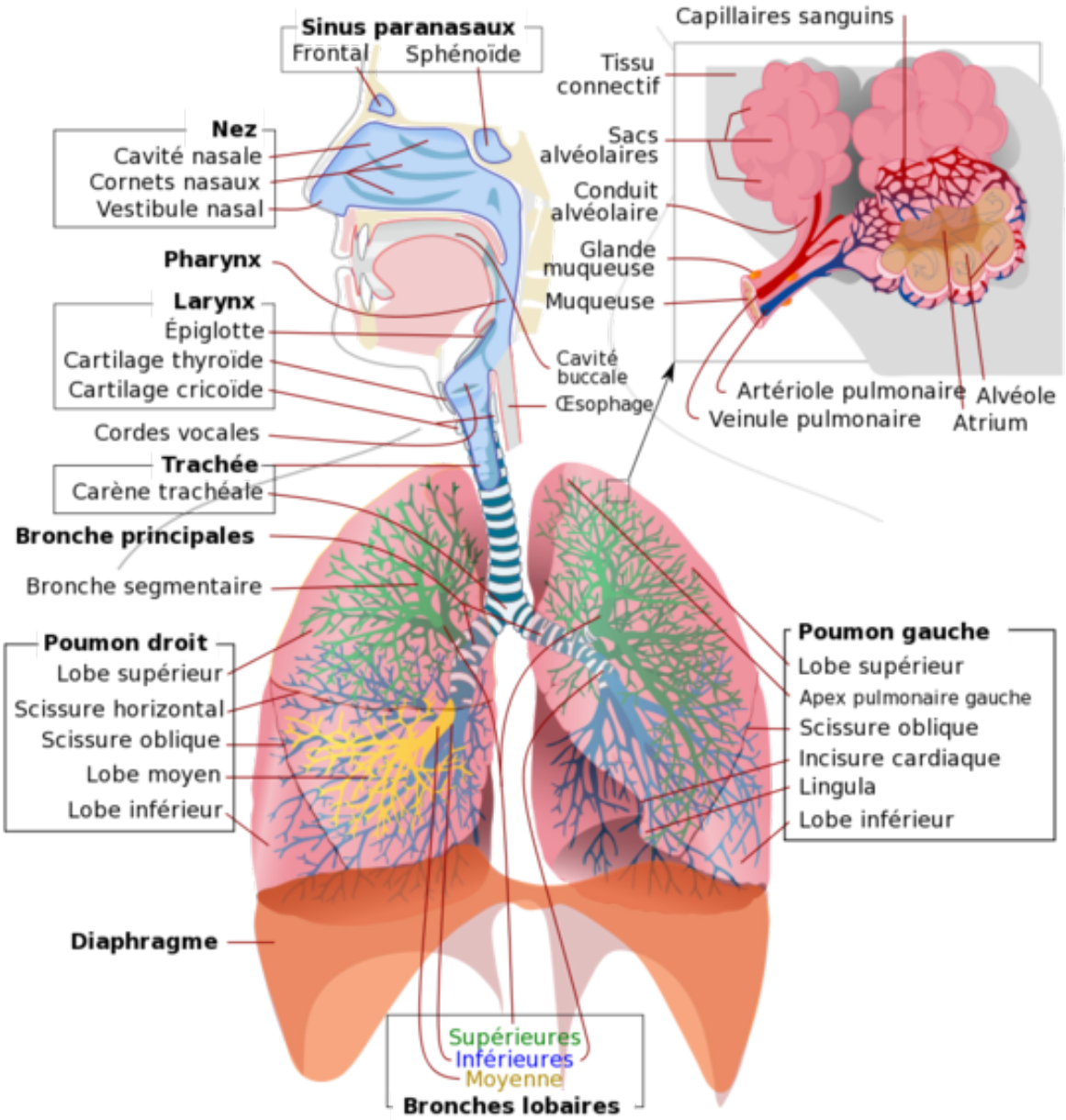

Figure 2 : Anatomie du système pulmonaire

(source : https://wikimedi.ca/wiki/Pneumologie#/media/Fichier:Système_respiratoire_(schéma).svg)

b) Initiation de l'inflammation

Les cellules épithéliales, lorsqu'elles sont agressées par des substances nocives contenues dans la fumée de la cigarette ou les microparticules, vont secréter des médiateurs inflammatoires comme le TNF-α, l'IL-1β, l'IL-6, le GM-CSF et l'CXCL8/IL-8[24,25]. Grâce à ces cytokines, les cellules épithéliales participent au recrutement des polynucléaires neutrophiles (PMN) et des macrophages au sein du parenchyme pulmonaire[25]. Ces cellules de l'immunité innée vont à leur tour répondre en libérant des ROS (espèces réactives de

l'oxygène) et des protéases[26]. Cette sécrétion accrue des protéases, va engendrer un déséquilibre de la balance protéases/anti-protéases en faveur des protéases qui va contribuer à l'agression de l'épithélium bronchique et à l'entretien de l'inflammation[27]. L'infiltrât inflammatoire dans les voies respiratoires est le premier signe histologique anormal observé chez les patients BPCO[28]. Cette inflammation va perdurer dans le temps et s'établir en une inflammation chronique suite à la transition de l'immunité innée vers une immunité adaptative.

c) Remodelage de l'épithélium bronchique

L'épithélium bronchique est pseudostratifié et constitue une barrière (figure 2). Il est composé de cellules ciliées, de cellules en gobelet mucipare, de cellules sécrétrices non-muqueuses appelées cellules de Clara et cellules basales reposants sur la membrane basale [29]. Parmi les cellules basales figurent les cellules progénitrices qui vont se multiplier et se différencier afin de maintenir l'intégrité de l'épithélium. Ces dernières reposent sur le chorion composé de fibres de collagène, de vaisseaux sanguins, de cellules immunitaires et de fibroblastes. Les couches de cellules assemblées par des jonctions serrées permettent d'empêcher l'entrée des substances nocives et des pathogènes dans l'organisme[29]. Les cellules mucipares produisent du mucus qui permet de limiter le contact direct entre les pathogènes et l'épithélium. Les cellules Clara vont secréter le surfactant pulmonaire indispensable aux fonctions respiratoires et à la défense contre les pathogènes[29]. Les cellules ciliées participent à la clairance mucociliaire limitant, par battement des cils, la stagnation du mucus et favorisent l'élimination des pathogènes.

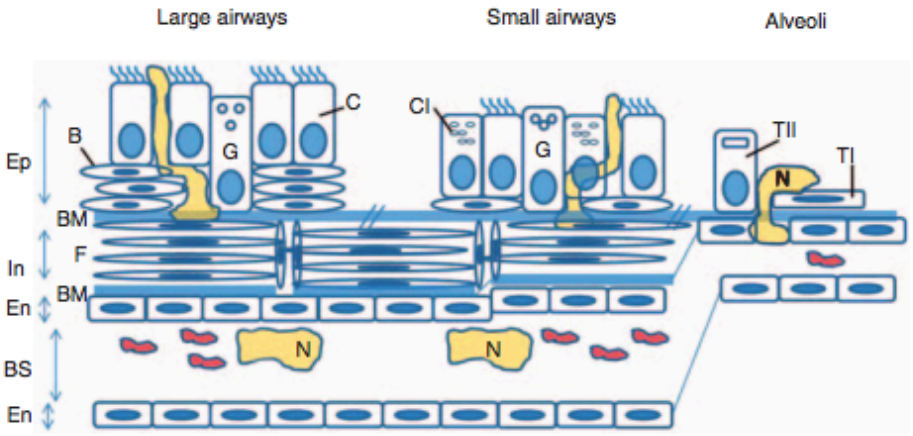

Figure 3 : Principaux types cellulaires de l'épithélium pulmonaire

Dans les grandes voies respiratoires, les principaux types de cellules sont les cellules ciliées cylindriques (C), les cellules de gobelet (G) et les cellules basales (B). Dans les petites voies

respiratoires, les types de cellules sont similaires avec relativement plus de cellules de Clara (Cl). L'endothélium (En) sépare l'épithélium (Ep) de la circulation sanguine (BS). À mesure que les petites voies respiratoires fusionnent avec l'épithélium alvéolaire, les cellules de type I (TI) et de type II (TII) deviennent prédominantes. Les cellules immunitaires telles que les neutrophiles migrent du sang vers l'espace aérien en passant par l'endothélium, la membrane basale endothéliale (BM), les tissus interstitiels (In) contenant des fibroblastes de type I (F) (parallèles à l'épithélium) et le myofibroblaste de type II (perpendiculaire) à l'épithélium), et enfin à travers l'épithélium via une série d'interactions ligand-récepteur discutées dans le texte. Une variété de types cellulaires moins courants tels que les cellules cartilagineuses et les cellules neuroendocrines ne sont pas représentées. Source : Tam et Al, Mars 2011[29].

Au cours de la BPCO, l'épithélium subit des remodelages, observés aux stades les plus précoces de la maladie (figure 3). Ce remodelage se manifeste par une hyperplasie des cellules en gobelet entrainant une hypersécrétion de mucus, une métaplasie malpighienne, une diminution du nombre de cellules ciliées et une diminution du nombre de cellules Clara. Ces changements sont accompagnés d'une perte des jonctions intercellulaires indirectement induite par les ROS[30]. Cette perte impacte la fonction primordiale de barrière de l'épithélium bronchique et une hyperplasie des cellules basales est également présente dès les stades précoces de la maladie. Les cellules ciliées y participent en secrétant de l'EGF en réponse à la fumée de cigarette[31]. Les cellules basales, exprimant fortement le récepteur à l'EGF (EGFR), vont alors être stimulées, proliférer et changer de phénotype. Les cellules basales de patient BPCO présentent des changements au niveau transcriptomique[32]. Il a été notamment observé *in vitro* que la stimulation des cellules basales entraîne une diminution de l'expression des gènes liés à la genèse des cils (FOXJ1) et une augmentation de l'expression des gènes liés à la transition épithelio-mesenshymateuse tel que VIM[31] contribuant au remodelage de l'épithélium. Ces modifications géniques vont alors favoriser la différenciation en cellules squameuse, l'hyperplasie des cellules basales et la diminution du nombre des autres types cellulaires constituants l'épithélium. Ces modifications sont également accompagnées d'un changement morphologique, passant de la forme cubique à la forme pavimenteuse lorsqu'elles sont stimulées[31]. Ces changements phénotypiques, observés *in vitro* sont également retrouvés au niveau des biopsies pulmonaires provenant de fumeurs[31]. On retrouve une expression augmentée des gènes TGFB1 codant pour le facteur de croissance de transformation β (TGF- β), LTBP4, EGLN2, et NFKBIB[32]. Le TGF- β contribue au remodelage des voies aériennes en favorisant la métaplasie squameuse et la fibrose pulmonaire[33]. Cette fibrose pulmonaire est due à la prolifération des fibroblastes situés au niveau du chorion et est accompagnée d'une hypertrophie des cellules musculaires lisses bronchiques. Les mécanismes conduisant à ce remodelage restent cependant inconnus.

Ces modifications vont contribuer à l'obstruction pulmonaire de différentes manières et participer aux symptômes de la BPCO, montrant un rôle primordial de ce remodelage dans la physiopathologie de la maladie.

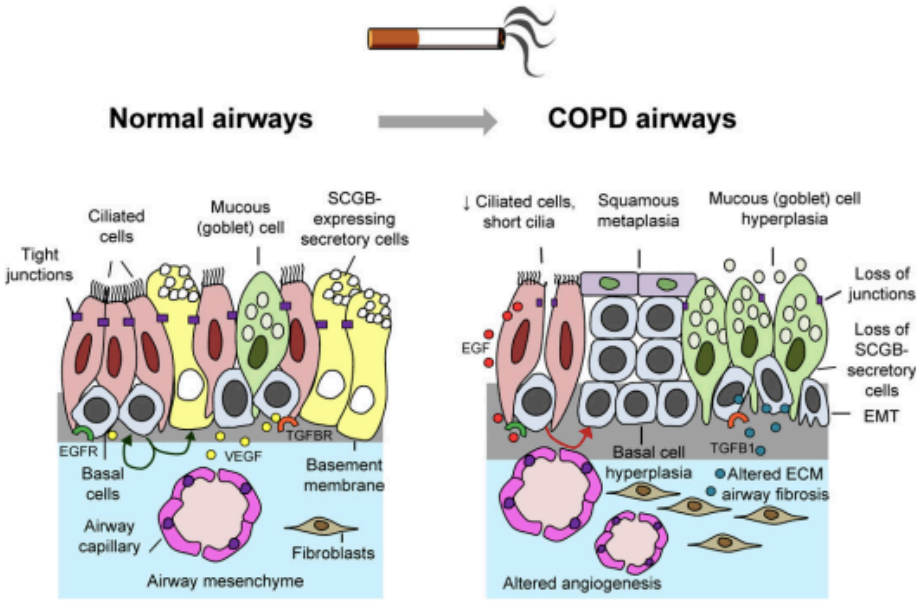

Figure 4 : Composition de l'épithelium bronchique du sujet sain et sujet atteint de la BPCO.

Source : Renat Shaykhiev and Ronald G. Crystal, Décembre 2014[32]

d) Obstruction pulmonaire

La fumée de la cigarette induit la sécrétion de CXCL8 ou relargage DAMP (*Danger-Associated Molecular Patterns*) par les cellules épithéliales bronchiques qui vont recruter des cellules inflammatoires, tels que les macrophages et les neutrophiles qui vont participer à l'obstruction pulmonaire. En effet, leur nombre au sein du parenchyme pulmonaire est corrélé à la sévérité de la BPCO[34]. Les PMNs contribuent directement à l'obstruction pulmonaire, en produisant des filaments d'ADN extracellulaire appelé NET (*Neutrophil extracellular trap*) des suites de leur stimulation. L'abondance de ces NETs et leur accumulation, dus à leur clairance difficile va contribuer à l'obstruction pulmonaire et à l'entretien de l'inflammation[35]. Le recrutement et la réponse de ces cellules vont contribuer, par le relargage d'enzymes protéolytiques et des espèces réactives de l'oxygène, au déséquilibre de la balance protéase/anti-protéase en faveur des protéases conduisant au remodelage de l'épithélium bronchique. Le remodelage de l'épithélium en faveur des cellules mucipares et en défaveur des cellules ciliées, va alors présenter un défaut de la clairance mucociliaire avec une sécrétion accrus de mucus qui va stagner au sein des bronches[36]. Ce mucus accumulé va

alors limiter les échanges gazeux. De plus, la fibrose pulmonaire et la perte d'élasticité des cellules musculaires lisses pulmonaires va également contribuer à la perte de compliance pulmonaire, correspondant au rapport d'une variation du volume pulmonaire à la variation de la pression d'air correspondante, ainsi qu'à la limitation des échanges gazeux[37]. Cette fibrose se manifeste cliniquement par une dyspnée[38] (figure 4).

e) Destruction du parenchyme pulmonaire

Plus communément appelée emphysème, cette destruction contribue à la difficulté respiratoire des patients BPCO présentant une forme sévère de la maladie[6] (figure 4). Elle est caractérisée par une augmentation des espaces alvéolaires et une rupture de leur paroi. Il y a différents acteurs responsables de cette destruction : les cellules de l'immunité innée, les cellules de l'immunité adaptative, mais également les changements histologiques cités précédemment[6].

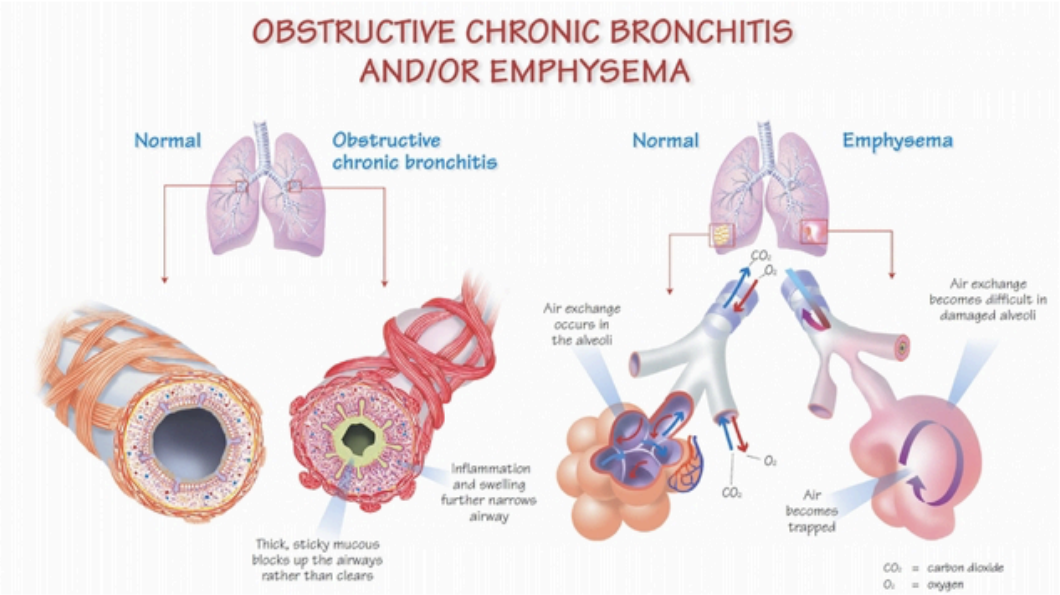

Figure 5 : Schéma représentatif des caractéristiques physiopathologiques de la BPCO

Source : https://www.livingwellwithcopd.com/en/what-is-copd.html

Dans les granules azurophiles des PMNs on trouve la NE (*neutrophil elastase*). Cette protéase, une fois secrétée dans le milieu extracellulaire, cible les fibres d'élastine et les dégrade. Cette destruction des fibres de l'élastine contribue à la perte d'élasticité du parenchyme pulmonaire. Dans différents modèles animaux, l'instillation de NE dans la

trachée a permis de démontrer son rôle direct dans l'emphysème pulmonaire[39,40]. D'autres protéases participent également à la dégradation du parenchyme pulmonaire. Ainsi, les macrophages participent également à l'emphysème en secrétant des métalloprotéinases, telle que la MMP-9, qui dégrade la matrice extracellulaire. La concentration de cette métalloprotéinase dans les lavages broncho-alvéolaires des patients emphysémateux est augmentée[41]. L'activité des protéinases secrétées par les polynucléaires neutrophiles et les macrophages va conduire à une perte de l'élasticité du parenchyme qui, associée à la fibrose pulmonaire vont conduire à la rupture alvéolaire.

Plusieurs travaux de recherches ont souligné également la participation des lymphocytes T cytotoxiques dans ce remodelage bronchique chez les patients BPCO. Ces lymphocytes T $CD8^+$, par l'intermédiaire de la sécrétion d'enzymes protéolytiques telles que le granzyme B et la perforine, vont détruire les cellules épithéliales par un processus apoptotique et nécrotique.

4. Exacerbation de la BPCO

L'exacerbation est définie comme étant une augmentation des symptômes et une détérioration des fonctions respiratoires. Le diagnostic pour être posé, doit faire état de deux symptômes tels que l'augmentation de la dyspnée, du volume d'expectoration ou de leur état purulent. Celle-ci entraîne parfois une hospitalisation tant la détresse respiratoire est accrue. La fréquence de ces phases augmente avec le degré de sévérité de la maladie. Ces exacerbations participent à la progression de la maladie, impactant la qualité de vie des patients. La majorité des exacerbations sont d'origine infectieuse. Elles peuvent être de différentes origines : bactérienne, virale ou environnementale. A noter que leur nombre augmente au cours de l'hiver quand les infections respiratoires virales sont les plus courantes[43].

a) Exacerbation de la BPCO d'origine virale

Longtemps réfuté, le rôle des virus dans les exacerbations a pu être établi grâce au développement des méthodes de détection telles que la PCR. Parmi les souches virales responsables d'exacerbation, il y a le rhinovirus, l'influenza A et B et l'adénovirus.

Le remodelage de l'épithélium, la clairance muco-ciliaire défaillante et l'inflammation chronique installée chez les patients BPCO, pourrait laisser penser que leur susceptibilité aux infections virales est augmentée cependant certaines études démontrent que les patients BPCO ne sont pas plus sujet aux infections virales[44].

D'autres études ont démontré que les cellules épithéliales bronchiques, issues de patients BPCO, infectées par le rhinovirus présentent une expression augmentée des gènes liés à la réponse aux virus comparée aux cellules de sujets sains[45]. Cette susceptibilité à l'infection est attribuée à l'augmentation de l'expression de la molécule d'adhésion ICAM-1 à la surface des cellules épithéliales bronchiques qui de surcroit est le site de fixation du rhinovirus. Cette augmentation peut être attribuée à des infections antérieures à l'adénovirus, à la colonisation bactérienne des voies aériennes ou à la fumée de cigarette, entrainant la sécrétion d'ICAM soluble[46,47,48].

Certains virus tels que le virus respiratoire syncytial (VRS), qui infecte majoritairement les nouveau-nés, est à l'origine de 6,5% des cas d'exacerbations, ce qui est en faveur d'une susceptibilité plus importante des patients BPCO aux infections virales comparée aux individus sains[49].

b) Exacerbation de la BPCO d'origine bactérienne

Les voies aériennes sont colonisées par des souches bactériennes très diversifiées constituant le microbiome. Celui-ci n'est pas homogène à tous les niveaux du système respiratoire. En effet, les proportions de certains pathogènes tels que le *Staphylococcus, le Corynebacterium et le Propionibacterium* sont augmentées dans les voies aériennes profondes tandis qu'elles sont diminuées au niveau des voies supérieures[50]. Le microbiome joue un rôle primordial dans le développement de l'immunité de l'hôte, mais également dans la limitation de la colonisation du parenchyme pulmonaire par certaines souches pathogènes. Plusieurs études sur le microbiome des patients BPCO révèlent que certaines souches sont majoritairement présentes tels que *Proteobacteria*, *Firmicutes* lors du stade avancé de la maladie[51]. Cependant, les souches retrouvées diffèrent suivant l'étude, ce qui peut être expliqué par le faible nombre de patients recrutés pour chaque étude. Bien que le microbiome ait un rôle important dans le développement et la maturation du système immunitaire, l'implication directe du microbiome pulmonaire sur l'installation d'une inflammation chronique n'est pas établie[52].

Les voies aériennes des patients BPCO ayant une pathologie stable sont colonisées par *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae,* et *Streptococcus pneumoniae*[53]. Le germe *Haemophilus influenza* est le plus fréquemment retrouvé. Cette colonisation entretient l'inflammation chronique grâce à leur capacité d'activer la voie proinflammatoire NF-kB. Ces pathogènes retrouvés à l'état stable de la maladie sont également associés aux exacerbations

chez les patients BPCO à des stades avancés de la maladie[54]. Une association a été mise en évidence entre *Streptococcus pneumoniae et Haemophilus influenzae* à l'état stable de la maladie, qui lors des phases d'exacerbations n'est plus présente. Cette réduction des interactions inter-espèces en phase exacerbée pourrait être en faveur de la colonisation par de nouvelles souches bactériennes, cependant les mécanismes d'interaction doivent être explorés d'avantage pour comprendre comment il pourrait influencer l'état des patients[55].

c) Exacerbation de la BPCO d'origine non-infectieuse

La pollution, précisément lorsqu'elle atteint un pic, est déterminée comme un facteur d'exacerbation. C'est au cours d'un pic de pollution survenu en décembre 1991 aux royaumes unis, que les chercheurs ont constaté une augmentation des exacerbations, des hospitalisations et des décès des patients BPCO[56]. Il demeure 30% des exacerbations dont l'étiologie n'est pas identifiée[43].

5. Conséquence pour le malade et prise en charge

Les patients atteints de BPCO, présentent une dyspnée qui va impacter leur confort de vie. Ils subissent une perte de poids, une fatigue chronique, des problèmes de sommeil et une limitation de leurs efforts physiques. Ce confort de vie se voit décroître à mesure des épisodes d'exacerbation. À noter que les traitements permettent d'améliorer le confort de vie mais malheureusement la guérison n'est à ce jour pas envisageable. L'objectif premier est de limiter les symptômes et d'éviter les phases d'exacerbation.

Des traitements non-médicamenteux peuvent être mis en place tels que l'arrêt de la consommation de cigarette et la limitation de l'exposition aux particules fines, aux particules métalliques ou organiques grâce à l'utilisation de masque. La réhabilitation pulmonaire est effectuée par des entraînements physiques, un régime alimentaire adapté, un support psychologique et une formation du patient. Dans les stades les plus avancés de la maladie, l'oxygénothérapie est prescrite pour palier à l'insuffisance respiratoire. La vaccination contre le pneumocoque et le virus Influenzae est également recommandée afin de limiter les épisodes d'exacerbation[1].

Ces traitements non-médicamenteux sont généralement combinés à des traitements pharmacologiques. L'utilisation de bronchodilatateurs combinée aux corticoïdes est recommandée et est utilisée comme traitement initial. Il existe deux types de bronchodilatateur, les béta-2 agonistes et les anticholinergiques qui peuvent avoir une action plus ou moins longue. Les bronchodilatateurs sont généralement administrés par inhalation et

vont avoir une action sur les cellules musculaires lisses des voies aériennes ce qui va permettre d'augmenter le volume pulmonaire des patients et d'améliorer la dyspnée des patients. Ceux à longue durée d'action font partie du traitement de fond. Les corticoïdes seuls n'ont pas démontré leur efficacité[57]. Cependant, leur combinaison avec des bronchodilatateurs s'est révélée être efficace pour limiter le nombre d'exacerbations, notamment pour les patientes souffrant de BPCO au stade modéré ou sévère[58]. Une utilisation trop prolongée des corticoïdes peut accroître le risque de pneumonie chez les patients BPCO au stade sévère. Une antibiothérapie est également mise en place dans le cas des exacerbations bactériennes.

II. L'immunité dans la BPCO

La BPCO est une maladie inflammatoire complexe dans laquelle intervient un grand nombre de cellules et médiateurs inflammatoires. Elle résulte d'une réponse inflammatoire innée qui va être non contrôlée et évoluer en réponse inflammatoire adaptative. Les dégâts engendrés par la réponse immunitaire innée entretiennent souvent une réponse inflammatoire.

1. La réponse immunitaire innée

Comme décris précédemment, le commencement de la maladie fait suite aux facteurs de risques dont le tabagisme. L'exposition au tabac et ses divers composants toxiques va induire un stress et une réponse des cellules immunitaires innées engendrant une inflammation pulmonaire. Les cellules immunitaires innées qui ont une responsabilité dans cette inflammation sont les cellules épithéliales bronchiques, les macrophages, les PMNs et les cellules lymphoïdes innées.

a) Les cellules épithéliales bronchiques

Lors de l'exposition à la fumée de cigarette, certaines cellules de l'épithéliale bronchique vont subir des dommages entraînants le relargage de composés, appelés DAMPs (*damage associated molecular patterns)*. Il a été démontré que l'exposition des cellules épithéliales bronchiques à la fumée de cigarette, induit leur autophagie, ce qui serait une grande source de relargage de DAMPs[59]. Ces molécules ainsi que la fumée de cigarette vont activer les récepteurs *Toll like* ou TLR, induisant la sécrétion d'IL-1β et de CXCL8[24]. Le stress oxydant participe également à la sécrétion de CXCL8[60]. Ces cytokines et chimiokines pro-inflammatoires vont alors initier le recrutement des cellules inflammatoires telles que les polynucléaires neutrophiles et les monocytes grâce à l'expression de CCR2 à leurs surfaces. Ces derniers, une fois arrivés au sein du parenchyme pulmonaire, vont se différencier en macrophage[61].

b) Les macrophages alvéolaires

Les macrophages sont les cellules immunitaires les plus abondantes au sein du parenchyme pulmonaire sain. Leur fonction est de phagocyter les cellules apoptotiques et les débris cellulaires, processus appelé efférocytose[62]. Ils ont également un rôle au sein de l'initiation de la réponse immunitaire adaptative, puisqu'ils sont capables de phagocyter les pathogènes, au sein des phagosomes qui fusionnent avec les lysosomes pour former les phagolysosomes, organites essentiels pour la destruction intracellulaire du pathogène. Ils présentent l'antigènes aux lymphocytes T CD4 (LT CD4). Ils peuvent se différencier en deux phénotypes, les macrophages de type 1 (M1) ou de type 2 (M2)[63]. Les M1 ont une activité microbicide, sécrètent des médiateurs inflammatoires tels que l'IL-1, l'IL-6 et le *tumor necrosis factor* (TNF-α) ainsi que des espèces réactives de l'oxygène. Le profil M2 est de type anti-inflammatoire et oriente vers la réparation tissulaire. Dans le tissus pulmonaire sain les macrophages résidents sont en majorité non polarisés [64]. Ces cellules ont un rôle déterminant dans la BPCO.

De nombreuses études révèlent en effet qu'ils sont présents en très grand nombre dans les lavages broncho-alvéolaires des patients fumeurs BPCO ou fumeurs non BPCO[65]. Leur nombre est corrélé à la destruction alvéolaire et le stade de la maladie chez les patients BPCO[34,66]. Leur profil phénotypique diffère de celui des macrophages des donneurs sains, notamment une diminution des marqueurs CD14, CD16, CD49, CD163 et CD206 et une augmentation de sécrétion de MMP-9, de MMP-12 et de GM-CSF favorisant ainsi le recrutement des neutrophiles, l'emphysème et le remodelage pulmonaire[67]. Le microenvironnement pulmonaire chez les patients BPCO, entraîne une polarisation des macrophages vers le profil M1 et M2. Une autre population de macrophage double positif pour les marqueurs M1 et M2 a été identifiée chez les patients BPCO[64]. Leur distribution au sein du tissus pulmonaire est différente. Les macrophages non polarisés sont retrouvés de façon homogène au sein du tissu pulmonaire, tandis que les M1 sont prédominants au niveau des parois des petites voies respiratoires et les M2 dans les espaces alvéolaires[68].

Les macrophages pulmonaires de patients BPCO ont un défaut de phagocytose des bactéries comme l'E. Coli, le S. Pneumoniae et l'H. Influenzae comparé à celui des macrophages issus de donneurs sains, et ce malgré une expression inchangée des récepteurs TLR2, CD14, TLR4 et CD163, nécessaires à la phagocytose de ces pathogènes[69]. Le mécanisme de défaut de phagocytose reste à être déterminé, bien que Dr Hodge S. et al ont démontré un effet direct de la fumée de la cigarette sur la diminution de l'expression de

CD44, CD71, CD31 et CD91 des macrophages, à l'origine de ce défaut de phagocytose[70]. Cependant, ces résultats n'ont pas été confirmés par l'équipe de du Dr Taylor[69]. Un défaut d'efférocytose est également constaté conduisant à une diminution de l'élimination des cellules épithéliales bronchiques apoptotiques qui vont alors entrer en nécrose[71]. Cette nécrose va entretenir l'inflammation chronique en libérant des médiateurs inflammatoires qui vont stimuler les cellules NK et activer les cellules dendritiques qui a leur tour vont activer les cellules lymphoïdes T (LT).

Les macrophages, par l'intermédiaire de médiateurs chemoattractants et de cytokines, vont également participer au recrutement et à la stimulation d'autres cellules immunitaires. Ainsi, grâce à la sécrétion de CXCL8, de CXCL1, et de LTB4, les macrophages vont participer au recrutement des polynucléaires neutrophiles et en secrétant du MCP-1/CCL-2, les monocytes qui expriment le récepteur à cette chimiokine CCR-2, vont être recrutés[72]. Ce recrutement accru de cellules immunitaires, participe à l'installation de l'inflammation chronique du parenchyme pulmonaire. Leur abondance au sein du parenchyme pulmonaire, couplée à leur défaillance de phagocytose et leur sécrétion accrue de médiateurs pro-inflammatoires, font des macrophages, des acteurs importants de la colonisation bactérienne des poumons, de l'initiation de l'inflammation et son entretien chez les patients BPCO.

c) Les polynucléaires neutrophiles

Les polynucléaires neutrophiles sont très abondants au sein du parenchyme pulmonaire des patients atteints de BPCO et leur présence est corrélée à la sévérité de la limitation du flux respiratoire[73]. Ils sont recrutés par les facteurs chimioattractants tels que le leucotriène B4, Gro1/CXCL1, ENA78/CXCL5 et IL-8/CXCL8 dont les concentrations sont augmentées dans les voies aériennes des patients BPCO comparées aux donneurs sains[73]. La fumée de cigarette stimule les cellules épithéliales et les macrophages qui vont produire ces protéines chimioattractantes des neutrophiles[74]. Les PMNs eux-mêmes secrètent le CXCL8 qui est un facteur chimioattractant très important pour les PMNs et est présent à des fortes concentrations dans les lavages broncho-alvéolaires des patients BPCO comparés aux LBA des sujets sains[75]. Les neutrophiles participent à l'entretien de l'inflammation en recrutant d'autres neutrophiles.

La présence en forte concentration des protéines granulaires des PMNs dans les expectorations des patients BPCO indique que les neutrophiles sont activés et déversent les protéases contenues dans leurs granules[76]. L'élastase de neutrophile (NE) et la MMP-9 font

partie des protéases des polynucléaires neutrophiles trouvés dans les expectorations des patients BPCO. Elles dégradent les fibres élastiques du poumon participant ainsi au phénomène d'emphysème pulmonaire. De plus, les neutrophiles apoptotiques ne sont pas éliminés par les macrophages alvéolaires ce qui entraine leur accumulation au sein des alvéoles pulmonaires participants d'avantage à entretenir l'inflammation[77]. Il a été démontré que la fumée de cigarette altère directement la capacité des macrophages alvéolaires à efférocyter les neutrophiles apoptotiques. Ces derniers vont rentrer en nécrose conduisant au relargage des composants proinflammatoires[78]. Le TNF alpha accumulé au sein du parenchyme pulmonaire a été incriminé dans ce processus d'inhibition de l'efférocytose[79].

Les neutrophiles des patients BPCO ont des capacités migratoires différentes des neutrophiles de sujets sains. Il vont adopter une migration plus rapide, avec une trajectoire trajectoire moins précise et beaucoup plus allongée[80]. Les travaux du Dr Toshiyuki Y. ont démontré une augmentation de l'expression du récepteur CXCR1 sur les neutrophiles circulants des patients BPCO comparée à celle des PMNs des donneurs sains; ce qui pourrait expliquer leur capacité à circuler plus rapidement[81]. Tandis que l'équipe du Dr Sapey E. ne constate pas de différence d'expression des récepteurs CXCR1 et CXCR2 des PMNs circulants[80] issus de patients BPCO et de donneurs sains.

Les PMNs participent à l'encombrement pulmonaire en stimulant la sécrétion de mucus et en remodelant l'épithélium bronchique[82]. Leur nombre au sein des petites voies aériennes est corrélé à l'obstruction bronchique et au remodelage bronchique ce qui fait du polynucléaire neutrophile, à la fois, un marqueur pronostique de la sévérité de la maladie et un acteur de la progression de la maladie[83]. Ils participent également à l'encombrement pulmonaire notamment suite à leur activation et la libération des NETs. Ce phénomène d'immunité innée est retrouvé dans de nombreuses pathologies dont la BPCO et sera développé dans une partie ci-après.

d) Les cellules lymphoïdes innées

Les cellules lymphoïdes innées, découvertes récemment, sont particulièrement abondantes au niveau des muqueuses et jouent un rôle important au niveau de l'immunité et l'homéostasie[84]. Ces cellules sont les homologues innés des lymphocytes T. Bien que dépourvues de récepteurs aux antigènes, les ILC vont répondre rapidement à leur microenvironnement grâce à leurs récepteurs cytokiniques, ainsi qu'une large gamme de

récepteurs pour les composants nutritifs, les produits microbiens, les médiateurs lipidiques et les émetteurs neuronaux[85].

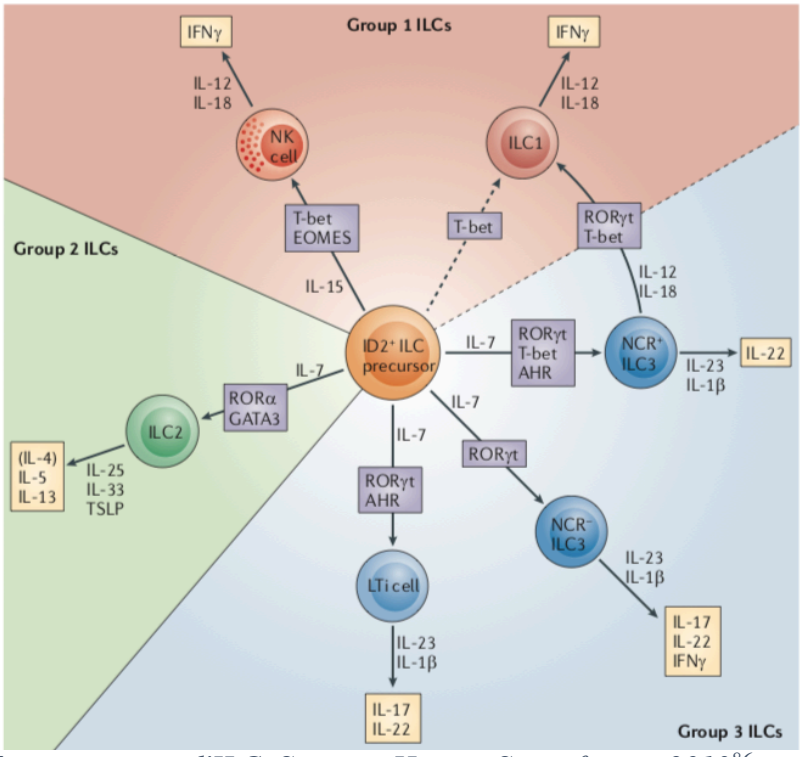

Figure 6 : Les différents groupes d'ILC. Source : Hergen Spits, fevrier 2013[86]

Elles sont classées en 3 groupes[86] (figure 5) :

- ILC du groupe 1 (ILC1), stimulés par l'IL-12, l'IL-15 et l'IL-18, vont secréter de l'IFNγ. Ces cellules vont jouer un rôle dans la stimulation des macrophages et des cellules dendritiques afin qu'ils éliminent les pathogènes intracellulaires et présentent les antigènes. D'autres cellules telles que les cellules « *naturel killer* » (cellule NK) font également partie de ce groupe de cellules lymphoïdes innées. Elles sont connues pour leur rôle cytotoxique mais également leur capacité à secréter de l'IFNγ[86].

- ILC du groupe 2 (ILC2), stimulés par IL-25 et l'IL-33, vont secréter de l'IL-4, IL-5, et de l'IL-13. Ces médiateurs vont jouer un rôle dans la réparation tissulaire et la sécrétion de mucus[86].

- ILC du groupe 3 (ILC3), stimulés par l'IL-1β et l'IL-23 vont secréter de l'IL-22, IL-17 et du GM-CSF stimulant la phagocytose, la survie de l'épithélium et la production des peptides antimicrobiens[86].

Leur différenciation à partir de leur progéniteur commun est encore très peu caractérisée[87]. En effet, ces cellules ont une plasticité phénotypique qui va s'adapter en fonction de

l'environnement cytokinique. Par exemple une ILC du groupe 3 peut, suite à une stimulation environnementale, acquérir le phénotype d'une ILC du groupe 1[88,89]. Des études récentes ont révélé que les cellules NK, les ILC1 et les ILC2 possèdent des facultés de mémoire immunitaire[90].

Au niveau du tractus pulmonaire de l'homme, les trois groupes d'ILC sont représentés avec une prédominance des ILC du groupe 3 tandis que chez la souris, ce sont celles du groupe 2 qui prédominent[91]. Cependant, la représentation des populations change en fonction de la pathologie ou de l'infection au niveau pulmonaire[92]. Au vu de leurs rôles dans l'homéostasie et l'immunité tissulaire le rôle de ces cellules dans la BPCO a été étudié, cependant les avis divergent. Des travaux montrent que les populations d'ILC dans le sang circulant de ces patients changent avec une augmentation de la proportion d'ILC1 sécrétant de l'IFNγ et une diminution de celle d'ILC2. Les sujets fumeurs présentent une augmentation de la population d'ILC1 dans leur sang circulant comparé aux sujet sains[93] et le rapport ILC1/ILC2 des patients BPCO est positivement corrélé à la gravité de la maladie. Les travaux menés sur les cellules de poumon isolées par exérèse ont montré également une augmentation d'ILC du groupe 3 chez les patients BPCO comparés aux sujets sains[91]. Une autre étude a mis également en évidence une augmentation significative d'ILC3 $NRP1^+$ au sein des poumons de patient atteint de BPCO[94].

L'IL-17 est retrouvée à des fortes concentrations au sein des poumons des sujets BPCO, suggérant une augmentation de la population d'ILC3 qui contribuerait à la production de cette cytokine et au recrutement des neutrophiles en secrétant de l'Il-17 au sein du parenchyme pulmonaire. Cependant, le rôle des ILC1 et des ILC3 dans la BPCO doit être précisé, bien qu'un changement de proportion est notable chez les patients fumeur comparé aux sujets sains suggérant leur rôle précoce dans la maladie[94]. Il est également observé que dans les modèles murins, la fumé de cigarette altère les fonctions des ILC2, favorisant la sécrétion d'IL-33 qui va par la suite contribuer à l'exacerbation suite à infection[95]. Ces travaux suggèrent un rôle important des ILC dans la BPCO, mais doivent être approfondis afin de déterminer les mécanismes impliqués.

2. La transition vers l'immunité adaptative

La transition vers l'immunité adaptative a lieu grâce aux cellules présentatrice d'antigène (CPA) qui vont permettre aux lymphocytes de reconnaître les antigènes et de s'activer. Les CPA vont capturer les antigènes, les apprêter en les associant au complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH) et les présenter aux lymphocytes T $CD4^+$. Parmi les

CPA présentes au niveau pulmonaire, on trouve les macrophages, les monocytes, les lymphocytes B et les cellules dendritiques. Les cellules dendritiques sont des CPA professionnelles qui ont été fortement étudiées dans le cadre de la BPCO.

a) Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont situées au niveau de l'épithélium bronchique leur conférant une place de choix pour prendre en charge et signaler la présence des substances étrangères inhalées. Elles ont un rôle d'apprêtement de l'antigène afin de le présenter aux lymphocytes T mais elles ont également un rôle dans l'activation de cellules inflammatoires telles que les macrophages et les neutrophiles[96].

Dans la BPCO, le nombre des cellules dendritiques est augmenté au sein des poumons et est corrélé au stade de la maladie[97]. Cette augmentation peut être expliquée par la présence d'une forte concentration du MIP-3a/CCL20, dont le récepteur CCR6 est présent à la surface des cellules dendritiques, au niveau pulmonaire des patients. La MIP-3a/CCL20 est secrété en partie par les cellules épithéliales bronchiques suite à l'exposition de ces dernières à la fumée de cigarette[98]. L'analyse des expectorations de patient BPCO montre une augmentation de recrutement des cellules dendritiques qui sont majoritairement immatures ($CD83^-$) comparée aux témoins non-fumeurs[99,100,101]. Un autre étude a révélé que la BPCO est associée à un nombre réduit de DCs $CD83^+$ matures et à des niveaux d'expression $CCR7^+$ plus faibles dans les petites voies respiratoires[102]. Il est également observé une diminution du récepteur CCR5, qui est important pour l'entrée de certains antigènes dans les cellules dendritiques myeloïdes et leur migration, indépendamment du statut tabagique des patients BPCO[103]. Cependant, le rôle exact des cellules dendritiques dans la BPCO reste à déterminer.

3. La réponse immunitaire adaptative

La réponse immunitaire adaptative, également appelée acquise, est composée de deux types d'immunités : humorale et cellulaire. L'immunité humorale s'exerce par l'intermédiaire d'immunoglobulines (ou anticorps), secrétées par les lymphocytes B. Ces anticorps vont directement cibler les pathogènes (protéine microbienne, toxine …) afin de limiter la colonisation des cellules de l'hôte. L'immunité cellulaire s'oppose aux pathogènes intracellulaires et est exercée par les lymphocytes T. Les lymphocytes T par l'intermédiaire de l'IFNγ vont activer les phagocytes, qui ont préalablement phagocytés les pathogènes, afin qu'ils les détruisent[104]. Les lymphocytes T cytotoxiques vont détruire les cellules infectées par les pathogènes.

Dans le cas de la BPCO, bien que les mécanismes d'immunités innées soient fortement responsables des modifications physiopathologiques décrit précédemment, l'immunité adaptative a également un rôle dans la pathologie bien que certaines études menées sur des souris *scid* (modèle immun déficient sans LT ni LB) montrent une inflammation chronique et un emphysème induit par la fumée de cigarette[105]. Ces résultats suggèrent que l'immunité adaptative intervient dans les stades les plus avancés de la pathologie. Cependant, l'accumulation des LT et des LB observée au sein du parenchyme pulmonaire des patients souligne leur rôle potentiel dans la BPCO

a) Lymphocytes T

Les lymphocytes T regroupent les lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$. Ces deux sous-populations sont retrouvées en grand nombre au sein des poumons de patients BPCO. Des souris dans lesquelles le gène CD8 a été invalidé, sont protégées des caractéristiques de la BPCO induite par la fumée de cigarette, telles que l'accumulation des macrophages, l'activation des MMP-2 et MMP-9 et l'emphysème[106]. Ces observations ne sont pas constatées sur les souris déficientes en CD4, révélant un rôle important des LT CD8 dans la pathologie.

Des études récentes montrent que le tabagisme, le degré d'obstruction des voies respiratoires et l'emphysème pulmonaire sont liés à une augmentation du nombre de lymphocytes T CD8 et du rapport CD8/CD4[61,107]. De plus, leur activation est augmentée par rapport aux sujets sains, avec une augmentation de le l'expression du facteur nucléaire NFkB, de Stat4, de l'IFNγ et de la perforine[107]. Cette accumulation des lymphocyte T CD8 au sein du parenchyme pulmonaire n'est pas totalement élucidée. Elle peut être expliquée par une réduction de leur apoptose, mais également par une augmentation d'expression de CXCR3 par les lymphocytes T retrouvés au niveau des voies aériennes périphériques. Le CXCR3 est un récepteur activé par IP-10/CXCL10 qui est surexprimé au niveau des cellules épithéliales bronchiques des patients BPCO[108]. Les LT CD8 semblent être impliqués principalement dans le remodelage pulmonaire et l'emphysème grâce à la sécrétion de TNF-α, de la perforine et de la granzyme-B[109,110].

En ce qui concerne les LT CD4, bien que leur accumulation au sein du parenchyme pulmonaire soit avérée, leur rôle dans la physiopathologie de la BPCO reste à déterminer de façon plus précise. En effet, on leur attribue un rôle potentiel dans l'orientation de la réponse de LT CD8. Les lymphocytes T peuvent se différencier en Th1 (secrétant de l'IFNγ), en Th2

(secrétant de l'IL-4, IL-5 et IL-13) ou en Th17 (secrétant de l'IL-17 et de l'IL-22). Cette orientation va avoir une influence sur la réponse immunitaire. Il est observé que les LT CD4 présents au sein du parenchyme pulmonaire des patients BPCO sont de type Th1 et Th17[111,112]. Cependant, les résultats de certaines études ont rapporté la présence de LT CD4 de type Th2 au sein du parenchyme pulmonaire des sujet BPCO[113].

b) Lymphocytes B

Les lymphocytes B sont les acteurs principaux de l'immunité adaptative humorale car ce sont eux qui sécrètent les immunoglobulines spécifiques du pathogène. Des études ont révélé qu'il y a une accumulation de lymphocyte B au sein des muqueuses pulmonaires, localisés au sein de follicules lymphocytaires et leur nombre augmente avec la sévérité de la maladie[114]. Leur rôle dans la physiopathologie de la maladie n'est pas encore déterminé, bien que la prolifération des LB au sein des follicules suppose une expansion clonale spécifique d'un antigène.

4. Auto-immunité et environnement cytokinique

La BPCO reste une maladie complexe dont la physiopathologie n'est pas totalement comprise. Le rôle de l'immunité innée est avéré tandis que celui de l'immunité adaptative est soumis à de nombreuses controverses. Cependant, il paraît évident qu'elle participe à l'entretien de l'inflammation et à l'environnement cytokinique. De nombreux arguments sont en faveur de l'auto-immunité dans la BPCO.

a) L'auto-immunité dans la BPCO

La présence de lymphocyte B en grand nombre au sein de follicule au niveau des muqueuses pulmonaires laisse supposer qu'ils peuvent secréter des auto-anticorps. L'environnement oxydatif au sein des poumons des patients BPCO entraîne la carbonylation de protéine du soi. Ces protéines carbonylées favorisent la production d'anticorps. Des études réalisées sur le sérum de sujet BPCO, ont montré suite à la titration des anticorps dirigés contre les cellules épithéliales primaires ou HEP-2, une augmentation de leur concentration sérique comparé aux sujets fumeurs ou non. Des complexes immuns intra-pulmonaires sont également détectés suite à l'étude des explants pulmonaires de patients BPCO[115]. Il est également observé un dépôt de fragment du compliment C3 activé au niveau des vaisseaux sanguins pulmonaires. Les peptides d'élastine issus de la dégradation du parenchyme pulmonaire ont également été décrits comme des cibles potentielles de l'immunité adaptative.

Des LB et des LT réactifs aux peptides de l'élastine ont été identifiés chez les patients BPCO[116].

De plus, le facteur d'activation des lymphocytes B appelé BAFF, est retrouvé en grande quantité au sein du tissu pulmonaire des patients BPCO comparé aux sujets sains[117]. Ce facteur est important dans l'activation des lymphocytes B, leur maturation et leur survie et sa surexpression est associée avec des maladies auto-immunes telles que le lupus érythémateux systémique et la sclérose en plaque[118]. Des études ont révélé que sa sur-expression était au niveau de follicules lymphoïdes et des macrophages des patients BPCO. Elle peut être à l'origine d'une boucle d'amplification contribuant à la progression de la maladie en favorisant la survie des lymphocytes B et l'expansion des follicules lymphocytaires[119]. Une étude menée utilisant un antagoniste du BAFF sur des modèles murins exposés à la fumée de cigarette, a révélé une diminution de l'inflammation et de la destruction alvéolaire, suggérant que le BAFF contribue à la progression de la maladie[117].

b) Les médiateurs de l'inflammation de la BPCO

De nombreux médiateurs inflammatoires ont été identifiés comme étant impliqués dans la physiopathologie de la BPCO. Leur nombre important et leur interaction les uns avec les autres de manière complexe, rend inefficace le ciblage thérapeutique d'un de ces composants. On retrouve les lipides, les espèces réactives de l'oxygène, les cytokines, les chimiokines ainsi que les facteurs de croissance, tous issus des cellules inflammatoires et structurelles du poumon[61]. Certains sont retrouvés à des concentrations importantes au niveau de la circulation sanguine.

i. Les lipides

L'analyse des expectorations de patient BPCO montre l'augmentation de l'expression de la prostaglandine et du leucotriène comparés aux sujets sains[120]. Le leucotriène B4 (LTB4) est retrouvé en grande quantité, il est connu comme étant un chimio-attractant des neutrophiles par l'intermédiaire du récepteur de haute affinité BLT1. Ce récepteur est aussi retrouvé au niveau des lymphocytes T[121]. Il est donc possible que le LTB4 participe au recrutement des cellules inflammatoires et à l'entretien de l'inflammation.

ii. Les espèces réactives de l'oxygène

Le stress oxydatif est une caractéristique critique chez les patients atteints de BPCO. On retrouve chez les patients BPCO, une augmentation de la concentration en nitrotyrosine, qui

est un marqueur du stress oxydatif et du stress carbonyle[122]. Les poumons sont particulièrement vulnérables au stress oxydatif dû à l'exposition constante aux infections bactériennes/virales et à la respiration mitochondriale[123]. Les mécanismes de défenses antioxydants intracellulaires sont capables, hors contexte pathologique, de maintenir l'homéostasie limitant l'impact du stress oxydatif. La production normale d'oxydants est contrecarrée par plusieurs mécanismes antioxydants par l'intervention de la catalase, de la super oxyde dismutase (SOD) et le glutathion (GSH) (figure n°6).

Le stress oxydatif se produit lorsque les dérivés réactifs de l'oxygène, ou ROS pour « Reactive Oxygen Species », sont produits en excès par rapport aux mécanismes de défense antioxydants et entraînent des effets nocifs, y compris des dommages aux lipides, aux protéines et à l'ADN. Les cellules inflammatoires et structurelles, y compris les neutrophiles, les macrophages et les cellules épithéliales, qui sont activées dans les voies respiratoires des patients atteints de BPCO, produisent des ROS[124]. Les anions superoxydes (O_2^-) sont générés par la NADPH oxydase et sont ensuite convertis en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par les superoxyde dismutases (SOD). H2O2 est ensuite converti en eau par catalase. O_2^- et H2O2 pourraient interagir en présence de fer libre pour former le radical hydroxyle hautement réactif (OH). O_2^- peut également se combiner avec NO pour former du peroxynitrite ($ONOO^-$) (figure n°6).

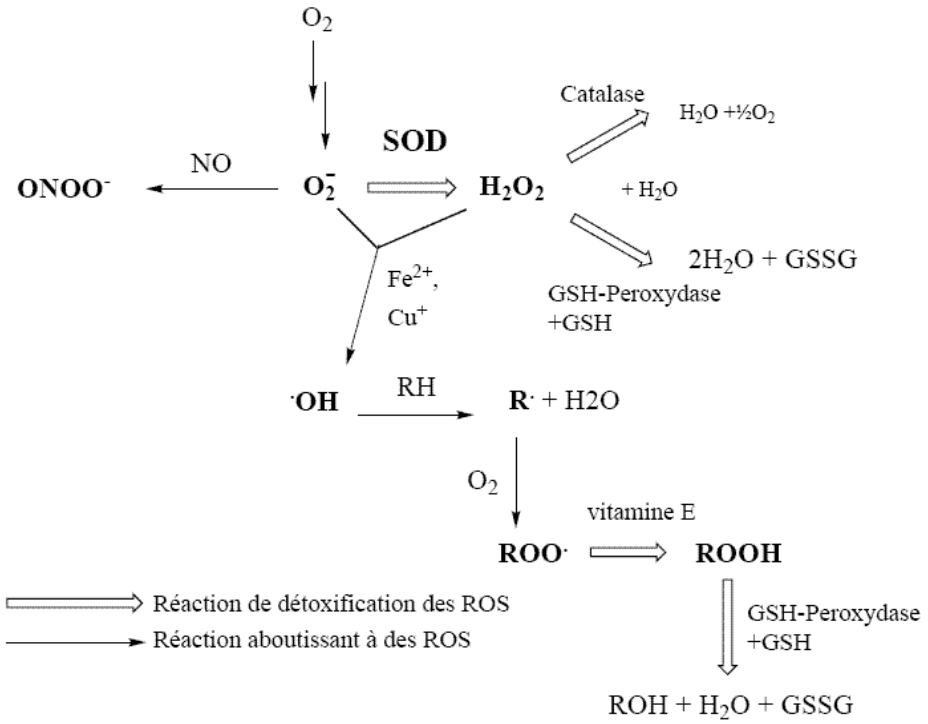

Figure 7 : Réactions chimiques du stress oxydatif

Le stress oxydatif conduit à la carbonylation des protéines et leur accumulation est appelée « stress carbonylé ». Cette carbonylation est l'ajout d'un groupement carbonyle qui est un atome de carbone doublement lié à un atome d'oxygène (C = O). Cette modification covalente des acides aminés qui constituent les protéines est provoquée par les espèces réactives de l'oxygène. Comme mentionné auparavant, les protéines carbonylées sont à l'origine de la réponse auto-immune et le stress oxydatif joue un rôle également dans l'auto-immunité dans la BPCO. Les travaux de l'équipe de Rhaman, ont révélé que les taux de 4-Hydroxy-2-nonenal, issu de la peroxydation d'un lipide membranaire, sont inversement corrélés à la FEV_1 reflétant la sévérité de la maladie chez les patients BPCO[125]. Les ROS ont des effets étendus sur le parenchyme pulmonaire et l'inflammation. Ils activent la voie NF-κB entraînant l'activation de ce gène pro-inflammatoire amplifiant l'inflammation[126].

Le stress oxydatif a également un rôle dans la résistance aux traitements anti-inflammatoires tels que les glucocorticoïdes. En effet, la nitration de l'histone désacétylase 2 (HDAC2) réduit son expression et son activité dans la régulation des gènes inflammatoires activés par les corticostéroïdes et donc son action anti-inflammatoire[127].

iii. Les cytokines

Les fumeurs sans obstruction pulmonaire, ont une amplification de la réponse inflammatoire au niveau de leur muqueuse, suggérant une implication des cytokines dans les mécanismes pathologiques conduisant à la limitation progressive du flux d'air. Parmi ces cytokines pro-inflammatoires, le facteur de nécrose tumorale α (TNF-α pour « Tumor Necrosis Factor ») est retrouvé à des concentrations élevées dans les expectorations des patients BPCO mais également au niveau des cellules circulantes[73]. Il est secrété à la fois par les cellules épithéliales bronchiques et les cellules musculaires lisses ainsi que les lymphocytes T, les neutrophiles et les macrophages. Au niveau du modèle murin d'emphysème induit par la fumée de cigarette, le TNF-α s'est révélé être impliquée dans la destruction du parenchyme pulmonaire. Il stimule les macrophages qui par la suite vont secréter la MMP-9 à l'origine de la dégradation du parenchyme pulmonaire.

D'autres études ont montré une forte concentration en IL-6 au niveau des expectorations et du plasma des patients BPCO en comparaison avec les sujets sains [128]. Des études *in vitro* ont montré que la fumée de cigarette stimulait la sécrétion de l'IL-6 par les macrophages et que la concentration en IL-6 du sérum était un marqueur prédictif de la mortalité des patients BPCO[129,130]. Cette observation est liée à l'expression accrue d'IL-6 lors des phases

d'exacerbations de la maladie où la fonction respiratoire est en déclin. Cette cytokine agit notamment sur la prolifération des cellules productrices d'anticorps et la différenciation des Th17[131].

L'interleukine-8 (CXCL8/IL-8), puissant chimioattractant des PMNs, est également retrouvé en forte concentration au niveau du parenchyme pulmonaire des patients BPCO[73]. Il a été démontré *in vitro*, que la stimulation des cellules épithéliales bronchiques par la fumée de cigarette induit la sécrétion d'CXCL8/IL-8[74]. Elle est également secrétée par les macrophages alvéolaires chez les fumeurs et les patients BPCO. Cette cytokine présente en forte concentration participe au recrutement massif des PMNs au sein du parenchyme pulmonaire.

Les cytokines secrétées par les cellules Th17 sont également retrouvées au niveau des expectorations des patients BPCO. Les sujets BPCO présentent, au niveau de leur parenchyme pulmonaire, des lymphocytes Th17 ainsi qu'une augmentation des cytokines IL-17 et IL-22 par rapport aux sujets sains[132]. L'IL-17A au niveau sanguin est retrouvée à de fortes concentrations chez les sujets BPCO comparés aux sujets fumeurs et non-fumeurs en bonne santé[132]. Les proportions sanguines de Th17 et LT CD8+ exprimant l'IL-17A sont augmentées chez les patients BPCO et sont corrélées avec le degré d'obstruction pulmonaire[133,134]. Différentes études sur des biopsies ont démontré la présence en grand nombre de cellule exprimant de l'IL-17 telles que les cellules B, les mastocytes, les PMNs en plus des lymphocytes T[112,135]. De plus, la concentration en IL-17A est corrélée aux concentrations des médiateurs chimioattractants des PMNs comme l'CXCL8/IL-8 et l'IL-6. Ces observations suggèrent que l'IL-17A a un rôle important dans la physiopathologie de la maladie notamment dans l'établissement de l'inflammation neutrophilique. Toutesfois, des études cliniques utilisant des anticorps neutralisants dirigés contre le TNF-α, l'CXCL8/IL-8, l'IL-17, l'IL-18, l'IL-1β ou le TSLP se sont révélées inefficaces et parfois même délétères. Ces cytokines peuvent être considérées comme des marqueurs pronostiques intéressants[136].

iv. Les chimiokines

Les chimiokines jouent un rôle important dans le recrutement des cellules immunitaires au sein du parenchyme pulmonaire chez les patients BPCO[137]. Leurs récepteurs sont couplés aux protéines G et de nombreux antagonistes ont été développés. La première chimiokine caractérisée dans la BPCO est l'IL-8/CXCL8[73]. L'IL-8/CXCL8 est sécrétée par les macrophages, les cellules T, les cellules épithéliales et les PMNs. Elle est chimiotactique pour les PMNs qui expriment le récepteur de haute affinité CXCR2, également activé par la

CXCL1. Les concentrations de ces chimiokines sont augmentées dans le lavage bronchoalvolaire et les expectorations des patients BPCO comparées aux sujets sains. La CXCL8/IL-8 est augmentée en phase d'exacerbation[138]. La CXCL1 et la CXCL8/IL-8 sont impliquées également dans le chimiotactisme des monocytes et des macrophages. Les cellules épithéliales bronchiques stimulées par la fumée de cigarette *in vitro* expriment la CXCL8/IL-8 qui pourrait avoir un rôle important dans l'initiation de l'inflammation suite au tabagisme[74]. De plus, l'étude des tissus pulmonaires de patient BPCO utilisant des puces à ADN a révélé une augmentation de l'expression de la fractalkine/CX3CL1 impliquée dans la migration des monocytes. De même pour la CCL2/MCP-1, qui se lie à CCR2, elle est exprimée fortement au niveau des macrophages des patients BPCO[139]. Puissant chimioattractant des cellules dendritiques, la CCL20 est exprimée à de fortes concentrations dans les expectorations des patient BPCO comparés aux sujets sains[97]. La CCL20 pourrait avoir un rôle dans l'initiation de la réponse immunitaire adaptative et potentiellement dans l'auto-immunité par le recrutement des cellules dendritiques.

v. *Les facteurs de croissance*

Comme mentionné précédemment, les poumons des sujets BPCO présentent des changements structuraux importants. Certains facteurs de croissance peuvent être à l'origine de ces changements d'autant plus que plusieurs parmi eux sont retrouvés à des fortes concentrations au sein du parenchyme pulmonaire[140].

Le TGF-β1 (Tumor growth factor β1) est fortement exprimé par les cellules épithéliales des petites voies respiratoires et les macrophages alvéolaires des patients BPCO et également chez les patients fumeurs[141]. L'implication du TGF-β1 dans la fibrose pourrait être expliquée par le fait qu'il induit l'expression accrue de facteur de croissance du tissu conjonctif (CTGF)[142]. Le TGF-alpha, produit en grande quantité par les macrophages alvéolaires et les cellules épithéliales bronchiques des patients BPCO, active l'EGFR jouant un rôle clé dans la sécrétion de mucus, contribuant à l'engorgement des bronches[143,144]. Cela est également observé au niveau des cellules épithéliales bronchiques stimulées par la fumée de cigarette[145]. L'EGF (epithelial growth factor), capable d'activer l'EGFR, est également retrouvé en grande quantité au niveau de l'épithélium de patients BPCO comparé à celui des sujets sains[146] et contribue aussi à la sécrétion de mucus.

Le VEGF « Vascular Endothelial Growth Factor » se retrouve à des fortes concentrations chez les patients avec une BPCO faible à modérée et à faible concentration chez les patients avec une BPCO sévère avec emphysème[147]. Des travaux effectués sur des rats utilisant des

inhibiteurs du récepteur au VEGF ont permis d'identifier le rôle clé de ce facteur de croissance dans l'emphysème[148].

III. Les polynucléaires neutrophiles

1. Granulopoïèse neutrophile

La granulopoïèse, c'est-à-dire la génération de granulocytes à l'état d'équilibre ou lors d'un stress hématopoïétique, est une cascade d'événements étroitement régulée qui implique non seulement des précurseurs engagés de cette lignée spécifique, mais également des cellules souches et progénitrices hématopoïétiques[149]. La génération des PMNs prend environs 14 jours et constitue 60% de l'activité hématopoïétique de la moelle osseuse. Elle est constituée d'une série d'étapes de maturation allant des cellules souches hématopoïétiques (CSH) multipotentes à la ligne engagée des cellules progénitrices myéloïdes communes (PMC), qui par différenciation vont devenir des progéniteurs monocytes granulocytes (PMG), puis des myéloblastes formant des granulocytes matures (basophiles, éosinophiles, mastocytes et neutrophiles). Cette prolifération et cette différenciation des CSH sont orchestrées par la niche hématopoïétique correspondant au microenvironnement cellulaire et également par certains facteurs de transcription tels que le C/EBPs (*CCAAT/enhancer binding proteins*) et GATA-1 (*GATA Binding Protein 1*)[150]. Le facteur G-CSF (Granulocyte colony-stimulating factor)

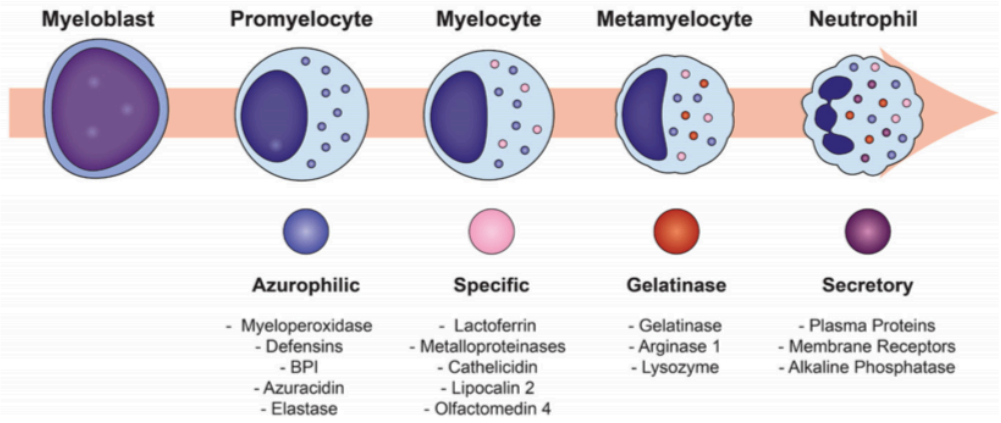

Figure 8 : Les différents stades cellulaires de la granulopoïèse. Adapté de Lawrence et Al. 2018 (152)

stimule la prolifération, la différenciation et la survie des PMNs. Durant les dernières phases de différentiation, le noyau va se segmenter et les granules vont se former au sein du cytoplasme (Figure 7).

Le myéloblaste se différencie en promyélocyte contenant des granules azurophiles dites primaires. Lorsque la mitose cellulaire s'arrête, il apparaît des granules spécifiques dites secondaires au stade myélocyte qui évolue en métamyélocyte où apparaît la gélatinase. Au stade final de différenciation, les PMNs ont développé des granules sécrétoires. Ces derniers

ont un noyau segmenté ainsi que trois types de granulations contenant près de 700 protéines[151].

2. Diversité des PMNs

a) Hétérogénéité dans la moelle osseuse

Au sein de la moelle osseuse (MO), les PMNs sont retrouvés en abondance avec une réserve estimée à 600 milliards. La moelle osseuse va être peuplée des neutrophiles à différents stades de différenciation comme cités précédemment. Leur présence dans la MO n'est pas uniquement dans l'unique but d'être un réservoir cellulaire, certains chercheurs leur attribuent un rôle fonctionnel. Ils peuvent par exemple permettre la régénération des vaisseaux sinusoïdaux médullaires grâce à la production de TNF-α[152] et favoriser la rétention des cellules progénitrices hématopoïétiques au sein de la MO par sécrétion de prostaglandine E2[153]

Il y a également des PMNs matures recrutés à nouveau dans la moelle osseuse après leur passage dans la circulation sanguine. Ces PMNs vieillissants, CD62L(faible) CXCR4(fort) sont recyclés dans le but d'éliminer des cellules présentant potentiellement des dysfonctionnements. Cependant, ils ont également un rôle régulateur des niches hématopoïétiques, notamment par la modulation de l'activité des macrophages et par les récepteurs au cholestérol. Cette réduction des niches a pour conséquence la libération dans la circulation sanguine des progéniteurs hématopoïétiques[154]. A noter que ces mécanismes ont été observés chez la souris.

b) Hétérogénéité dans le sang

Une fois libérés dans la circulation, les PMNs circulent pendant environ une demi-journée avant de quitter la circulation pour infiltrer les tissus[154]. Plusieurs travaux ont rapporté que, chez les individus sains, 45 à 65% des PMNs circulants sont CD177^{+} avec une variabilité de son expression reflétant le contrôle par des mécanismes épigénétiques[155]. Le CD177, également connu sous le nom d'antigène NB1, est une protéine associée à la membrane cytoplasmique et principalement localisée dans des granules spécifiques. Ce récepteur favorise l'interaction des PMNs avec les cellules endothéliales et leur transmigration hors du système vasculaire, en se liant à la molécule d'adhésion des cellules endothéliales plaquettaire-1 (PECAM-1 ou CD31) ou aux intégrines β2[156]. Bien que la durée de vie des neutrophiles soit relativement courte dans le sang, toutes les cellules ne sont pas phénotypiquement identiques. Des changements diurnes du phénotype se produisent et ce

phénomène est appelé vieillissement des neutrophiles. En effet, il a été observé dans des modèles murins et chez l'homme que les PMNs perdent l'expression de CD62L (L-sélectine), expriment CD11b et CXCR4 six heures après avoir quittés la MO[154] et leurs noyaux deviennent hypersegmentés. Ces modifications phénotypiques observent un rythme circadien, suggérant que les PMNs adaptent leurs fonctions aux besoins changeant de la journée. Dans des modèles murins, les PMNs âgés sont présents en abondance durant la journée, le nombre de PMN venant de quitter la MO est élevé durant la nuit lors de la phase active de l'animal, où l'exposition aux pathogènes est plus importante[157]. Des variations diurnes de la production d'espèces réactive de l'oxygène et de la capacité à phagocyter des PMNs[158] ont été observées chez l'homme. Fait intéressant, ces changements sont corrélées avec des changements transcriptionnels associés aux récepteurs TLRs et à la signalisation CXCR2, l'adhésion, la mort cellulaire et leurs propriétés migratoires[159].

Il a également été observé une hétérogénéité de densité au niveau des populations de PMNs. Il existe des PMNs de faible densité et de haute densité, isolés à partir de la fraction dans laquelle ils sont retrouvés après isolation par un gradient de Ficoll. Les PMNs de faible densité sont retrouvés dans la fraction contenant les cellules mononuclées et possèdent une réactivité accrue au fMLF (puissant facteur chimiotactique des PMNs), une défense face aux bactéries plus efficace et une capacité accrue de supprimer la prolifération des lymphocytes T[160,161]. Cette population de PMNs contient des PMNs immatures et matures activés qui remplissent des fonctions immunosuppressives et pro-inflammatoires. *In vitro*, les PMNs de densité moyenne subissent une baisse de densité après leur activation, cependant les PMNs de faibles densités fraîchement isolés sont retrouvés dans la fraction des PBMCs sans activation préalable. On suppose qu'*in vivo* cette activation correspond à une dégranulation. Les arguments en faveur de la dégranulation *in vivo* sont fournis en mesurant l'expression de certains marqueurs de granules à la surface des PMNs, tels que le CD63 (granules azurophiles), le CD66b (granules spécifiques), le CD11b (granules de gélatinase) et vésicules sécrétoires. Cependant d'autres études faisant appel au microscope électronique n'observent pas de différence au niveau du nombre de granule[162,163]. L'origine exacte de ces PMNs reste donc inconnue à ce jour.

c) Hétérogénéité et rôle des PMNs dans les maladies

i. Cancer

Dans le cas des cancers, le microenvironnement tumoral est doté d'un stroma immunitaire ayant un rôle déterminant dans la progression tumorale et la réponse aux chimiothérapies[164].

Les PMNs sont retrouvés en nombres variables au sein des tumeurs suivant le type de cancer. On observe deux populations de PMNs appelées TAN (Tumor associated neutrophil) dont la différence réside au niveau de leur fonction et leur morphologie. Ils sont issus des PMNs matures ou des cellules myeloïdes suppressives qui une fois infiltrés au sein du tissus se différencient. Il en existe deux types, le premier appelé N1 est caractérisé par des niveaux d'expression accrus de Fas, de cytokines immunostimulatrices et de chimiokines, et, fait intéressant, une expression accrue de surface cellulaire d'ICAM-1. Des interventions telles que le blocage du facteur de croissance transformant-β (TGF-β) sur les PMNs matures conduisent au phénotype N1[165]. Ce sous-type a une durée de vie courte, possède une cytotoxicité plus forte vis-à-vis des cellules tumorales *in vitro* et se caractérisent par une morphologie nucléaire hypersegmentée et lobulée. On leur attribue un rôle immunostimulateur et anti-tumoral en induisant la mort des cellules tumorales grâce à leur machinerie anti-microbienne et leur faculté à recruter et activer d'autres cellules immunitaires[165,166]. Le second type de TAN est le N2, ils sont présents en plus grand nombre et ont une durée de vie longue, avec un phénotype immature avec une activité pro-angiogénique, pro-métastatique et immunosuppressive élevée. Il a été déterminé dans le cas du cancer gastrique, que la polarisation des N2 était induite par l'IL-6 secrétée par les cellules souches mésenchymateuses activant la voie de signalisation IL-6– STAT3–ERK1/2[167].

Au niveau des PMNs circulants, le nombre de PMNs de faible densité est augmenté dans le sang périphérique des sujets atteints d'un cancer comparé aux sujets sains[168]. Il y a également une hétérogénéité au sein des PMNs de faible densité, avec des phénotypes immatures et matures. Ces PMNs ont une expression augmentée en CD66b à leur surface soulignant qui est marqueur d'activation, suggérant que ces PMNs sont activés. Leur nombre est augmenté en fonction du stade de la maladie et ils possèdent un rôle pro-tumoral. Une étude révèle qu'ils ont une chimiotaxie réduite, une phacoytose altérée et une réponse oxydative réduite au PMA ce qui expliquerait leur rôle pro-tumoral. En effet, les PMNs de faible densité ont montré une cytotoxicité tumorale réduite comparé aux PMNs de haute densité.

ii. Auto immunité

Les conclusions de plusieurs études soutiennent l'implication des PMNs dans la pathogenèse de nombreuses maladies auto-immunes. Ils peuvent influencer les processus auto-immuns soit directement via diverses molécules effectrices, soit indirectement via des interactions avec d'autres cellules immunitaires. En plus d'être incriminés dans l'induction

direct d'auto-anticorps et il est également admis que les PMNs ont des anomalies phénotypiques ou fonctionnelles dans diverses maladies auto-immunes.

Dans le cadre de modèle murin de sclérose en plaque (SEP), l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), il a été montré que le nombre de PMN augmentait de manière significative en phase aiguë mais diminuait en phase de rémission dans la lésion[169]. L'administration d'anticorps limitant le développement des PMNs, les anticorps anti-Ly6G ou anti-Gr-1, limite le développement d'EAE, suggérant que les PMNs peuvent jouer un rôle préjudiciable dans l'EAE. En revanche, l'utilisation du G-CSF pour favoriser le recrutement et l'activation des PMNs peut exacerber l'EAE[170]. Au niveau du sang périphérique des patients atteints de SEP, les PMNs présentent un phénotype inflammatoire avec une dégranulation, une production de ROS et une formation accrue de NETs[171]. Ces PMNs présentent également une apoptose réduite, ce qui peut contribuer à l'inflammation chronique et à la rechute répétée de la SEP[171]. Malgré l'effet nocif potentiel des PMNs dans la SEP, il a été démontré qu'une sous-population de PMNs exprimant fortement Gr-1 présente au niveau du système nerveux central des souris EAE supprime de manière significative la prolifération des lymphocytes T réactifs à la myéline, suggérant un effet protecteur de ces PMNs contre les LT auto-réactifs[172].

Dans le lupus érythémateux disséminé (LED), il est observé une augmentation du nombre de PMN de faible densité ayant une activité pro-inflammatoire plus importante avec notamment une synthèse accrue des interférons de type I[160,163]. Lorsque les PMNs sont incubés avec du plasma de patient LED, ils vont subir une diminution de leur densité potentiellement causée par leur activation par certains facteurs solubles tels que les complexes immuns ou le complément. Dans ce contexte, les PMNs de faible densité présentent une cytotoxicité accrue pour les cellules endothéliales ce qui les associe à un risque accru de lésion vasculaire. Les PMNs de faible densité participent également à la pathogenèse en ayant une augmentation de la formation de NETs[173,174]. Ces PMNs de faible densité produisent chez les patients LED des niveaux plus élevés de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IFN-α et le TNF-α, par rapport aux PMNs de haute densité autologues malgré une capacité phagocytaire des PMNs de faible densité considérablement altérée[175]. Alors que ces PMNs dans le cancer expriment des niveaux plus élevés de CD11b et CD66b que les PMNs de densité élevée, il n'y a pas de différence dans les niveaux de ces marqueurs d'activation chez les PMNs des patients LED[175].

iii. Inflammation chronique

Les PMNs jouent un rôle important dans les stades précoces de l'inflammation, mais peuvent endommager des organes si l'inflammation est persistante[176]. Les agressions inflammatoires aiguës, y compris l'infection ou l'ischémie, induisent la production de G-CSF, de GM-CSF ou d'autres facteurs myélopoïétiques qui favorisent la production de granulocytes[177]. Chez les humains traités avec de faibles doses d'endotoxine, au moins trois populations de granulocytes avec des propriétés phénotypiques et protéomiques distinctes apparaissent dans le sang, dont seules les cellules CD16(fort) CD62L(faible) ont une activité suppressive des lymphocytes T[178]. Cette population, cependant, n'affiche pas les caractéristiques de l'immaturité, suggérant que les PMNs nouvellement produits et ceux recrutés à partir d'autres sources contribuent à générer une hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle au cours de l'inflammation.

Les PMNs ont un rôle important dans l'initiation de l'inflammation chronique des voies respiratoires au cours de la BPCO comme cela a été mentionné précédemment. Il en est de même dans l'asthme, où les PMNs sont recrutées au niveau du site de la réaction allergique. Dans le cas de la BPCO, les PMNs en plus de présenter des défaillances fonctionnelles, ils ont des phénotypes pré-activés avec une diminution de l'expression de CD62L à leur surface, ce qui n'est pas le cas dans l'asthme[179]. Il n'y a pas de données dans la littérature concernant les différences de densité des PMNs dans la BPCO, cependant dans l'asthme le nombre de PMNs de faible densité est élevé au stade modéré et sévère de la maladie mais leur rôle dans la pathogénèse n'est à ce jour pas identifié[180].

3. Rôle dans l'inflammation

Les PMNs représentent la principale ligne de défense du corps contre les agents pathogènes envahissants tels que les bactéries, et constituent entre 40 et 60% de la population de globules blancs. Dans la circulation des adultes en bonne santé, les PMNs existent à l'état de repos, ce qui garantit que leur contenu intracellulaire toxique n'est pas accidentellement libéré préservant ainsi les tissus de l'hôte.

a) Recrutement au site de l'infection et activation

Les PMNs sont activés via un processus de deux étapes. Les PMNs au repos peuvent être pré-activés par des produits bactériens, des signaux de danger tels que les DAMP, des cytokines ou des chimiokines telles que le TNF-α, le GM-CSF, l'IL-8 et l'IFN-γ[181,182,183] et vont ensuite être mobilisés vers le site de l'infection ou de l'inflammation. La pré-activation

entraîne la mobilisation des granules intracellulaires, contenant des récepteurs préformés, vers la membrane plasmique augmentant le nombre de récepteurs à la surface de la membrane plasmique. L'agent qui pré-active entraînera également l'activation de facteurs de transcription qui déclenchent l'expression *de novo* de molécules (exemple : récepteurs et cytokines), qui améliorent la fonction ou la durée de vie des PMNs[184]. Ainsi, les propriétés moléculaires et donc les fonctions des PMNs sanguins au repos et des PMNs pré-activés sont très différentes. Pour cette raison, les expériences *in vitro* utilisant des PMNs sanguins fraîchement isolés ne permettent pas souvent d'explorer le répertoire fonctionnel complet et l'ensemble des capacités des PMNs.

La migration des PMNs de la circulation vers le site de l'inflammation est contrôlée par des interactions avec l'endothélium vasculaire. La L-sélectine exprimée à la surface des PMNs permet une faible fixation aux ligands exprimés à la surface des cellules endothéliales telles que la E-sélectine, la P-sélectine et la P-sélectine glycoprotéine ligand-1 (PSGL-1) permettant alors de ralentir les PMNs et de rouler le long de la paroi vasculaire (Figure n°8). Cela induit des changements conformationnels des molécules d'adhésion à l'intégrine, y compris le « *very late antigène-4* » (VLA-4; α4β1-intégrine, CD49d / CD29b), l'antigène associé à la fonction lymphocytaire 1 (LFA-1; αLβ2-intégrine, CD11a / CD18) et l'antigène-1 associé aux macrophages (MAC-1; αMβ2-intégrine, CD11b / CD18), qui se lient avec des molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales, telles que la molécule d'adhésion intercellulaire (ICAM) -1 et -2, la molécule d'adhésion aux cellules vasculaires-1 (VCAM-1) et la molécule d'adhésion aux cellules vasculaires des muqueuses-1 (MADCAM-1), conduisant à une interaction de haute affinité et une forte adhérence. L'arrêt du roulement est médié par la liaison des chimiokines telles que l'IL-8 aux récepteurs des PMNs[185]. Les PMNs migrent ensuite dans les tissus grâce aux jonctions entre les cellules endothéliales voisines (migration paracellulaire) en utilisant des ligands de surface dont ICAM-2, PECAM-1 (molécule d'adhésion des cellules endothéliales plaquettaires-1) et des protéines de la famille des molécules d'adhésion jonctionnelle (JAM). Une fois qu'ils ont quitté la circulation et ont traversé l'endothélium, les PMNs migrent vers le site inflammatoire le long d'un gradient de chimiokines. L'exposition des PMNs à des chimioattractants telles que la N-formylméthionyl-leucyl-phénylalanine (fMLP) et le fragment du complément 5a (C5a) induit une polarisation cellulaire des chimiorécepteurs et la formation de pseudopodes riches en actine au bord d'attaque de la cellule[186].

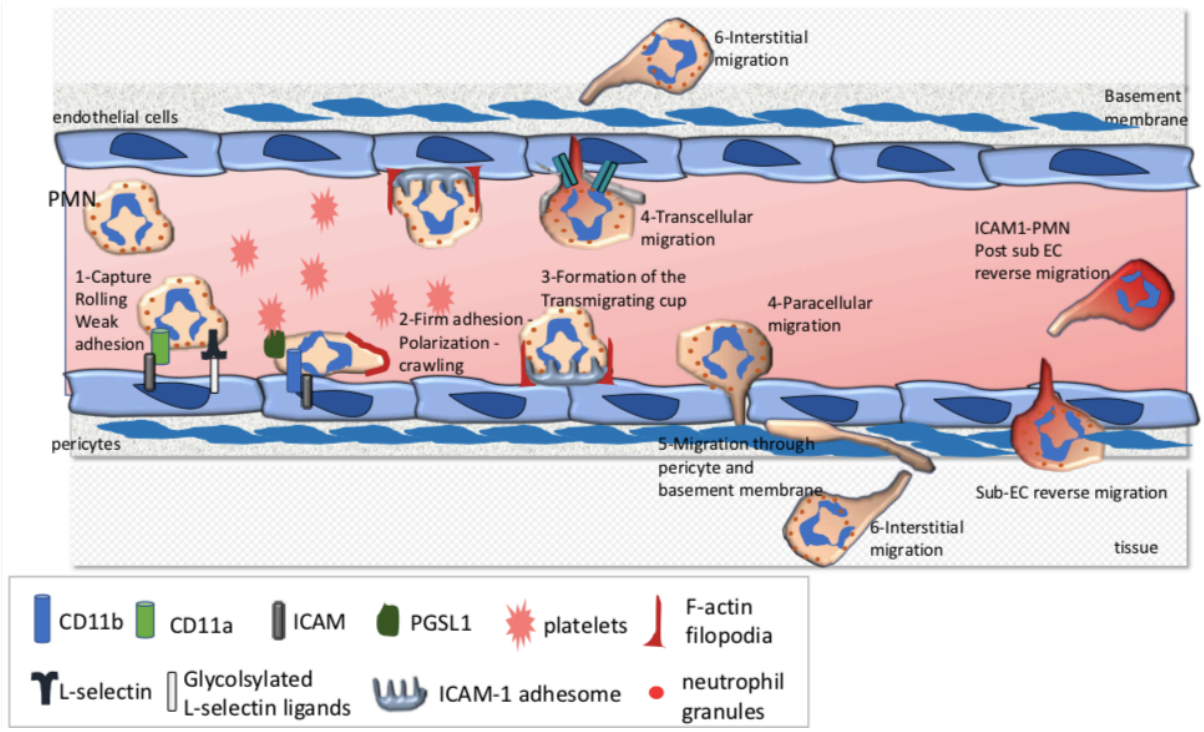

Figure 9 : Schéma de la migration transendothéliale des PMNs. Source : Filippi MD. , Blood, 2019[187].

La cascade de signalisation complexe menant à l'activation finale des PMNs a plusieurs facettes qui méritent d'être soulignées. Le mouvement vers un gradient de chimioattractants est la clé de ce processus. En effet, les chimioattractants à différentes concentrations peuvent avoir des effets différents sur la physiologie des PMNs. Ce phénomène est illustré par l'IL-8 qui à de faibles concentrations stimule l'excrétion de la L-sélectine et augmente l'expression des intégrines β2, et a des concentrations légèrement plus élevées provoque l'initiation de l'explosion oxydative. A des concentrations plus élevées, l'IL-8 induit la dégranulation des PMNs[188]. La stimulation du PMN par un chimioattractant entraîne souvent une endocytose du récepteur correspondant, conduisant ainsi à une désensibilisation aux stimulations répétées avec la même molécule[189]. L'ensemble de ces signaux permettent au PMN la mise en œuvre de sa fonction bactéricide, en exécutant des programmes de phagocytose, de dégranulation et de NETose.

b) Phagocytose

La phagocytose est le principal mécanisme d'élimination des agents pathogènes et des débris cellulaires. Il s'agit d'un processus actif, médié par un récepteur, au cours duquel une particule est internalisée par la membrane cellulaire dans une vacuole appelée phagosome. Comme pour les autres phagocytes, les détails mécanistiques de l'internalisation dépendent du type d'interaction entre le PMN et le micro-organisme. L'interaction peut être directe, par la

reconnaissance des PAMP par les récepteurs de l'immunité innée appelés PRR, ou médiée par l'opsonine. Ce dernier mécanisme est mieux caractérisé et comprend deux exemples : la phagocytose médiée par FcγR, qui repose sur la formation d'extensions de pseudopodes pour l'internalisation des particules opsonisées par des immunoglobuline G (IgG), et la phagocytose médiée par le récepteur du complément, qui ne nécessite pas d'extensions de membrane ou de pseudopodes[190].

Après l'internalisation, le phagosome contenant le micro-organisme va subir une maturation. La compréhension de ce processus est largement basée sur des études sur les macrophages, et bien que celles-ci soient certainement instructives, des différences essentielles existent dans les PMNs. La phagocytose médiée par les macrophages suit une voie de maturation endocytaire tandis que chez les PMNs, la maturation des phagosomes se produit lors de la fusion des granules avec le phagosome, ce qui permet l'entrée des molécules antimicrobiennes dans la lumière phagosomale. Simultanément, l'assemblage de la NADPH oxydase sur la membrane phagosomale permet la production de ROS, et conjointement, ces deux mécanismes créent un environnement toxique pour la plupart des agents pathogènes[191]. La régulation du pH phagosomal des PMNs diffère significativement de celle observée dans les macrophages. Alors que le phagosome macrophage s'acidifie progressivement, le pH phagosomal des PMNs est initialement alcalin et reste neutre pendant des périodes prolongées[192]. Le maintien de ce pH alcalin est essentiel pour l'activation des principales sérine protéase l'élastase des neutrophiles (NE) et la cathepsine G (CG), et il est maintenu par l'activité de la NADPH oxydase, malgré la fusion continue des granules acides.

c) Granules et dégranulation

Les PMNs transportent des molécules dangereuses dans la circulation sanguine dans le but de les libérer au moment opportun. Pour cela, ces substances sont stockées dans des granules. Ces granules sont cependant bien plus que de simples organites de stockage sont indispensables à la plupart des activités des PMNs pendant l'inflammation.

Comme mentionné brièvement dans le paragraphe de la granulopoïèse, il existe trois types de granules chez les PMNs. Les granules azurophiles (également connus sous le nom de granules à peroxydase positive ou primaires) sont les plus gros et mesurent environ 0,3 µM de diamètre, et sont les premiers formés pendant la maturation des PMNs. Ils sont nommés ainsi pour leur capacité à absorber le colorant basique azur A et à contenir de la myéloperoxydase (MPO), une enzyme critique dans l'explosion oxydative[193]. Ces granules contiennent

également les défensines, le lysozyme et un certain nombre de sérine protéase: élastase de neutrophile (NE), protéinase 3 (PR3) et cathepsine G (CG)[193]. La seconde classe de granules, dites spécifiques (ou secondaires), sont plus petits (0,1 μM de diamètre), ne contiennent pas de MPO et se caractérisent par la présence de la lactoferrine. Ces granules sont formés après les granules azurophiles; ils contiennent également une large gamme de composés antimicrobiens, y compris NGAL, hCAP-18 et lysozyme[193]. La troisième classe, les granules à gélatinase (tertiaire), sont également MPO-négatifs, sont plus petits que les granules spécifiques et contiennent peu de molécules antimicrobiennes, mais ils servent de lieu de stockage pour un certain nombre de métalloprotéases, telles que la MMP-9 (gélatinase) et la MMP-25 (leucolysine). Enfin, on retrouve les vésicules sécrétoires, considérées comme faisant partie de la famille des granules des PMNs. Contrairement aux granules classiques, ceux-ci ne bourgeonnent pas à partir de l'appareil de Golgi, mais se forment par endocytose aux stades terminaux de la maturation des neutrophiles[193]. Par conséquent, leur cargaison se compose principalement de protéines dérivées du plasma telles que l'albumine. La membrane des vésicules sécrétoires sert de réservoir à un certain nombre de molécules importantes liées à la membrane et qui sont utilisées pendant la migration des PMNs.

Lors de l'activation du PMN, les granules sont mobilisés et fusionnent avec la membrane plasmique ou le phagosome, libérant leur contenu dans l'environnement respectif. Les différentes classes de granules montrent des sensibilités variables à la mobilisation en réponse aux signaux inflammatoires : les granules azurophiles sont les plus difficiles à mobiliser, suivis par les granules spécifiques, les granules de gélatinase et enfin les vésicules sécrétoires[193]. Les mécanismes sous-jacents de cette mobilisation différentielle ne sont pas entièrement compris, bien que la régulation des niveaux de calcium intracellulaire semble jouer un rôle important[194].

En raison de cette tendance à la mobilisation variable, chaque sous-ensemble de granule a été traditionnellement associé à une étape particulière d'activation des PMNs. Après leur contact avec l'endothélium, la stimulation par les sélectines et les chimioattractants induit la mobilisation de vésicules sécrétoires, dont les membranes sont riches en facteurs clés nécessaires à l'activation continue des PMNs, notamment les intégrines β2, les récepteurs fMLP, ainsi que le récepteur FcγRIII (CD16)[194]. La fusion des vésicules sécrétoires avec la membrane plasmique expose ces composants à l'environnement externe. Les granules participent donc à l'adhésion ferme, médiée par l'interaction de l'intégrine β2 avec l'endothélium. Au fur et à mesure qu'ils progressent à travers l'endothélium, les PMNs sont exposés à d'autres signaux d'activation qui déclenchent la mobilisation des granules de

gélatinase, libérant ainsi des métalloprotéases. L'activité de ces protéases peut aider les neutrophiles à traverser la membrane basale, bien que cela n'ait pas été démontré de manière concluante[195].

Au site inflammatoire, il y a une activation complète des PMNs, provoquant l'initiation notamment l'activation oxydative et la mobilisation des granules azurophiles et spécifiques. Ces granules fusionnent avec le phagosome, contribuant aux activités antimicrobiennes de ce compartiment comme décrit précédemment, ou fusionnent avec la membrane plasmique, libérant leurs puissantes molécules antimicrobiennes dans le tissu. La libération des granules primaires et secondaires contribue à la création d'un milieu antimicrobien sur le site inflammatoire. Ces molécules en plus de leur pouvoir microbicide, contribuent à l'entretien de l'inflammation. Des études récentes ont démontré que les protéines granulaires des PMNs, y compris le PR3 et l'azurocidine, peuvent induire le recrutement de monocytes[176]. De plus, les protéines granulaires neutrophiles peuvent augmenter la clairance bactérienne des macrophages en augmentant la phagocytose[196]. Cela pourrait être avantageux dans des situations où la concentration extracellulaire de protéines granulaires libérées est insuffisante pour exercer des effets microbicides étendus. Dans de tels cas, les protéines granulaires fonctionneraient comme des facteurs de signalisation et de recrutement.

d) NETose

Lors de la stimulation, les PMNs peuvent subir une forme active de mort cellulaire, appelée NETose, qui conduit à la libération de chromatine décondensée dans l'espace extracellulaire[197]. Les structures fibreuses appelées NETs contiennent des histones ainsi que des protéines granulaires et cytoplasmiques antimicrobiennes. Ils ont la propriété de piéger les bactéries et un pouvoir microbicide[198].

Le mécanisme de formation de NET n'est pas complètement élucidé. En réponse à des stimuli chimiques et biologiques, La voie réactive d'oxygène est impliquée, car la NADPH oxydase et la MPO sont nécessaires pour la formation des NETs. Cependant, il existe une voie d'activation de la NETose indépendante des ROS. Ces mécanismes seront d'avantage développés dans la partie consacrée à la NETose ainsi que le rôle de la NETose dans la défense de l'hôte contre les pathogènes puis l'effet néfaste de ce pathogène.

4. Armes de défense

a) Les espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Lors de l'activation, les PMNs produisent des ROS dans un processus appelé stress oxydant. Les ROS ne doivent pas être considérés comme une entité unique car ils sont différents notamment au niveau de leur stabilité, leur réactivité et leur perméabilité aux membranes. Les ROS ont la capacité de modifier et endommager d'autres molécules, permettant à la cellule hôte la signalisation intracellulaire et l'action antimicrobienne.

Le complexe NADPH oxydase s'assemble sur les membranes phagosomales et plasmatiques et commence la cascade de production des ROS en réduisant l'oxygène moléculaire en superoxyde (figure 6). Le superoxyde, bien que n'étant pas un oxydant fort, se transforme rapidement en peroxyde d'hydrogène. Le superoxyde peut également réagir avec l'oxyde nitrique, qui est produit à des niveaux élevés sur les sites inflammatoires, pour former un oxydant puissant, le peroxynitrite. Lors de la dégranulation dans le phagosome, la MPO peut réagir avec le peroxyde d'hydrogène pour produire diverses espèces réactives, y compris les acides hypochloreux. L'acide hypochloreux, est plus réactif que le peroxyde, possède une activité antimicrobienne *in vitro* et est supposé avoir des effets antimicrobiens directs dans le phagosome[199].

Paradoxalement, bien que la MPO soit requise pour l'activité microbicide des PMNs *in vitro*, les individus déficients en MPO ne présentent pas de manifestations cliniques évidentes[200]. Certains individus déficients en MPO souffrent d'infections fréquentes ou graves, en particulier avec des espèces de *Candida*, cependant, la plupart de ces individus déficients en MPO ont une immunité apparemment normale. Les effets bénins de la carence en MPO suggèrent que les produits de MPO ne sont pas essentiels à l'action antimicrobienne. Cela peut être expliqué par le fait qu'en l'absence de MPO, d'autres espèces réactives (par exemple, superoxyde, peroxyde d'hydrogène, radical hydroperoxyle, peroxynitrite) peuvent encore être produites dans le phagosome du PMN[199].

En plus de l'action antimicrobienne directe, les ROS peuvent modifier certaines molécules présentes de la cellule. Ces modifications entrainent l'activation de cascade de signalisation. Les ROS agissent au niveau de la signalisation par oxydation directe des résidus de cystéine contribuant à la régulation réversible de diverses cibles telles que les phosphatases, les métalloprotéinases et les caspases. De plus, les protéases présentes dans les granules des PMNs peuvent être régulées notamment par inactivation oxydative de leurs inhibiteurs ou par oxydation directe[201].

b) Les peptides antimicrobiens

Les PMNs expriment également des peptides ayant des propriétés antimicrobiennes. Parmi eux, il y a l'azurocidine (également connue sous le nom de protéine antimicrobienne cationique 37 kDa, CAP37; ou protéine de liaison à l'héparine humaine). Initialement isolée sous forme de protéine glycosylée de 29 kDa, elle a une activité contre les bactéries à Gram-négatif[202]. L'azurocidine ou ses peptides dérivés se sont également avérés agir contre certaines bactéries à Gram-positif et *C. Albicans*[203]. Des peptides dérivés de CAP37 sont également actifs contre l'adénovirus et le virus de l'herpès simplex de type I (HSV-1)[204]. L'activité antivirale semble résulter, en partie, de la perturbation de l'enveloppe et/ou de la capside. Outre ses propriétés antimicrobiennes directes, l'azurocidine a été reconnue comme un médiateur inflammatoire lors de l'initiation de la réponse immunitaire. L'azurocidine n'est pas seulement stockée dans les granules azurophiles, elle est aussi présente dans les granules sécrétoires et donc partiellement libérée à un stade très précoce de l'extravasation. Ses effets régulateurs spécifiques incluent le recrutement puis l'activation de monocytes conduisant à une libération accrue de cytokines et à une activité phagocytaire [176].

Les PMNs produisent également la cathepsine G, une protéase à sérine considérée comme fonctionnant principalement dans la dégradation des bactéries. En outre, la cathepsine G est également capable de tuer les bactéries indépendamment de son activité protéasique. En effet, le traitement de cette enzyme avec l'inhibiteur irréversible de sérine protéase, diisopropyl fluorophosphate (DFP) n'a aucun effet sur son action antimicrobienne[205].

Les PMNs produisent abondamment des α-défensines ayant un grand nombre de fonctions comme l'inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne, des propriétés antifongiques et antivirale[206]. Les cathélicidines, comme la LL-37 qui est issue de la protéolyse d'une protéine plus grande la hCAP-18, est retrouvée au niveau des filaments de NETs et possède une activité antimicrobienne[207].

Les PMNs produisent et stockent dans leurs granules azurophiles des protéines bactéricides, appelées BPI, qui augmentent la perméabilité membranaire. La BPI est capable de se lier au LPS grâce au fait qu'elle soit cationique. La liaison du BPI au LPS entraîne une augmentation de la perméabilité bactérienne et de l'hydrolyse des phospholipides bactériens[208]. Les PMNs produisent également des peptides capables de chélater des métaux essentiels au métabolisme de la bactérie de ce fait ils empêchent la croissance bactérienne. Parmi ces chélateurs, il y a la lactoferrine qui chélate le fer et la calprotectine qui chélate le zinc[209].

5. Résolution de l'inflammation

L'accumulation de PMNs au site de l'inflammation doit être par la suite éliminée. Les PMNs ayant rempli leur fonction de défense de l'organisme, un grand nombre d'entre eux deviennent apoptotiques et peuvent être nocifs pour les cellules hôte. Ainsi, le déploiement des PMNs doit être contrôlé. Bien que certains dommages collatéraux aux tissus de l'hôte soient inévitables pendant l'infection, les PMNs doivent être éliminés avant qu'ils n'aient des effets graves et néfastes sur les tissus enflammés. La résolution de l'inflammation est un processus actif qui limite la poursuite de l'infiltration des leucocytes et élimine les cellules apoptotiques des sites enflammés. Une cascade complexe et étroitement régulée se produit. Premièrement, les agents nocifs qui ont déclenché la réponse inflammatoire sont éliminés. Par la suite, la synthèse des médiateurs pro-inflammatoires est suspendue et tous les médiateurs qui restent sont catabolisés, arrêtant ainsi le recrutement des leucocytes et la formation d'œdème.

Parmi les processus importants pour la résolution de l'inflammation il y a l'apoptose. Non seulement l'apoptose réduit le nombre de PMNs présents, mais elle produit également des signaux qui permettent de réduire le recrutement des PMNs au site de l'infection. Fait intéressant, il a été suggéré que les cellules apoptotiques libèrent également de la résolvine E1 (RvE1), de la protectine D1, de la lactoferrine et de l'annexine A1, qui inhibent le recrutement ultérieur des granulocytes mais pas celui des phagocytes mononucléaires[210]. Les médiateurs lipidiques sécrétés tels que la lipoxine, la résolvines et la protectine des suites de l'interaction des PMNs avec les cellules présentes au site de l'inflammation, permettent également de résoudre l'inflammation. Ils exercent des effets spécifiques au type cellulaire, favorisant le recrutement et l'activation des monocytes/macrophages tout en inhibant les fonctions des PMNs[211]. L'effet inhibiteur s'étend à toutes les étapes essentielles des réponses des PMNs: migration, adhésion et activation[211].

La phagocytose des neutrophiles apoptotiques reprogramme également les macrophages pour adopter un phénotype anti-inflammatoire. Ce phénotype est caractérisé par une expression accrue de molécules co-inhibitrices telles que PDL1 et le ligand ICOS; la libération des cytokines anti-inflammatoires IL-10 et TGF-β; la sécrétion de facteur associé au PCNA, PGE2 et cAMP; et l'inhibition de la libération de cytokines pro-inflammatoires comprenant le TNF, le GMCSF, l'IL-1β, l'IL-12 et l'IL18[212,213]. Le défaut de la résolution de l'inflammation peut conduire à une accumulation de cellules inflammatoires, de médiateurs inflammatoires, de substances cytotoxiques, entrainant une inflammation chronique.

IV. La cytokine IL-17

L'IL-17 a été découverte en 1993, mais ses fonctions sont restées obscures pendant près d'une décennie[214]. Ce n'est qu'après la découverte d'une nouvelle sous-population de lymphocyte T CD4 auxiliaire appelée Th17 que de nombreuses études ont été réalisés pour comprendre le linéage de ces cellules et leur fonction. L'interleukine 17, sécrétée principalement par Th17, possède une activité pléiotropique passant de la protection de l'hôte contre les germes pathogènes à la modulation des réponses inflammatoires[215].

1. La famille des cytokines IL-17

Plusieurs isoformes de l'IL-17 ont été décrites dans la littérature allant de l'IL-17A à IL-17 E. Le gène IL17a, à l'origine appelé gène de l'antigène 8 associé aux lymphocytes T cytotoxiques (Ctla8), a d'abord été cloné à partir d'une banque d'ADNc de lymphocytes T cytotoxiques murins. L'IL-17A murine est une glycoprotéine de 21 kDa contenant 147 résidus d'acides aminés qui partage 63% d'identité d'acides aminés avec l'IL-17A humaine (155

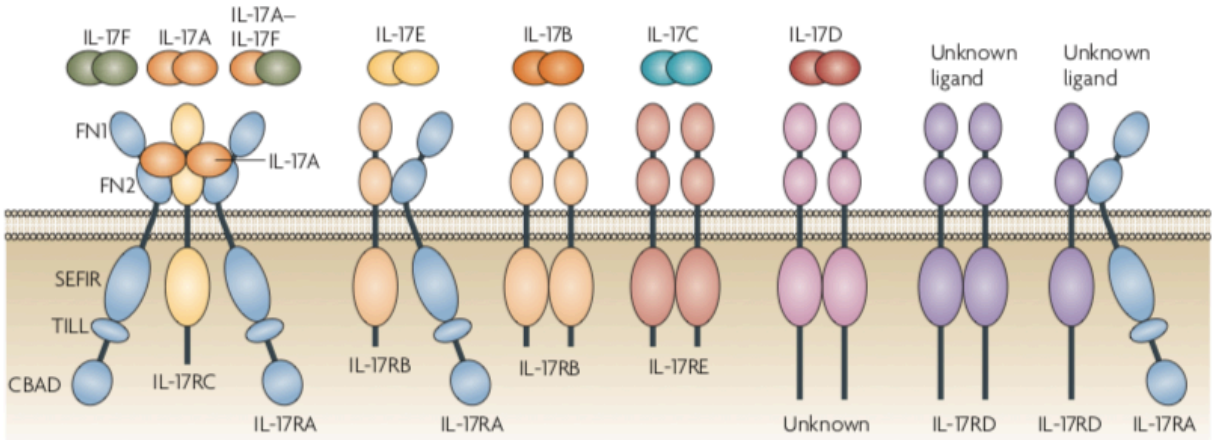

Figure 10 : les différentes IL-17 et leurs récepteurs. *Source : Sarah L. Gaffen, nature review, 2009(183)*

acides aminés). L'IL-17A de souris et humaine est sécrétée sous forme d'homodimère. Cinq cytokines supplémentaires structurellement liées ont été récemment identifiées et forment la famille IL-17: IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (également appelée IL-25) et IL-17F. Chaque membre supplémentaire de la famille IL-17 partage 16% - 50% d'identité d'acides aminés avec IL-17A[216,217]. Parmi les membres de la famille, l'IL-17A et l'IL-17F partagent l'identité de séquence d'acides aminés la plus élevée (50%), tandis que l'IL-17E est la plus divergente, avec 16% d'identité avec l'IL-17A. De plus, elles sont sécrétées sous forme d'homodimère ou d'hétérodimère IL-17 A/F. Ces molécules ont des actions pro-inflammatoires notamment en favorisant le recrutement des neutrophiles et en stimulant la production de facteurs microbicides. (figure n°9).

2. Récepteurs à l'IL-17 et voie de signalisation

a) Les différents récepteurs

La famille des récepteurs de l'IL-17 (IL-17R) comprend cinq membres (IL-17RA à IL-17RE), qui contiennent des caractéristiques structurelles conservées telles que les domaines de type fibronectine III extracellulaire et les domaines de la famille Toll-IL-1R (SEFIR)[215]. Malgré une divergence de séquence considérable, de nombreux gènes codant pour la famille d'IL-17R sont liés en cluster sur le chromosome 3 humain (IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD et IL-17RE) et les chromosomes 6 de souris (IL-17RA, IL-17RC et IL-17RE) et 14 (IL-17RB et IL-17RD). Tous sont des récepteurs contiennent un domaine transmembranaire unique, dont la taille varie de 499 à 866 acides aminés. Les IL-17A, IL-17F et IL-17A/F interagissent avec un trimère composé de deux molécules d'IL-17RA complexées avec une molécule d'IL-17RC. L'IL-17B se fixe sur l'homodimère IL-17RB/IL-17RB et l'IL-17E se fixent sur l'hétérodimère IL-17RA/IL-17RB. L'IL-17C se lie à l'homodimère IL-17RE/IL-17RE. Bien que l'IL-17D ait été étudiée, son récepteur reste à ce jour non identifié. Les récepteurs IL-17RD/IL-17RD et IL-17RD/IL-17RA n'ont aucun ligand identifié à ce jour[217].

b) Distribution et régulation

L'IL-17RA est exprimée de manière ubiquitaire, avec des niveaux particulièrement élevés dans les tissus hématopoïétiques. Les principales réponses à l'IL-17A se produisent dans les cellules épithéliales, endothéliales et fibroblastes, bien que les macrophages et les cellules dendritiques soient également réactifs[218]. Bien que son expression soit répandue, l'IL-17RA peut être régulée dynamiquement. Par exemple, IL-15 et IL-21 régulent à la hausse l'expression de IL-17RA dans les cellules T $CD8^+$ et la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) limite l'expression d'IL-17RA dans les cellules T[219]. La force de signalisation induite par IL-17A est en corrélation avec les niveaux d'expression de surface cellulaire de IL-17RA; contrairement à la plupart des récepteurs des cytokines, des niveaux élevés d'IL-17RA semblent être nécessaires pour des réponses efficaces[220]. La limitation de la signalisation passant par l'IL-17RA pourrait passer par l'internalisation du ligand suite à la liaison de son dernier au récepteur.

Le complexe de liaison à l'IL-17A est un récepteur multimérique contenant à la fois l'IL-17RA et l'IL-17RC. Cependant, ces sous-unités ont des modèles d'expression réciproques, suggérant des activités dépendantes des tissus[221]. Contrairement à l'IL-17RA, l'expression de

l'IL-17RC est faible dans les tissus hématopoïétiques et élevée dans les cellules non-immunitaires de la prostate, du foie, des reins, de la thyroïde et des articulations[221].

L'IL-17RB (également connue sous le nom d'IL-25R, Evi-27 ou IL-17rh-1) lie à la fois l'IL-17B et l'IL-17E/IL-25. Cette sous-unité est exprimée par divers tissus endocriniens ainsi que par les cellules rénales, hépatiques et Th2[222].

L'expression de l'IL-17RD est ubiquitaire avec des niveaux différentes suivant l'isoforme et les tissus[223]. Le ligand de ce récepteur n'est à ce jour pas connu. Ce récepteur a été caractérisé chez le poisson zèbre et a été identifié comme étant un inhibiteur du facteur de croissance des fibroblastes (FGF)[223]. L'IL-17RE est le récepteur le moins caractérisé cependant, une étude récente a démontré sa liaison avec l'IL-17C. Il est exprimé au niveau des lymphocytes Th17 et des cellules épithéliales[224].

c) Voie de signalisation

Suite à l'activation du récepteur par l'IL-17A, il y a une activation d'un programme d'expression génique hautement pro-inflammatoire, semblable à celle induite par les récepteurs de l'immunité inné tels que l'IL-1R et les TLR[225]. De façon similaire à ces récepteurs, l'IL-17A active le facteur nucléaire-κB (NF-κB), un facteur de transcription caractéristique associé à l'inflammation, après liaison à son récepteur (figure n°10). L'activation de la voie passe par l'activation de p50 et p65, composant de la voie d'activation classique de NF-κB. Lors de la liaison des cytokines, le complexe récepteur IL-17 subit un changement de conformation permettant l'établissement d'interactions homotypiques entre les domaines SEFIR du récepteur et l'adaptateur de signalisation Act1[226]. Act1, également connu sous le nom de CIKS, est un adaptateur requis pour toutes les voies de signalisation induites par l'IL-17A. La voie canonique repose sur l'activité ligase E3 d'Act1, qui va conduire à l'ubiquitylation de TRAF6. Cet événement conduit à l'activation de la voie de NF-kB/MAPK, comprenant ERK, p38 et JNK, ainsi que la voie CCAAT-enhancer-binding protein (C/EBP)[227]. Ensemble, ces facteurs de transcription conduisent à l'activation transcriptionnelle des gènes cibles de l'IL-17A, qui jouent un rôle clé dans l'inflammation.

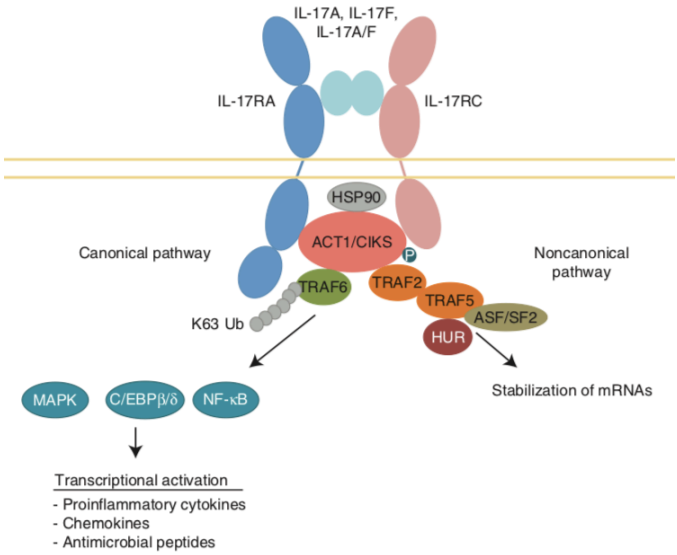

Figure 11 : Schéma du récepteur à l'IL-17A et des voies de signalisation activées. [229]

Une seconde voie non-canonique est activée par l'IL-17A, qui conduit à la stabilisation des transcrits d'ARNm, en particulier ceux codant pour les cytokines et les chimiokines. Cette voie de stabilisation de l'ARNm dépend de l'IkB kinase (IKKi) et de la phosphorylation d'Act1 médiée par TBK1[228]. TRAF2 et TRAF5 sont ainsi recrutés au niveau du complexe récepteur, ce qui se traduit par le recrutement de molécules contrôlant le renouvellement de l'ARNm[229]. En particulier, TRAF2 et TRAF5 peuvent séquestrer le facteur de déstabilisation de l'ARN ASF/SF2 et recruter le facteur de stabilisation de l'ARNm HuR, augmentant la demi-vie de divers ARNm [229].

d) Sources et cibles de l'IL-17

Les sources d'IL-17 sont nombreuses et les cellules Th17 ne sont pas les seules cellules productrices bien qu'elles soient une source importante[230]. Certaines cellules de l'immunité innée sécrètent de l'IL-17 et sont activées en quelques heures par les cytokines pro-Th17 telles que l'IL-1b, l'IL-6, l'IL-21, l'IL-23 et le TGFβ. Les cellules innées sources d'IL-17 les mieux décrites sont les cellules Tγδ, les cellules NK, les cellules NKT et les cellules lymphoïdes innées (ILC)[230]. Des études ont également montré que les PMN murins stimulés au LPS secrètent de l'IL-17[231232]. Des études sur la lignée cellulaires A549 issues de carcinome pulmonaire ont également mis en évidence la sécrétion d'IL-17A, suite à leur stimulation par la fumée de cigarette, suggérant que l'épithélium bronchique participe également à l'inflammation pulmonaire [233].

Les lymphocytes T $CD4^+$ producteurs d'IL-17 ont été classés en cellules Th17 et leur différenciation requière au préalable leur activation par les cellules présentatrices d'antigène[234]. Leur polarisation et différenciation sont gouvernées par les cytokines pro-Th17: IL-1b, IL-6, IL-21, IL-23 et TGF-β[235,236]. Les cellules Th17 ne sont pas les seules cellules adaptatives produtrices d'IL-17. Des lymphocytes T $CD8^+$ également producteurs d'IL-17 ont été décrits au cours de l'infection pulmonaire par le virus *influenza* et sont appelés Tc17[237]. Des lymphocytes T folliculaires (Tfh) et Treg $CD4^+$ produisant l'IL-17 ont été également décrits dans l'intestin[231]. Les récepteurs des cytokines IL-17 sont exprimés par les fibroblastes, les cellules épithéliales, endothéliales et les kératinocytes[215]. Au niveau de ces cellules, la signalisation de l'IL-17 passe préférentiellement par l'activation de NFκB/MAP kinase [215]. Dans la littérature, le recrutement des PMN est décrit comme dépendant de l'CXCL8/IL-8, cependant l'IL-17 pourrait également être un acteur de leur chimiotactisme et leur activation. Cela est supporté par le fait qu'ils présentent à leur surface la sous-unité IL-17RA du récepteur à l'IL-17[238]. Le contexte physiologique déterminera la finalité du signal s'il sera délétère ou bénéfique[239].

3. Le lymphocyte Th17

Les cellule Th17 sont caractérisées par la production d'IL-17A, d'IL-17F et d'IL-22. Ces cytokines ne sont pas produites par les cellules Th1 et Th2. Les cellules Th17 sont également productrices d'IL-21, bien que l'IL-21 puisse être produite par d'autres types cellulaires et lymphocytes T.

a) Différentiation des cellules Th17

i. Facteurs requis

Le développement des cellules Th17 à partir de cellule naïve $CD4^+$ est entrainé par des cytokines sécrétées par les cellules dendritiques et les macrophages en réponse à des pathogènes extracellulaires. Ces cellules après activation vont secréter de l'IL-1, de l'IL-6 et de l'IL-23 qui vont permettre la différenciation des cellules naïves en Th17[240]. Le TGF- β malgré son activité inhibitrice du système immunitaire, participe également à la différenciation des cellules Th17. Le TGF-β est nécessaire pour induire RORγt, mais l'expression et la fonction de ce dernier sont inhibées par un excès de TGF-β[241]. Ce n'est que lorsque des cytokines telles que IL-6 ou IL-1β sont présentes que le RORγt est libéré de l'inhibition, et alors les lymphocytes T naïfs peuvent commencer à transcrire l'IL-17[241]. L'IL-21 ajoutée au TGF- β permet également la différenciation des LT naïfs en LT Th17[242].

ii. *Facteurs de transcription impliqués*

Les signaux précédemment cités induisent et activent des facteurs de transcription spécifiques responsables de l'expression de gènes spécifiques de la lignée. Parmi les gènes spécifiques exprimés dans la ligne Th17, sont retrouvés les gènes des cytokines IL-17 et IL-22.

Le récepteur nucléaire de type récepteur stéroïdien des facteurs de transcription RORγt, qui est un variant d'épissage de RORγ exprimé dans les cellules T, est exprimé sélectivement par les cellules Th17 différenciées *in vitro*[241]. RORγt semble être nécessaire pour la production d'IL-17, car les souris reconstituées avec la moelle osseuse de souris déficientes en RORγt présentent une différenciation de Th17 altérée[243]. De même, la transfection de cellules T naïves avec un vecteur rétroviral contenant RORγt, permet le développement de cellules T productrices d'IL-17[244]. Cependant, dans des modèles murins déficients en RORγt, il subsiste des cellules productrices d'IL-17 bien que leur nombre soit diminué. Un autre membre de la famille des récepteurs nucléaires des rétinoïdes, RORα, est également exprimé sélectivement dans les cellules Th17 de manière très similaire à RORγt. Une étude récente a rapporté que RORα pourrait remplir un rôle similaire mais non-identique à RORγt dans la différenciation des cellules Th17, suggérant que la différenciation des cellules Th17 pourrait être dictée par deux facteurs de transcription spécifiques à la lignée[244]. Cependant, les mécanismes par lesquels RORγt et éventuellement RORα régulent la production d'IL-17 n'ont pas encore été complètement élucidés. Bien qu'il existe un site potentiel de liaison pour ROR dans le promoteur du gène codant pour l'IL-17, la liaison directe de RORyt à ce promoteur n'a pas été établie. RORγt et RORα sont tous deux fortement induits par IL-6 ou IL-21 en présence de faibles quantités de TGF-β[245].

Le facteur de transcription STAT3 pourrait affecter l'expression de l'IL-17 en augmentant l'expression de RORγt et RORα[244]. Cependant, STAT3 se lie directement aux promoteurs des gènes codant pour l'IL-17 et pour l'IL-2[246]. Par conséquent, STAT3 et RORγt semblent coopérer dans la production d'IL-17.

Le facteur de régulation de l'interféron 4 (IRF4), qui était auparavant associé à la différenciation des sous-ensembles Th1 et Th2, est également nécessaire pour la différenciation des cellules Th17. En effet, des souris déficientes pour le gène codant pour IRF4 ne parviennent pas à générer des cellules Th17. Conformément à cette observation, les cellules T déficientes en IRF4, ne présentent pas de hausse de RORyt après stimulation avec l'IL-6 et le TGF-ß et ne se différencient pas en cellules Th17[247]. Cependant, la surexpression

de RORγt dans les cellules T déficientes en IRF4 ne permet pas de restaurer l'induction complète de l'expression d'IL-17, suggérant à nouveau que l'IRF4 ou ses cibles en aval pourraient être indispensables pour un engagement total des cellules T naïves dans la lignée Th17. Une coopération étroite entre IRF4 et RORγt semble être nécessaire à la génération de cellule Th17.

b) Fonctions effectrices des cellules Th17 dans la maladie

i. Maladies inflammatoires de la peau

Le psoriasis est une maladie inflammatoire chronique de la peau caractérisée par une hyperplasie des cellules de l'épiderme, une angiogenèse cutanée et une infiltration de monocytes, de cellules dendritiques (CD) et de lymphocytes T. Les cellules Th1 et Th17 ont un rôle dans la pathogenèse du psoriasis, en raison des niveaux élevés des nombreuses cytokines inflammatoires qui leurs sont spécifiques. Sont surexprimées dans le sérum et la peau lésionnelle des malades, les cytokines Th1 telles que l' IFN-γ, l'IL-2 et l'IL-18, ainsi que des cytokines de type Th17, l'IL-17A, l'IL-17F, l'IL-22, l'IL-26 et le TNF-α (une cytokine également secrétée par les cellules Th1)[248]. Le rôle de l'IL-17 dans la pathogenèse du psoriasis a été en outre étayé par une expression accrue de RORc, IL-6, IL-1β et IL-23 dans la peau psoriasique par rapport à la peau non impliquée ou à la peau d'individus en bonne santé. Certaines études ont suggéré que l'IL-15 peut également induire l'IL-17, et il a été démontré que la neutralisation avec l'aide d'anticorps dirigés contre l'IL-15 peut améliorer le psoriasis chez un modèle murin[249].

La présence d'IL-22 en quantité élevée dans le sang des patients atteints de psoriasis comparé aux sujets sains et l'IL-22R exprimé sur les cellules épithéliales, régule la prolifération et la différenciation des kératinocytes[250,251]. Des études récentes ont montré que l'IL-22 est exprimée par les cellules Th17 et que l'IL-22 et l'IL-17 peuvent induire des peptides antimicrobiens couramment observés dans la peau psoriasique lors de la stimulation *in vitro* des kératinocytes primaires[252]. De plus, les taux d'IL-22 dans le plasma étaient corrélés à la gravité de la maladie, et l'IL-22 dans la peau psoriasique était associée à une expression accrue des peptides antimicrobiens et des métalloprotéinases matricielles (MMP)[250]. Les cellules Th17 différenciées par l'IL-23 *in vitro* et les cellules T dérivées de la peau lésionnelle de patients atteints de psoriasis sont capable d'induire l'expression de peptides antimicrobiens par des kératinocytes épithéliaux issus de tissus sains humains dépendamment de l'IL-17.

Des études cliniques ont démontré l'implication des Th17 dans le psoriasis. En effet le ciblage de la sous unité p40 partagée par l'IL-12 et l'IL-23 avec des anticorps monoclonaux, s'est révélé prometteur[253]. L'étendu des plaques était diminué de façon dose dépendante et il était observé que cette amélioration était associée à une diminution des taux d'ARNm de plusieurs cytokines pro-inflammatoires, y compris la sous-unité p19 de l'IL-23[254]. Les traitements par des inhibiteurs du TNF-α montrent chez les patients traités, une baisse rapide des cytokines spécifiques de Th17 : l'IL-17, l'IL-22, l'IL-6, l'IL-1β et l'IL-23, ainsi que la CCL20 et les peptides antimicrobiens. Par contre, les cellules effectrices Th1 interviennent plus tardivement. Cette observation suggère que les cellules Th17 sont particulièrement importantes dans la physiopathologie du psoriasis, tandis que les cellules Th1 jouent un rôle mineur dans la pathogenèse[255].

ii. Sclérose en plaques

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie inflammatoire auto-immune dirigée contre le système nerveux central. Les cytokines pro-inflammatoires ont longtemps été suspectées d'avoir un rôle dans l'induction et la pathogénèse de cette maladie. Parmi les premières cytokines décrites comme étant associées à la maladie, il y a l'IL-6, l'IFN-γ, le TNF-α et l'IL-1β[256]. Récemment, des taux élevés d'ARNm codant pour l'IL-17 ont été retrouvés dans le sang et le liquide céphalo-rachidien (LCR) des patients[257]. La différenciation des cellules Th17 est dépendante de l'IL-6 et l'IL-1β, soutenant le rôle pathogénique des Th17 dans la sclérose en plaque. C'est avec l'aide de modèle murin d'encéphalomyélite auto-immune (EAE) que le rôle de l'IL-17 a pu être exploré. En effet, l'administration d'anticorps neutralisant l'IL-23, a permis de retarder et de diminuer l'apparition de la maladie tout en diminuant sa gravité dans les modèles animaux d'EAE[257].

Une comparaison des patients asiatiques atteints de SEP par rapport aux sujets témoins a montré des taux accrus d'IL-17 et d'IL-8 dans le LCR des patients atteints de la forme optico-spinale la plus sévère de la maladie. Les niveaux d'IL-17 et d'IL-8 étaient en corrélation avec l'étendue de l'inflammation de la moelle épinière mesurée par imagerie par résonance magnétique et la fuite d'albumine dans le LCR[258]. Le tissu médullaire autopsié a montré un afflux remarquable de PMNs et de graves dommages à la myéline et aux axones de la moelle épinière thoracique[258]. Une étude récente a montré que les cellules T $CD4^+$ humaines différenciés vers un phénotype Th17 pourraient plus efficacement traverser une couche de cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique que leurs homologues différenciés en Th1[259]. Ces cellules endothéliales expriment des niveaux inférieurs de protéine de jonction

serrée telles que l'Occludine et le ZO-1 après culture avec de l'IL-17 humaine recombinante ou l'IL-22, mais le prétraitement de ces cellules avec l'IL-17 et l'IL-22 améliore la transmigration de lymphocytes T $CD4^+$ du sang périphérique humain fraîchement isolés suggérant une augmentation de la porosité de la barrière[259]. Ces données suggèrent que l'un des rôles des cellules Th17 dans la SEP est d'affaiblir la barrière hémato-encéphalique, permettant l'afflux d'albumine sérique, de lymphocytes T $CD4^+$ et de PMNs ; ces derniers sont attirés par l'IL-8 dont les taux sont élevés dans le LCR. Ces données suggèrent que les Th17 jouent un rôle important dans cette pathologie. Cependant d'autres travaux sont nécessaires pour caractériser les effets de l'IL-17 et de l'IL-22 sur les cellules endothéliales du cerveau humain, les astrocytes et les cellules microgliales dans la SEP.

iii. MICI/Maladies inflammatoires de l'intestin

Comme dans d'autres maladies inflammatoires qui attaquent les tissus, les cellules Th17 émergent comme les principales cibles d'intervention contre les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), en particulier la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique[260]. Plusieurs études sur des modèles murins de MICI spontanés ou induits par des bactéries ont établi que l'IL-23 est une cytokine essentielle pour l'inflammation intestinale[261]. Ces données chez la souris permettent de comprendre le mécanisme de rémission clinique de la maladie de Crohn médié par des anticorps dirigés contre la sous-unité p40 qui est commune avec l'IL-12[262]. Les cellules Th17 ne nécessitent pas d'IL-23 pour un engagement précoce dans la lignée Th17, mais utilisent plutôt IL-23 pour soutenir la production d'IL-17 et promouvoir la fonction effectrice. L'IL-1β et l'IL-6 sont identifiées comme des médiateurs de l'inflammation intestinale ; leur production avec le TNF-α étant principalement attribuée aux monocytes/macrophages activés dans la *lamina propria* intestinale[263]. Cependant des cellules T $CD4^+$ isolées du sang périphérique et de l'intestin de patients atteints de la maladie de Crohn produisent de l'IL-17 *in vitro* suite à leur stimulation avec de le Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) et de l'ionomycine. Chez les patients atteints de la maladie de Crohn ou de la colite ulcéreuse on observe également un grand nombre de cellule $CD4^+$ Th17 au niveau de la *lamina propria*[264]. L'IL-22, produite par les cellules Th17, est également surexprimée au niveau des cellules T $CD4^+$ du côlon de patient MICI par rapport aux témoins sains[265]. Ainsi, les cellules Th17 semblent coloniser la *lamina propria* intestinale au cours des MICI.

Les fonctions effectrices de l'IL-17 et de l'IL-22 au cours de l'inflammation de l'intestin humain commencent tout juste à être élucidées. L'IL-17A semble induire l'expression du G-

CSF à partir de cellules péritonéales humaines, un mécanisme qui favorise l'accumulation de PMNs dans le péritoine[266]. Il a été démontré que l'IL-17A et l'IL-17F, mais pas les autres membres de la famille de l'IL-17, stimulent la production de MMPs et la libération de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-6, l'IL-8, par les myofibroblastes sous-épithéliaux coliques humains primaires[267]. Des résultats très similaires ont été obtenus avec de l'IL-22[265]. En plus des MMPs et des cytokines inflammatoires mentionnées ci-dessus, il a été démontré que l'IL-22 induisait l'IL-11, la MMP-10 et plusieurs chimiokines attirant les PMNs[265]. Ces résultats suggèrent que les cellules Th17 et les médiateurs inflammatoires qui les induisent (IL-1β, IL-6 et IL-23) agissent de concert dans la physiopathologie de la maladie.

iv. Asthme

L'asthme est une maladie respiratoire chronique caractérisée par une inflammation permanente des bronches. Il se manifeste par des épisodes de gêne respiratoire (essoufflement), de respiration sifflante, de toux sèche ou de sensation d'oppression dans la poitrine lors des crises d'asthme.

L'IL-17 est retrouvée a des concentrations élevées dans les échantillons de crachats provenant de patients asthmatiques[268]. Une étude effectuée sur des clones de lymphocyte T issus de sang périphérique de patients asthmatiques stimulés avec des allergènes d'acariens a permis de démontrer la présence de cellule productrice d'IL-17 et donc la présence de cellules Th17[109]. L'IL-17 a plusieurs fonctions dans la physiopathologie de l'asthme. Les fibroblastes bronchiques humains répondent à la stimulation par l'IL-17 *in vitro* en produisant de l'IL-6, de l'IL-8 et du GRO-α[268]. L'IL-8 et le GRO-α sont des chimioattractants connus des PMNs, et l'IL-6 est une cytokine qui active les PMNs[269]. Ainsi, l'expression accrue de l'IL-17 dans le poumon pendant l'asthme peut expliquer l'accumulation et l'activation accrues des PMNs pulmonaires. De même, les cellules musculaires lisses des voies aériennes stimulées par l'IL-17 produisent de l'IL-8 et de l'IL-6, et cette production est augmentée en présence d'IL-1β[270]. L'éotaxine-1 (CCL11), puissant chimioattractant des éosinophiles, est également secrété dans les mêmes conditions[271]. En plus des PMNs, l'IL-17 semble contribuer au recrutement d'autres cellules inflammatoires au cours de l'asthme.

c) L'IL-17 dans le recrutement des PMNs

Le milieu conditionné d'une lignée de cellules épithéliales bronchiques humaines stimulée préalablement par l'IL-17 induit le chimiotactisme des PMNs humains *in vitro*[272]. Il est

probable que la majeure partie de cet effet soit médiée par la libération de l'IL-8, car l'activité chimiotactique du milieu conditionné est bloquée par un anticorps neutralisant dirigé contre l'IL-8 alors que l'IL-17 seule n'a aucun effet sur le recrutement des PMNs *in vitro*[272].

La stimulation intratrachéale avec de l'IL-17 provoque un recrutement similaire et substantiel des PMNs dans les voies respiratoires du rat *in vivo*[273]. Ce recrutement est visible jusqu'à 8 h après stimulation avec l'IL-17, suggérant un effet prolongé. Un prétraitement avec un anticorps neutralisant anti-IL-17 atténue le recrutement des PMNs, soulignant la spécificité de l'effet de l'IL-17 dans le recrutement des PMNs[272]. Le prétraitement par le dexaméthasone atténue l'effet de l'IL-17 sur le recrutement des PMNs dans les voies respiratoires du rat, soulignant un mécanisme d'action sensible aux stéroïdes *in vivo* et *in vitro*[272]. Ceci est compatible avec l'idée que les effets bénéfiques des glucocorticoïdes sont dus à l'inhibition de la production excessive de cytokines[274]. L'IL-17 recrute sélectivement les PMNs dans les voies respiratoires de rat *in vivo* et cet effet est modulé par les tachykinines endogènes agissant via les récepteurs NK-1. L'inhibition des tachykinines, entraîne une augmentation du recrutement des PMNs au sein des voies respiratoires des rats ayant eu une instillation trachéal d'IL-17[273]. Les tachynikines ont donc un effet inhibiteur sur le recrutement des PMNs par l'IL-17. L'antagoniste sélectif des récepteurs NK-1 (SR140333) entraine une diminution du nombre de PMNs dans le lavage bronchoalvéolaire des rat, après stimulation intratrachéale avec la hIL-17[273]. Cette découverte suggère que le récepteur NK-1 est une cible importante pour les tachykinines endogènes.

d) L'IL-17 dans la BPCO

Dans la littérature, beaucoup d'études sur l'implication de l'IL-17 dans la BPCO ont été menées. Au niveau des études cliniques, de nombreuses corrélations entre la concentration de cette cytokine et l'état des patients ont été observées[132]. La concentration d'IL17 sanguine est augmentée chez les patients BPCO comparés aux sujets sains et augmente avec la gravité de la maladie[132]. De même pour les cellules Th17 et Tc17 qui sont en nombre important dans le sang des patients BPCO et corrélé à la sévérité de la maladie[133 134]. Ces observations suggèrent une importante inflammation de type Th17 systémique chez ces patients.

Au niveau du parenchyme pulmonaire, les concentrations en IL-17 sont également importantes et corrélées au degré d'obstruction des bronches de patient BPCO[275]. Cela est également visible sur des biopsies bronchiques issus de patients BPCO montrant un marquage cellulaire immunofluorescent et immunohystochimique important à l'IL-17A et IL-17F

révélant une augmentation de la fréquence de cellules exprimant l'IL-17A et l'IL-17F chez les patients BPCO comparé aux sujets sains[276,277]. La concentration augmentée en IL-17 est également en corrélation avec l'augmentation numéraire des PMN au sein des expectorations des patients BPCO. A noter, que l'IL-17A induit directement l'apoptose des cellules alvéolaire de type 2, confirmant son rôle délétère [278].

Les données cliniques sur les exacerbations et l'exploration des concentrations cytokiniques chez les patients BPCO confirment également l'importance de l'IL-17 dans les phénomènes d'exacerbation. En effet, la concentration sanguine en IL-17 est augmentée chez les patients BPCO en phase d'exacerbation comparée à celle des sujets stables[279]. Des études menées sur des sujets BPCO en phase d'exacerbation suite à une infection par la bactérie Haemophilus influenzae Non typable (non encapsulé) ont révélé une augmentation de la concentration sérique en IL-17 qui a tendance à diminuer après le retour à l'état stable[280]. Ces observations renforcent l'idée du rôle physiopathologique de l'IL-17 lors des exacerbations de la BPCO.

Les modèles animaux ont beaucoup aidé à démontrer l'importance de l'IL-17 dans la chronicité de la réaction inflammatoire pulmonaire notamment en médiant le recrutement et l'activation de neutrophiles et de monocytes/macrophages[225]. Le profil Th17 a également été confirmé chez les modèles murins développant un emphysème suite à une exposition chronique à la fumée de cigarette. L'utilisation de souris déficientes en IL-17 ou l'administration d'anticorps neutralisants dirigés contre l'IL-17A, ont permis d'observer une réduction de l'inflammation induite par l'exposition chronique à la fumée de cigarette [281]. Ces résultats ont été confirmés par le groupe de Roos et al, sur les souris déficientes en IL-17RA ou traitées avec des anticorps neutralisants l'IL-17 qui ont une réduction du recrutement des neutrophiles, de la production d'IL-17, de CXCL1 et de CXCL5 suite à l'exposition à la fumée de cigarette associée ou non à l'infection par NTHi (Non typeable Haemophilus influenzae)[280]. Dans les modèles d'emphysème induits par l'instillation intratrachéale de peptide d'élastine, les souris déficientes en IL-17A ne développent pas d'emphysème[126]. Il est observé chez ce modèle une diminution du nombre de neutrophile au sein du parenchyme pulmonaire ainsi qu'une concentration plus faible de leurs chémoattractants : KC/CXCL1 et MIP-2/CXCL2[282]. Ces modèles murins permettent de confirmer le rôle important de l'IL-17 et des PMN dans la physiopathologie de la maladie. La production d'IL-17 par les NKT entraine un recrutement de neutrophiles qui est associé à des lésions pulmonaires de type emphysémateuses[283]. Ces résultats chez la souris sont concordant avec la clinique puisque les concentrations en IL-17 sont corrélées avec le nombre de neutrophile au sein du parenchyme pulmonaire confirmant que cette cytokine agit de concert avec les neutrophiles dans la BPCO.

L'ensemble de ces travaux semblent impliquer l'IL-17 dans la physiopathologie de la BPCO, et cela à différents stades de la maladie, de façon local ou systémique. Cependant le mécanisme par lequel elle exerce son effet n'a pas été exploré. L'IL-17, stimule plusieurs cellules comme les cellules épithéliales qui a leur tour sécrètent des chimiokines telles que l'CXCL8/IL-8 à l'origine du recrutement des PMN[284]. Cependant, le lien direct entre l'IL-17 et les PMNs n'a pas encore été établi, de même en ce qui concerne son rôle dans leur activation et l'induction de le NETose des neutrophiles n'a pas encore été élucidé.

V. Le Virus Respiratoire Syncitial

1. Le VRS : agent principal associé à la bronchiolite

Le virus respiratoire syncytial humain (VRS) a été isolé pour la première fois chez des chimpanzés en 1956 et a ensuite été trouvé chez des nourrissons atteints d'une grave maladie des voies respiratoires inférieures[285,286]. Il s'agit d'un virus à ARN enveloppé monocaténaire à sens négatif non segmenté et qui appartient à la famille des *Paramyxoviridae*, genre *Pneumovirus*, sous-famille *Pneumovirinae*. Ses 10 gènes codent pour 11 protéines puisque deux cadres de lecture ouverts se chevauchant dans l'ARNm M2 donnant deux protéines de matrice distinctes, M2-1 et M2-2 (figure n°11). L'enveloppe virale contient trois protéines, la glycoprotéine G, la glycoprotéine de fusion (F) et la petite protéine hydrophobe (SH). La protéine G permet l'attachement du virus à la cellule hôte et la protéine F est responsable de la fusion et de l'entrée cellulaire, tandis que la protéine SH n'est requise dans aucun de ces processus. Le VRS comprend cinq autres protéines structurales, la grande protéine (L), la nucléocapside (N), la phosphoprotéine (P), la matrice (M) , et deux protéines non-structurales (NS1 et NS2). Il existe un seul sérotype de VRS avec deux sous-groupes antigéniques majeurs, A et B. Sur les 177 prélèvements nasopharyngés positifs pour le VRS obtenus entre 1993 et 1996, 85 (48 %) étaient disponibles pour le typage. Soixante-treize (85,9 %) spécimens ont été identifiés comme appartenant au sous-groupe A et 12 (14,1 %) au sous-groupe B[287]. Les humains ne sont pas les seuls hôtes du VRS, et les raisons de la quasi-disparition du VRS entre les épidémies restent floues. Après une épidémie, les titres moyens d'anticorps neutralisants contre le VRS d'origine maternelle diminuent chez les nourrissons hospitalisés consécutivement âgés de moins de 6 mois et atteignent le taux le plus bas peu de temps avant le pic de l'épidémie suivante au Danemark[288].

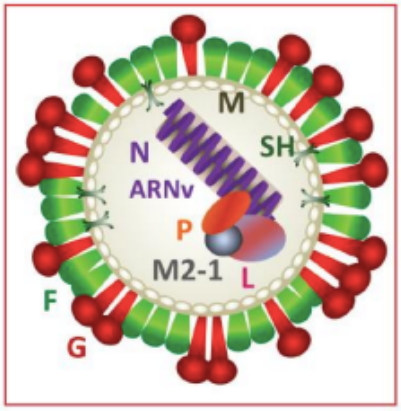

Figure 12 : Représentation schématique du VRS.

Généralement, la plupart des enfants ont subi au moins une infection par le VRS à l'âge de 2 ans. Ceci est basé sur les résultats de la Houston Family Study, dans laquelle une cohorte de naissances de 125 nourrissons a été suivie de manière prospective au cours de la période 1975–1980. Au cours de leur première année de vie, 68% des nourrissons ont été infectés par le VRS; à la fin de la deuxième année, presque tous les enfants avaient été infectés par le VRS au moins une fois[289]. Un déterminant important du taux d'infection semble être la gravité de l'épidémie de VRS, qui varie d'une année à l'autre, et bien sûr l'étendue de l'exposition individuelle[290,289]. Dans une garderie, pratiquement tous les enfants ayant subi leur première exposition au VRS au cours d'une épidémie majeure étaient infectés, alors que le taux n'était que de 40% les années sans épidémie majeure[290].

Les manifestations cliniques vont d'une maladie bénigne des voies respiratoires supérieures ou d'une otite moyenne, à une atteinte sévère et potentiellement mortelle des voies respiratoires inférieures. La forme la plus courante d'atteinte sévère chez les nourrissons infectés par le VRS est la bronchiolite, mais la pneumonie et le croup sont également observés. L'atteinte des voies respiratoires inférieures survient chez 15 à 50 % des nourrissons et des jeunes enfants atteints d'une infection primaire par le VRS et nécessite une hospitalisation dans 1 à 3 % de la cohorte annuelle de naissance. Les nourrissons âgés de 2 à 6 mois sont les plus à risque[291]. Chez 5 à 10 % des nourrissons hospitalisés, la maladie nécessite souvent une admission en unité de soins intensifs. Les décès sont rares chez les nourrissons en bonne santé et nés dans les pays industrialisés, mais les taux de mortalité sont significativement plus élevés chez les nourrissons et les enfants des pays en développement et chez les patients atteints de maladies cardiaques ou pulmonaires préexistantes ou d'autres maladies chroniques[292,293].

2. Le cycle infectieux du VRS

a) Attachement

Pour pouvoir infecter la cellule hôte, le virus doit pouvoir s'attacher spécifiquement à la cellule cible. L'attachement consiste donc à la première étape du cycle viral. Dans ce phénomène, la protéine G a un rôle essentiel et son interaction avec les glycosaminoglycanes (GAGs) est nécessaire à l'attachement de la particule virale à la membrane cellulaire[294]. L'utilisation d'anticorps neutralisants dirigés contre la protéine G, inhibe l'attachement des virus aux cellules hôtes[295]. Cependant dans des virus modifiés où les gènes codants pour la protéine G et la protéine SH ont été supprimés, les virons sont tout de même capables d'infecter les cellules *in vitro*. Ces résultats suggèrent que l'interaction entre la protéine G et les GAGs n'est peut-être qu'une première étape pour l'attachement. Ceci suppose également que parmi les protéines présentes sur l'enveloppe, seule la protéine de fusion F est essentielle à l'infection des cellules hôtes[296].

b) Fusion

Après la fixation du virus à la surface de la cellule hôte, il s'opère un changement conformationnel de la protéine de fusion F. Ce changement conduit à la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire. La protéine F est également responsable de la formation de *syncytium*, qui consiste en la fusion des membranes des cellules infectées et adjacentes[297]. Après la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire, l'ensemble du contenu du virion est déversé dans la cellule. Il est établi que la pénétration du virus dépend du réseau d'actine intracellulaire[298].

c) Transcription

La transcription du génome viral est effectuée par la polymérase L grâce à un mécanisme d'arrêt/démarrage. L'activité de la polymérase est dépendante du réseau d'actine. La transcription débute à l'extrémité 3' où se situe l'unique promoteur transcriptionnel. La polymérase initie la synthèse d'ARN au niveau de ce promoteur puis progresse le long du génome. La machinerie de la cellule hôte va alors traduire l'ARN généré, ainsi les protéines virales vont être synthétisées. Lorsque le gène codant pour le cofacteur M2-2 de la polymérase virale est transcrit, il induit la transition de la transcription à la synthèse d'ARN génomique[299]. Pour répliquer le génome, la polymérase se lie à un promoteur et initie la synthèse d'ARN à l'extrémité 3'. Dans ce cas, lorsque la polymérase se déplace le long de la matrice, elle génère un complément d'ARN de sens positif de pleine longueur du génome, l'antigénome[299].

d) Assemblage et bourgeonnement

Après synthèse, l'ARN génomique et l'ARN anti-génomique sont encapsulés avec la nucléoprotéine virale N. A ce complexe s'ajoute également la phosphoprotéine P, la polymérase L et son cofacteur M2-1 générant le complexe appelé RNP pour rinucléoprotéique[300]. Le transport cytoplasmique des complexes RNP nouvellement formés à la membrane est effectué grâce à l'interaction de la protéine de matrice M avec le cytosquelette. Les virions sont alors formés des suites du bourgeonnement à la membrane plasmique. Il a été observé que les complexes RNP sont formés au sein de corps d'inclusion co-localisant avec l'actine dans des modèles de cellules épithéliales humaines (exemple : Hep2)[301].

3. Structure des protéines virales du VRS et récepteurs principaux

a) Structure de la protéine G d'attachement du VRS

La protéine G de VRS a été isolée et décrite pour la première fois par Seymour Levine à partir de virions purifiés produits dans les cellules HeLa. Elle est décrite comme une protéine fortement glycosylée de 80 kDa[302]. Selon la souche, le squelette de la protéine G contient 289 à 299 acides aminés (32 à 33 kDa) et est palmitoylé[303]. Il y a 30 à 40 glycanes liés à l'atome d'Oxygène et 4 à 5 glycanes liés à l'azote. La protéine G a des similarités avec les mucines produites dans les voies respiratoires malgré le fait qu'elle ait une masse moléculaire beaucoup plus petite[304]. La région centrale de la protéine G contient un domaine hautement conservé de 13 acides aminés, chevauchant partiellement le domaine noose de la cystéine avec 4 cystéines liées 1–4 et 2–3, suivi d'un domaine de liaison à l'héparine hautement basique (HBD)[305]. Le HBD est le site de fixation probable du sulfate d'héparane (HS) présent à la surface de la plupart des cellules. Un peptide HBD correspondant aux acides aminés 184–198 se lie efficacement aux cellules HEp-2 et inhibe l'infection par le VRS[306]. Cette région centrale est flanquée par deux grands domaines de types mucines ayant de grandes variabilités de séquences, faisant de la protéine G la protéine la plus variable du VRS. La teneur globale en sérine et en thréonine de ces deux régions est relativement stable et est déterminante pour la structure tridimensionnelle de la protéine[307,304].

Il existe une forme soluble de la protéine G du VRS (sG) qui est 65 à 74 acides aminés plus courte que la protéine G complète du coté N terminal. Sa traduction commence par le deuxième AUG (codon 48) dans l'ARNm codant pour la protéine G, ce qui supprime le domaine cytoplasmique et une partie du domaine transmembranaire[308]. La partie hydrophobe restante de la protéine G est essentielle pour sa translocation dans la lumière du réticulum endoplasmique pendant la traduction et maintiendrait probablement son association

membranaire jusqu'à ce qu'un événement protéolytique libère la sG dans le milieu. Cet événement n'est à ce jour pas encore bien compris. La sG est secrétée sous forme de monomère[309].

b) Structure de la protéine de fusion du VRS

Le gène F code pour une protéine membranaire intégrale de type I qui est synthétisée sous forme d'un précurseur inactif de 574 acides aminés décoré de 5 à 6 glycanes liés à un atome d'azote, selon la souche[310]. Trois monomères de précurseurs s'assemblent en trimère et, lorsque le trimère traverse l'appareil de Golgi, les monomères sont activés par la protéase furin[311,312]. La protéase clive la protéine F à deux endroits, générant trois polypeptides [313]. Les produits de clivage N-terminal et C-terminal sont liés de manière covalente l'un à l'autre par deux liaisons disulfure[314]. Le peptide intermédiaire de 27 acides aminés se dissocie après clivage[315]. La sous-unité F2 contient deux glycanes, tandis que la plus grande sous-unité F1 en contient un seul. Contrairement aux autres, le glycane situé sur le F1 est essentiel pour que la protéine provoque la fusion membranaire[316].

La glycoprotéine F est hautement conservée parmi les sous-groupes A et B du VRS, avec des identités de séquence d'acides aminés de 90 % ou plus. Une grande partie de la variabilité de F se trouve au niveau du site antigénique au sommet du trimère de préfusion composé d'une hélice de F1 (aa 196-210) et d'un brin de F2 (aa 62-69) et peut être un site qui détermine l'immunité spécifique au sous-type[317]. Cette conservation de la séquence combinée à sa localisation en surface sur le virion et à son rôle obligatoire dans l'entrée virale font de la protéine F une cible idéale pour les anticorps neutralisants[318].

c) Les récepteurs du VRS

La protéine G a de nombreux récepteurs identifiés à ce jour. Ainsi, les glycosaminoglycanes (GAGs), notamment l'héparane sulfate, sont capables de se lier à la protéine G. Les GAGs sont des polymères linéaires non ramifiés d'unités disaccharidiques répétées, produites et associées à la plupart des cellules des mammifères. Les deux sucres qui composent le disaccharide sont l'acide glucuronique ou l'acide iduronique, et un sucre aminé, le glucosamine ou le galactosamine. Des sulfates sont ajoutés à diverses positions sur la chaîne disaccharidique, conférant une charge négative à ces molécules. La protéine G semblerait s'attacher préférentiellement à l'héparane sulfate dans les études in vivo effectuées sur des cellules immortalisées. Cependant dans les cultures de cellules primaires, l'héparane

sulfate n'est pas retrouvé au niveau de la surface apicale suggérant que le VRS utilise d'autres recepteurs[319].

La protéine G possède la particularité d'avoir un motif moléculaire semblable à celui de la fractalkine. Ce motif lui permet d'interagir avec le récepteur de cette chimiokine, le CX3CR1[320]. Cette interaction permet l'infection de la cellule hôte et aurait un rôle crucial à jouer dans la sévérité de la pathogenèse associée à l'infection virale[320]. Ce deuxième récepteur identifié permet d'expliquer l'infection des cellules hôte indépendamment de l'héparane sulfate. De études récentes ont aussi proposé que la protéine G pourrait interagir avec la L-sélectine et l'annexine II. L'utilisation de ces composés ou d'antagonistes inhibant l'infection par le VRS *in vitro* et *in vivo* suggèrent que la L-sélectine et l'annexine II pourraient être des récepteurs du VRS sur les leucocytes et les cellules épithéliales[321].

Parmi les autres récepteurs, la nucléoline jouerait aussi un rôle de récepteur cellulaire du VRS[322]. La nucléoline est une protéine associée à l'actine cellulaire et interagissant avec la protéine F. D'autres protéines de surface cellulaire qui interagissent avec la protéine F et pourraient fonctionner comme des récepteurs ont été identifiées comme ICAM-1 et TLR4[323,324]. Une ou plusieurs de ces protéines hôtes peuvent être impliquées dans la fixation des virions aux cellules cibles, via la protéine F. Cependant, ces molécules ont été étudiées dans des cellules immortalisées ou des cellules non-sensibles à l'infection par le VRS. Ces études doivent être menées *in vivo* afin de déterminer leur disponibilité et leur fonction sur l'épithélium des voies aériennes.

4. Physiopathologie du VRS

a) Obstruction des voies respiratoires inférieures

Le VRS humain est une cause majeure d'infection aiguë des voies respiratoires inférieures chez les nourrissons, les enfants et les personnes âgées, mais aussi chez les adultes de tout âge présentant un système immunitaire affaibli ou des pathologies cardio-pulmonaires. Les pathologies associées au VRS vont des maladies bénignes des voies respiratoires supérieures, y compris l'otite et la rhinite, aux maladies aiguës des voies respiratoires inférieures mettant la vie des patients en danger comme la bronchiolite et la pneumonie. Le VRS perturbe significativement les voies respiratoires et l'épithélium alvéolaire, induit un colmatage des voies respiratoires dû à un œdème sous-muqueux et à une perte de cils à la surface apicale des cellules épithéliales infectées, combiné à une accumulation de mucus et de débris cellulaires, et favorise l'infiltration des PMNs dans les voies respiratoires. Le VRS cible principalement

les cellules épithéliales ciliées des voies aériennes (AEC), mais les cellules immunitaires telles que les cellules dendritiques (CD) et les macrophages peuvent également être infectés par le VRS[325]. Les cellules ciliées ont également été identifiées comme étant infectées au niveau des bronchioles et alvéoles pulmonaires[326]. L'obstruction des voies aériennes et l'inflammation sont en partie dues au détachement des cellules infectées, la nécrose cellulaire et la perte de fonction des cellules ciliées dont le rôle est de favoriser la clairance[327]. Les cellules épithéliales et les macrophages alvéolaires infectés vont produire de nombreuses cytokines/chimiokines telles que l'IL-6, le TNF-α, le CXCL10/IP-10, le CXCL8/IL-8, le CCL2/MCP- 1 et le CCL3/MIP1α[328]. Ces médiateurs pro-inflammatoires vont participer au recrutement abondant de cellules immunitaires. Les autopsies d'enfants décédés à la suite de bronchiolite a démontré au niveau pulmonaire une accumulation de PMNs, de monocytes/macrophages et de lymphocytes B. Cependant les cellules NK et les LT $CD8^+$ sont peu représentés au sein de l'infiltrât cellulaire[329,327]. Les PMNs sont présents en abondance au sein des expectorations des patients infectés et hospitalisés[330]. Les PMNs vont agir en premier lieu en secrétant des peptides antimicrobiens tels que l'α-défensines, la cathélicidines, le pentraxine 3 et la myéloperoxydase en réponse aux pathogènes[331]. Ils vont également s'activer et entrer en NETose afin de limiter la propagation virale. Il a été démontré que le VRS induit la NETose des PMNs[332]. La protéine de fusion F du VRS est impliquée dans l'induction de la NETose des PMNs[333]. Le potentiel inducteur de la NETose de la protéine G du VRS n'a à ce jour pas été étudié. Cependant, les PMNs accumulés au sein du parenchyme pulmonaire pourraient également altérer le tissu pulmonaire notamment à causes des fortes quantités d'enzymes protéolytiques et de radicaux libres qu'ils libèrent. Néanmoins, aucun lien direct entre les manifestations cliniques de la bronchiolite et l'accumulation de neutrophiles dans les voies respiratoires n'a été mis en évidence même si leur présence en abondance n'est sûrement pas anodine[331]. L'analyse histopathologique des échantillons d'autopsie a également démontré des niveaux élevés d'éosinophiles dans les voies respiratoires des nourrissons qui ont succombé à une infection par le VRS, ce qui est également observé dans des modèles murins d'infection par le VRS[334,307]. La principale cause de l'afflux d'éosinophiles au cours de la réplication du VRS est l'expression de l'IL-5 et de l'éotaxine, deux cytokines induites par la glycoprotéine G du VRS. En conséquence, il a été supposé que l'éosinophilie était un facteur majeur contribuant à l'aggravation de la maladie à VRS.

b) Exacerbation par le VRS des maladies respiratoires préexistantes

Bien que les mécanismes et les virus particuliers qui interviennent dans l'exacerbation de l'asthme n'aient pas été complètement définis, il est probable que certaines voies soient

communes à de multiples infections virales respiratoires. Ces voies incluent probablement l'activation initiale de la production de chimiokines via des systèmes de reconnaissance de molécules innées, telles que les TLR, suivie de l'intensification d'un processus inflammatoire chronique déjà existant. Par la suite, l'activation et le recrutement des cellules T qui amplifient et orientent la réponse immunitaire vers une pathologie plus intense, y compris la production de mucus et le remodelage des voies respiratoires, sont des scénarios probables qui conduisent à une maladie plus grave et à une crise clinique.

Au cours de l'asthme, il est observé un recrutement accru de polynucléaire éosinophile ainsi que de cellule dendritique (CD)[335]. De plus, des études sur des modèles animaux ont indiqué que les CD étaient nécessaires au développement d'une inflammation chronique des éosinophiles dans les voies respiratoires[336]. Il est important de noter qu'un certain nombre d'études ont montré que l'infection par le VRS des CD modifie de manière significative la capacité des CD myeloïdes à exprimer des molécules de classe II, à exprimer des molécules de co-stimulation, à exprimer préférentiellement l'IL-10 et à altérer l'induction d'une réponse Th1[337,338]. Ainsi, durant une infection à VRS, les antigènes (allergènes) peuvent induire une réponse Th2 biaisée en raison de l'altération de l'activation des CD. Les souris infectées par le VRS ont une réponse pathologique accrue avec une hyper-réactivité des voies respiratoires, du mucus et une orientation de la réponse immunitaire vers un profil de cytokine Th2[339]. Domachowske et al. ont démontré que l'infection de souris par le paramyxovirus, un virus de la même famille que le VRS, induit une augmentation du CCL3 qui à son tour était liée au recrutement des granulocytes[340]. CCL5, une autre chimiokine, a un impact significatif sur la réponse physiopathologique à la fois dans l'infection primaire par le VRS et pendant l'exacerbation de l'inflammation allergique des voies respiratoires renforcée par le VRS[341,342]. Ainsi, le VRS dans le contexte de l'asthme va amplifier l'inflammation résiduelle par l'augmentation de la sécrétion de mucus, du recrutement de cellule inflammatoire et d'une orientation biaisée de la réponse immunitaire.

Les mécanismes de l'exacerbation de la BPCO induite par le virus restent mal élucidés et les données cliniques font actuellement défaut. Les virus respiratoires ciblent préférentiellement les cellules épithéliales des voies respiratoires, entraînant une desquamation des cellules épithéliales, une dilatation microvasculaire, un œdème et une infiltration de cellules immunitaires[25]. Dans le cas des exacerbations de la BPCO, le VRS représente jusqu'à 15% des exacerbations[343]. La BPCO a été identifiée comme étant un facteur de risque indépendant et significatif d'infection par le VRS provoquant une maladie grave, une hospitalisation et une admission en unité de soins intensifs[344]. Le VRS contribue à

l'inflammation des voies respiratoires via la libération de cytokines et le recrutement de PMNs et de $CD8^+$ et il a été démontré qu'il active le récepteur du facteur de croissance épidermique, entraînant la suppression de la production de CXCL10 et une altération de la clairance virale via un recrutement réduit des cellules NK et des lymphocytes T[345]. Les données mécanistiques démontrent que l'infection par le VRS favorise la formation de biofilm médiée par *P. aeruginosa* contribuant à la persistance de certaines bactéries au sein des voies respiratoires[346]. Les données *in vitro* montrent que les cellules A549 présentent une expression accrue de TLR3 suite à une infection par le VRS[347]. Cela conduit à une augmentation de l'activité NF-kB et de la libération d'IL-8[348]. Cette sécrétion accrue d'IL-8 contribue au recrutement des PMNs, qui vont contribuer à l'amplification de l'inflammation, la dégradation du parenchyme et l'encombrement pulmonaire. Une expression accrue de TLR3 dans la BPCO est associée à une diminution de la fonction pulmonaire et peut représenter un facteur de risque d'exacerbation accrue de la BPCO suite à l'infection par le VRS[347]. Une meilleure compréhension de ce processus permettra de développer une stratégie thérapeutique pour cibler les médiateurs ou les récepteurs spécifiques qui pourraient atténuer la progression des épisodes aiguës ou chroniques de la BPCO médiés par le VRS.

5. Réponse immunitaire contre le VRS

a) Réponse immunitaire innée

La réponse immunitaire innée est la première ligne de défense et est responsable de la reconnaissance de la vaste gamme d'agents pathogènes avec un ensemble limité de récepteurs fixes codés dans la lignée germinale. Pour relever ce défi, l'immunité innée repose sur la détection de modèles moléculaires associés aux agents pathogènes uniques à diverses classes d'agents pathogènes. L'hétérogénéité des glycoprotéines virales, ainsi que leur capacité à dériver génétiquement d'une saison à l'autre, créent des défis encore plus importants pour la reconnaissance immunitaire innée des virus comparés aux structures conservées au sein des bactéries comme le LPS par exemple. Pour contourner ces obstacles, le système immunitaire inné a développé des mécanismes pour détecter les caractéristiques des acides nucléiques viraux qui sont soit de structure distincte (ARN double brin, ARNdb) soit de localisation subcellulaire (ARNss). Étant donné que le VRS est un virus à ARNsb sens négatif, des espèces d'ARNss et d'ARNdb sont formées et sont des cibles pour le système immunitaire inné. Les récepteurs de type Toll (TLR) reconnaissent différents modèles moléculaires associés aux agents pathogènes et activent le NF-KB et d'autres voies de signalisation innées[349]. Comme cité précédemment, le VRS peut se lier au TLR4 pour initier les réponses

antivirales et des données cliniques récentes ont suggéré que des polymorphismes distincts dans les gènes TLR4 chez l'homme peuvent être liés à la susceptibilité à une infection sévère par le VRS ayant des conséquences à long terme sur la fonction pulmonaire[324]. Afin de transcrire et de traduire les composants protéiques du VRS pour sa réplication, le virus doit passer par une étape d'ARNdb. Cet ARNdb est alors reconnu par le TLR3, qui conduit probablement à la reconnaissance de l'infection par la réponse immunitaire de l'hôte. L'activation de TLR3 dans les CD à l'aide de poly-IC (un mimétique d'ARNss) conduit à la production d'IL-12 et d'IFN de type I qui sont nécessaires à l'initiation d'une réponse cytotoxique médiée par l'IFN-γ[350,351]. D'autres molécules innées peuvent également être impliquées dans l'initiation de cette réponse, notamment les deux récepteurs TLR7/TLR8 qui reconnaissent l'ARNsb ainsi que RIG-I, un récepteur cytoplasmique de l'ARNdb[352,353,354]. Ensemble, ces molécules peuvent médier la réponse antivirale appropriée en induisant des IFN de type I et IL-12. L'IL-12 n'intervient pas seulement dans les réponses associées à l'IFN-γ, mais peut être directement impliquée dans une immunité antivirale efficace[355]. Les cellules infectées par le VRS, notamment les cellules épithéliales bronchiques vont contribuer au recrutement des cellules inflammatoire au sein du parenchyme pulmonaire via la sécrétion d'IL-8. L'IL-8 va alors, permettre le recrutement d'un grand nombre de PMNs afin de défendre l'organisme contre le pathogène[328]. Cependant, ils vont également libérer des NETs, des protéases ainsi que des ROS contribuant à la pathogenèse du VRS.

Les populations locales de macrophages alvéolaires ont démontré leur capacité à produire un certain nombre de cytokines activatrices et inflammatoires, telles que le TNF, l'IL-1, l'IL-6 et l'IL-8, en réponse à l'infection par le VRS in vitro[356,357,358]. Ces cytokines peuvent ensuite activer d'autres cellules dans les voies respiratoires et amplifier les réponses d'activation via des réseaux de cytokines, entraînant des dommages associés à l'inflammation dans les voies respiratoires. Ainsi, plusieurs études ont montré que suite à l'infection par le VRS, les macrophages et les cellules épithéliales bronchiques produisent plusieurs cytokines et chimiokines activatrices et participent directement ou indirectement à l'inflammation respiratoire.

b) IL-17 et VRS

Les lymphocytes Th17 sont associés à la fois aux réponses immunitaires protectrices et à la pathologie induite par l'infection au VRS. Les taux d'IL-17 dans le plasma et les LBA de nourrissons infectés par le VRS indiquent que cette cytokine peut être bénéfique. En effet, il a été observé que les niveaux d'IL-17 étaient plus élevés dans le LBA des patients pédiatriques

(13 mois et moins) atteints d'une maladie à VRS non ventilée à l'admission et à la sortie par rapport au LBA des cas ventilés plus sévères. L'IFN- γ était indétectable dans cette étude mais les taux d'IL-6 étaient 30 fois plus élevés dans les cas ventilés[359]. Ces études ont également suggéré que les réponses Th17 pendant les infections à VRS sont indépendantes des réponses Th1 et Th2 et qu'elles remplacent, une réponse immunitaire Th1 immature/inadéquate chez le nouveau-né[360]. Des études sur l'IL-17 dans des modèles animaux et des systèmes de culture *in vitro* ont révélé que l'absence de réponse médiée par l'IFN-γ améliore la réponse Th17. Une telle réponse est induite par l'IL-23 qui est produite plutôt que l'IL-12[361]. Des expériences *in vitro* et in vivo ont montré que l'IL-17 seule, ou avec des particules d'ARN du VRS, peut induire une réponse inflammatoire favorisant la sécrétion de cytokines et de chimiokines induisant l'afflux de PMNs vers les sites d'infection[362]. Comme cela a été montré dans d'autres modèles d'inflammation, l'IL-17 peut également orchestrer le développement de tissus lymphoïdes associés aux bronches (BALT) qui sont similaires aux structures trouvées chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (maladie fortement associée à l'IL-17) avec des complications pulmonaires[363]. Cependant, en plus d'améliorer la réponse inflammatoire qui accompagne les infections par le VRS, il a également été démontré que l'IL-17 peut inhiber la capacité des lymphocytes $CD8^+$ à éliminer les particules virales et agit d'une façon synergique avec la réponse immunitaire innée pour exacerber l'inflammation[361]. De plus, des études *in vitro* et *in vivo* ont démontré que l'IL-17 améliore la production de mucus en agissant directement sur les cellules épithéliales ou à travers la production d'IL-13. D'autres études ont souligné également que des niveaux élevés d'IL-13 inhibent la production d'IL-17. L'induction de la production d'IL-17 par le VRS exacerbe l'asthme en augmentant la production de mucus. Il est intéressant de noter que l'IL-17F n'a pas été régulée à la hausse en même temps que l'IL-17A dans un modèle d'infection par le VRS[362]. D'autres études sont nécessaires pour déterminer si l'IL-17F a un rôle distinct dans l'infection par le VRS.

Il est intéressant de noter que bien que les lymphocytes Th17 aient évolué avec le reste du système immunitaire adaptatif, l'émergence de la famille de cytokines IL-17 est antérieure aux chordés[364]. Les lymphocytes Th17 se différencient en réponse aux cytokines inflammatoires, de préférence avec un faible niveau d'engagement du TCR et leur expansion est favorisée par de faibles niveaux d'oxygène[365]. Les cellules pourraient donc apparaître comme une alternative faible à la réponse antivirale plus efficace médiée par une réponse lymphocytaire Th1 manquante ou immature/inadéquate. Dans de telles circonstances, les lymphocytes Th17 peuvent fournir une réponse qui chevauche les réponses immunitaires adaptatives et innées

entraînant une libération de mucus, un afflux de PMNs et une augmentation des structures lymphoïdes tertiaires locales.

c) Réponse immunitaire adaptative

L'élimination du VRS est médiée par les anticorps neutralisants et les cellules T cytotoxiques[366]. Les anticorps, IgG sériques et IgA muqueux, jouent un rôle important dans la protection contre une infection ultérieure par le VRS. Cependant, le VRS peut échapper ou supprimer les cellules mémoires B chez l'homme et supprimer le développement des réponses mémoires des muqueuses chez les adultes[367].

Chez les nourrissons, le système immunitaire est encore immature et des anticorps d'origine maternelle peuvent encore être présents à des niveaux relativement élevés. Les anticorps maternels acquis passivement sont détectables chez tous les nouveau-nés, bien qu'à des titres très variables[368]. Le risque le plus élevé d'infection sévère par le VRS nécessitant une hospitalisation est observé à un âge (2 à 6 mois) et ce malgré la présence d'anticorps maternels. Il existe cependant de nombreuses études montrant que les titres d'anticorps neutralisants d'origine maternelle sont inversement associés à l'infection à VRS dans son ensemble, ou à la gravité de la maladie[369,370]. Néanmoins, la présence d'anticorps maternels limite la capacité déjà faible à monter des réponses humorales chez les nourrissons et a été confirmé par le transfert passif d'anticorps chez les animaux[371,372].

Chez l'adulte, les titres d'anticorps neutralisants spécifiques aux protéines F et G sont en corrélation avec une protection, bien que très souvent incomplète contre la réinfection[373]. Le changement de conformation de la protéine F permet également au VRS d'empêcher le système immunitaire de créer des anticorps neutralisants plus puissants[374]. Les titres d'IgG et d'IgA anti-VRS diminuent rapidement avec le temps chez l'homme, avec plus de 75 % des adultes présentant une réduction de quatre fois les titres d'IgG neutralisantes anti-VRS dans l'année suivant l'infection naturelle par le virus[375]. En conséquence, une réponse anticorps au VRS ne confère pas de protection à vie, et le virus est capable de réinfecter l'hôte tout au long de la vie.

Il a été observé dans les tissus pulmonaires post-mortem des cas d'infection mortelle par le VRS, une abondance de lymphocytes B en l'absence quasi totale de lymphocytes T $CD3^{+}$[376]. Ces observations suggèrent que l'activation des lymphocytes B dans les poumons des cas très graves peut être indépendante des lymphocytes T. Une variété de facteurs impliqués dans l'activation des cellules B en dehors des cellules T comme le « vasoactive intestinal peptide »

VIP, « B-cell-activating factor » BAFF, « proliferation-inducing ligand » APRIL se sont avérés fortement exprimés dans les tissus des patients atteints d'une infection mortelle par le VRS, comparé aux témoins[376]. Les concentrations de deux de ces médiateurs dans les voies respiratoires des nourrissons atteints d'infection sévère étaient en corrélation avec les taux d'immunoglobulines totales et en particulier avec les taux d'IgM spécifiques du VRS[376].

L'ensemble de ces données permettent de suggérer que l'immunité humorale dans le cas de l'infection du VRS est souvent inefficace et biaisée. Cela permet également d'expliquer pourquoi les vaccins à ce jour se sont révélés inefficaces voir dangereux.

6. Stratégies thérapeutiques antivirales

La prise en charge de la bronchiolite aiguë nécessitant une hospitalisation consiste en grande partie en des soins de soutien, tels que l'aspiration nasale, l'oxygène d'appoint et l'alimentation nasogastrique. Il est de pratique courante d'administrer des bronchodilatateurs (α et β adrénergiques, anticholinergiques et épinéphrine nébulisée), mais il n'existe aucune preuve concluante qu'ils aient un impact positif sur l'évolution de la maladie[377]. Les preuves à l'appui d'un effet significatif des corticostéroïdes inhalés ou systémiques dans le traitement de la bronchiolite sévère font également défaut, et leur utilisation en routine n'est pas recommandée[378]. Les niveaux de cortisol plasmatique sont significativement élevés chez les nourrissons atteints de bronchiolite légère par rapport aux témoins sains et étaient encore plus élevés chez les patients atteints de bronchiolite sévère à VRS nécessitant une hospitalisation. Cette production endogène de cortisol est associée à la suppression des cytokines qui sont considérées comme des médiateurs clés des réponses antivirales[379]. Cela suggère fortement que le traitement systémique par des corticostéroïdes peut ne pas être recommandé dans les infections graves par le VRS.

La ribavirine, un analogue nucléosidique de la guanosine à large spectre antiviral, est utilisé sous forme nébulisée dans le traitement des nourrissons et des enfants atteints de bronchiolite sévère. Les résultats d'une méta-analyse indiquent qu'elle peut être efficace pour réduire la durée de ventilation et la durée d'hospitalisation, mais peu d'études sont disponibles et leur qualité est trop variable pour permettre des conclusions définitives[380]. Son utilisation n'est pas recommandée en routine en raison des incertitudes concernant son efficacité, de son coût élevé et le risque potentiel pour la santé des soignants. Cependant, elle peut être envisagée chez les nourrissons à haut risque atteints d'une maladie grave [377].

Malgré des preuves considérables que les infections bactériennes concomitantes chez les nourrissons et les enfants hospitalisés pour une maladie liée au VRS sont très rares, les antibiotiques sont encore souvent prescrits[381]. L'antibiothérapie dans les essais cliniques n'a pas montré d'amélioration des résultats et son utilisation doit être soigneusement évaluée en raison du risque potentiel d'événements indésirables et de la menace croissante de résistance bactérienne aux antibiotiques. En d'autres termes, une analyse bénéfice-risque doit être effectuée dans chaque cas. Dans un modèle murin, le traitement avec des antibiotiques pendant 15 jours après l'infection par le VRS a entraîné une augmentation de l'hyperréactivité des voies respiratoires (AHR) le dernier jour du traitement. Mais aucune AHR n'a pas été observée après une infection par le VRS seule ou un traitement antibiotique seul[382]. Le traitement antibiotique a probablement interféré avec la régulation positive induite par le VRS des cellules T régulatrices pulmonaires (Tregs) et des cytokines immunomodulatrices qui se jouent un rôle important dans la limitation de l'immunopathologie liée à l'infection des souris par le VRS[383]. A ce jour, il existe une grande variabilité dans la prise en charge de la bronchiolite aiguë non seulement au niveau international, mais aussi au sein d'un même pays. Cela reflète le manque de preuves concluantes quant à l'un impact positif des thérapies actuellement utilisées pour le traitement de la bronchiolite.

Pour prévenir les infections respiratoires graves causées par le VRS, un autre traitement utilisé dans le cas de nouveau-nés prématurés consiste en l'administration d'un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine F du VRS, appelé le palivizumab. Plusieurs études ont confirmé l'efficacité de cet anticorps chez les nourrissons prématurés et ceux avec une maladie coronarienne significative sur le plan hémodynamique[384]. Ainsi, la protéine F a été examinée en tant qu'antigène vaccinal, car plusieurs de ses épitopes sont reconnus par des anticorps neutralisants[385]. Il a été découvert que les stratégies vaccinales induisent des anticorps neutralisants 10 à 100 fois plus puissants que le palivizumab[386]. En plus de ces facteurs, les changements conformationnels spectaculaires que subit la protéine F en font une cible majeure pour le développement de médicaments antiviraux à petites molécules[387]. Alors que la protéine F reste hautement conservée entre les sous-groupes RSV-A et RSV-B, la protéine G est significativement plus variable, à l'exception d'une zone hautement conservée connue sous le nom de domaine conservé central. Les difficultés de création d'un vaccin à base de protéine G incluent sa glycosylation hétérogène et sa variabilité de séquence en dehors de son domaine central conservé[388]. Une approche pour obtenir un vaccin contre les souches A et B consiste à envisager la création d'un peptide de fusion comprenant des peptides de domaine central conservé provenant des deux souches.

Malgré la perspective que les vaccins contre le VRS deviennent plus réalisables avec notamment plusieurs vaccins entrant dans un développement clinique avancé, de nombreuses lacunes dans les connaissances subsistent. A ce jour, aucun vaccin n'a été approuvé.

VI. La NETose

Les PMNs ont un rôle déterminant dans l'immunité innée et ils sont le premier type cellulaire à réagir en cas d'infection. Ils accomplissent cette action par des mécanismes intra et extracellulaires. Cela passe par leur capacité à phagocyter et dégrader les microbes grâce aux protéases contenues dans leurs granules. Le mécanisme extracellulaire impliqué également dans la défense immunitaire est la NETose.

1. Découverte et définition

C'est à Berlin, en 2004, que Brinkmann décrit pour la première fois le mécanisme de mort des PMNs consistant au relargage de fibres d'ADN décorés de protéines nucléaires et de protéines granulaires capable de dégrader les bactéries et causer leur mort [197]. Cependant, en 1994, les travaux de Takei font la lumière sur une mort atypique des polymorphonucléaires suite à la stimulation par du phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)[389]. Ses observations font état d'une mort différente de la nécrose et de l'apoptose avec une décondensation de l'ADN accompagnée de son détachement de la membrane nucléaire. Il en résulte une rupture de la membrane plasmique et le relargage du contenu cellulaire. Ces observations ont été approfondies en 2004 où l'équipe de Zychlinsky a défini cette mort des neutrophiles induite par le PMA, l'CXCL8/IL-8 et le LPS, pouvant induire à son tour la mort des bactéries [197]. Ce processus de mort des neutrophiles a été nommé NETose en 2007. La NETose est définie comme étant un processus dynamique des PMNs conduisant au relargage de filament d'ADN décondensé, contenant des protéines granulaires, appelé NET pour « *Neutrophil Extracellular Trap* »

Ce mécanisme de l'immunité innée est retrouvé dans d'autres espèces vertébrées comme invertébrés où les phagocytes libèrent des filets d'ADN [390]. Au niveau du règne végétal, un mécanisme similaire de libération de filament d'ADN par les cellules en bordure de racine, a été décrit afin d'assurer la défense des racines contre les agressions fongiques [391]. Ces observations laissent supposer que ce mécanisme d'immunité innée a été conservé au cours de l'évolution. Cette découverte, a par la suite, engendré un nombre important d'études sur les inducteurs de la NETose, les mécanismes intracellulaires impliqués et son implication dans de nombreuses pathologies.

2. Structure des NETs

Les NETs ou « *Neutrophil Extracellular Traps* » sont des filets d'ADN extracellulaires issus de neutrophile. Ils se composent de chromatine enroulée sur les histones formant des filaments de 15 à 17 nm de diamètre. Ces filaments ont pu être observés en microscopie électronique à balayage à haute résolution, révélant des structures globulaires pouvant mesurer jusque 50nm de diamètre [392] (figure n°12). D'autres études ont également rapporté que les NETs sont constitués de plusieurs filaments très fins de 2nm de diamètre associés parallèlement[393].

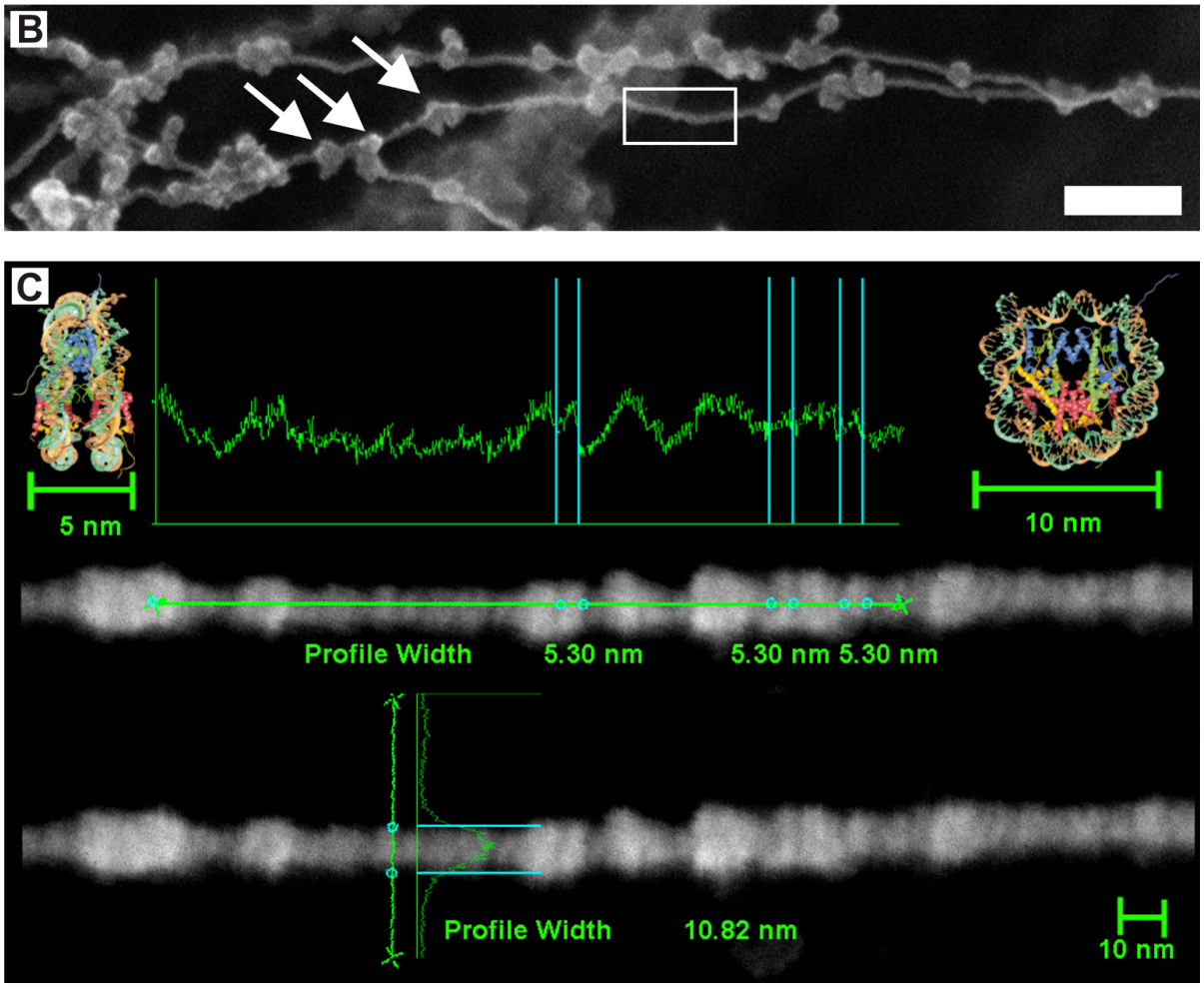

Figure 13 : image en microscopie electronique à balayage en haute résolution de NETs

Source : Constantin et Al., octobre 2009 [392]

Ces structures globulaires contiennent des protéines issues des différents compartiments du neutrophile. Parmi les 31 protéines décrites à ce jour comme étant présentes sur les filaments d'ADN, les histones sont majoritaires et représentent 70% des protéines totales. Les histones H2A, H2B, H3 et H4 sont présentes au niveau des filaments, cependant elles ont subi des modifications post-transcriptionnelles telles que la citrinullination et la protéolyse. Selon

certaines études, ces modifications seraient le point de départ et la cause du processus de la NETose [394]. En dehors des histones, des protéines granulaires provenant principalement des granules azurophiles, membranaires, cytoplasmiques et nucléaires sont également identifiées. Parmi les protéines granulaires, l'élastase du neutrophile (NE) est la plus représentée à la surface des NETs et représente 5% des protéines totales. La NE est l'une des armes moléculaires les plus puissantes des neutrophiles, conduisant entre autres à la décomposition des facteurs de virulence et à la dégradation des micro-organismes absorbés par ces cellules. Ont été également localisés sur les filaments, la lactoferrine, la myeloperoxydase (MPO), et la protéinase (PR3)[392]. La composition protéique des NETs est variable suivant l'inducteur utilisé et le degré d'activation des neutrophiles. En effet, les PMNs issus de patients atteins de lupus érythémateux systémique vont générer des filaments décorés de LL37 et HMGB1 suite à la stimulation par le PMA tandis que les NETs issus de PMNs provenant de donneurs sains n'en ont pas [395]. Cependant, certaines protéines les constituants semblent indispensables à la production de NETs. En effet, les résultats de Papayannopoulos et al. ont montré que l'élastase du neutrophile, passant du cytoplasme au noyau, initie la dégradation de la chromatine en fractionnant les histones, conduisant ainsi à sa décondensation. La liaison de la myéloperoxydase à la chromatine moléculaire agit en synergie avec la NE et peut intensifier le processus de décondensation[394]. Metzler et al. a confirmé que la myéloperoxydase est une protéine essentielle à la génération des NETs, par opposition aux neutrophiles privés de cette activité protéique, qui n'étaient pas capables de former des NETs après stimulation par le PMA ou Candida albicans[396]. Ces observations sont supportées par le fait que les NETs composés de chromatine nucléaire et ceux composés de chromatine mitochondriale n'ont en commun dans leur structure ces deux protéines (NE et MPO), confortant l'importance de ces deux enzymes dans la génération de NETs[397] .

3. Mécanisme de la NETose

Les travaux menés par Takei sur la mort atypique des neutrophiles suite à leur stimulation par le PMA, sans mention d'ADN extracellulaire ou de NETose, avaient déjà révélé qu'elle faisait appel aux ROS. D'une part ses travaux démontrent l'implication des formes réactives de l'oxygène (FRO), d'autre part, d'autres travaux ont révélé que la NETose n'est pas uniquement un type de mort cellulaire. En effet, les neutrophiles en NETose ne s'engagent pas forcément vers un processus de mort, il existe également une NETose dite « Vitale »[398]. Bien que de nombreuses études ont été réalisées sur le mécanisme cellulaire conduisant à la NETose, de nombreux points ont été élucidés certaines zones d'ombre subsistent concernant leur implication dans certaines pathologies.

a) Inducteur de la NETose

La littérature a référencé de nombreux inducteurs de la NETose. Leur découverte par Brinkmann avait été accompagnée par l'identification de 3 inducteurs de nature différente : l'CXCL8/IL-8, le PMA et le LPS. Les NETs sont formés en réponse à une multitude d'agents pathogènes, bactéries, levure, champignon, virus et parasites. Les médiateurs pro-inflammatoires tels que le TNFα, l'CXCL8/IL-8, le facteur d'activation plaquettaire (PAF), l'association GM-CSF/C5a/LPS sont également de forts inducteurs de NETose[197,399,400,398]. La production de NETs peut également être déclenchée par les plaquettes activées, les cellules endothéliales, les complexes immuns, les fibrilles amyloïdes ou par les cristaux d'acide urique du liquide synovial de patients atteints de le goutte[401,257,402,403]. De même, le fragment C3b du complément facilite l'induction de la NETose, cela a été observé suite à la pré-incubation des pathogènes avec du sérum comparé à une incubation avec des IgG seul, suggérant que l'opsonisation par le complément C3b (via l'activation de la voie classique ou alternative) facilite également la formation de NET. Cette hypothèse a été corroborée par la découverte que l'ajout d'un antagoniste de CR1 (récepteur du fragment C3b), diminue la NETose[404]. Des inducteurs pharmacologiques tels que l'ionomycine, l'ionophore de calcium A23187, les FRO et les donneurs de monoxyde d'azote (NO) conduisent également à la libération des NETs[400,198,405].

b) La NETose dépendante de la voie Nox

Parmi les divers mécanismes de formation de NET connus aujourd'hui, celui concernant la formation de NETs dépendant des Nox est le mieux décrit. Les agonistes tels que le PMA et le LPS ont été bien validés dans la littérature, cependant, des études ont démontré qu'ils induisent la formation de NET dépendante de Nox par deux mécanismes différents[399](figure n°13).

Suite à l'entrée du PMA, le calcium du réticulum endoplasmique pénètre dans le cytosol où elles augmentent l'activité de la protéine kinase C (PKC), qui phosphoryle ensuite gp91phox / Nox2[198]. Ce processus facilite l'assemblage de l'enzyme NADPH oxydase (Nox), entraînant ainsi la génération de ROS, qui vont par la suite désintégrer les membranes des granules et le noyau[400]. Des suites de la perte de l'intégrité des membranes des granules azurophiles, l'élastase neutrophile (NE) et la myéloperoxydase (MPO) sont désormais libres d'interagir avec le noyau où elles peuvent cliver les histones et faciliter la décondensation de la chromatine. Ce processus aboutit à une perte d'intégrité membranaire du neutrophile et

l'ADN décondensé, qui à ce stade est décoré avec un contenu granulaire, et libéré dans le milieu extracellulaire pour réaliser ses fonctions antimicrobiennes. Il convient de noter que le PMA, bien qu'utilisé de manière récurrente, est un agoniste non-physiologique dépendant des Nox. Les expériences utilisant cet inducteur pour produire des NETs et étudier leur rôle dans la maladie doivent par conséquent être examinées attentivement. Inversement, le LPS qui est un composant des bactéries Gram-négatives peut offrir plus d'utilité pour les modèles expérimentaux *in vitro* qui visent à imiter plus étroitement les conditions de NETose *in vivo*.

Le LPS fonctionne par une voie distincte médiée par les kinases N-terminales c-Jun (JNK) pour la formation de NET dépendante des Nox[406]. Si le mécanisme est similaire à celui du PMA suite à la phosphorylation de Nox2, en amont de cette étape, il existe des différences importantes. La liaison du LPS au TLR4 sur la surface des neutrophiles induit la formation de NET dépendante de la dose Nox et que l'inhibition à l'aide de TAK242 abolit cet effet. En outre, les inhibiteurs de JNK tels que SP600125 et TCSJNK6o ont significativement interféré avec la formation de NET induite par le LPS mais pas par le PMA, indiquant que ces deux agonistes provoquent leurs effets par deux mécanismes différents[406].

Le rôle de PAD4 dans la formation de NET dépendant des Nox reste un domaine de discorde. Il a été démontré que PAD4, bien que nécessaire pour la formation de NET indépendante des Nox, ne joue pas un rôle intégral dans la formation de NET dépendante des Nox. Cela a été montré par microscopie confocale, qui a révélé que lors de la stimulation avec PMA, la formation de NET s'est produite sans déimination d'histone détectable[407]. Cependant, d'autres études indiquent que la formation des NETs médiée par le LPS et le PMA peut en effet nécessiter PAD4. En effet, les neutrophiles murins déficients en PAD4 sont incapables de produire des NETs en réponse à la stimulation par le PMA ou par le LPS et à l'inhibition de la formation de NETs médiée par PMA par l'administration d'inhibiteurs de PAD4 tels que la chloraminidine (inhibiteur de PAD) ou GSK484 (inhibiteur spécifique de PAD4)[408].

c) La NETose indépendante de la voie Nox

La formation de NET indépendante des Nox a été mise en évidence par les travaux de Parker, suites à la stimulation des neutrophiles par les ionophores de calcium, tels que l'ionomycine[408]. Semblables au PMA, ces agonistes ne sont pas physiologiques et les expériences dans lesquelles ils sont impliqués doivent être envisagées avec cette mise en garde à l'esprit. Les ionophores de calcium induisent l'afflux de calcium au niveau du cytosol des cellules. Les grandes quantités de PAD4 déjà présentes dans le cytosol, se lient au

calcium et se translocent dans le noyau des neutrophiles. Ici, l'enzyme désimine les résidus d'histone arginine portant une charge positive en citrulline neutre entraînant une décondensation de la chromatine nécessaire à la formation de NET indépendante des Nox[409]. Il a été observé une hypercitrullination de l'histone H3 dans la formation de NET médiée par des agonistes indépendants de Nox mais pas par des agonistes dépendants de Nox, confirmant la pertinence de la citrullination des histones dans la formation de NET. Ce concept est en outre étayé par des découvertes récentes selon lesquelles si A23187, un agoniste de formation de NET indépendant de Nox, induit la citrullination de l'histone H3, le PMA, un agoniste de formation de NET dépendant de Nox, ne l'induit pas[407]. La citrullination des histones induisant la décondensation de l'ADN est d'une importance particulière car elle permet d'accéder à des facteurs de transcriptions nécessaires à la formation des NETs[405].

Les canaux à potassium (canal SK) et les ROS mitochondrials, semblent être indispensables à ce processus. En effet des travaux sur l'invalidation de canal SK3 par utilisation de siRNA, ont révélé une réduction de la NETose independante de Nox. De plus, l'incubation avec le dinitrophénol (DNP), un découpleur de production d'ATP mitochondrial, a inhibé la production de mROS, conduisant à une réduction significative et dose-dépendante de la formation de NET indépendante des Nox[409]. Ces observations attribuent aux mitochondries un rôle important dans la formation de NETs indépendante des Nox. Ces organites jouent un rôle minimal dans la synthèse de l'ATP chez les neutrophiles. Les mROS produit par l'activation du canal SK avaient été précédemment attribués à l'apoptose, mais ces observations soutiennent que ce processus joue également un rôle dans l'immunité innée notamment dans la NETose[410] (figure n°13).

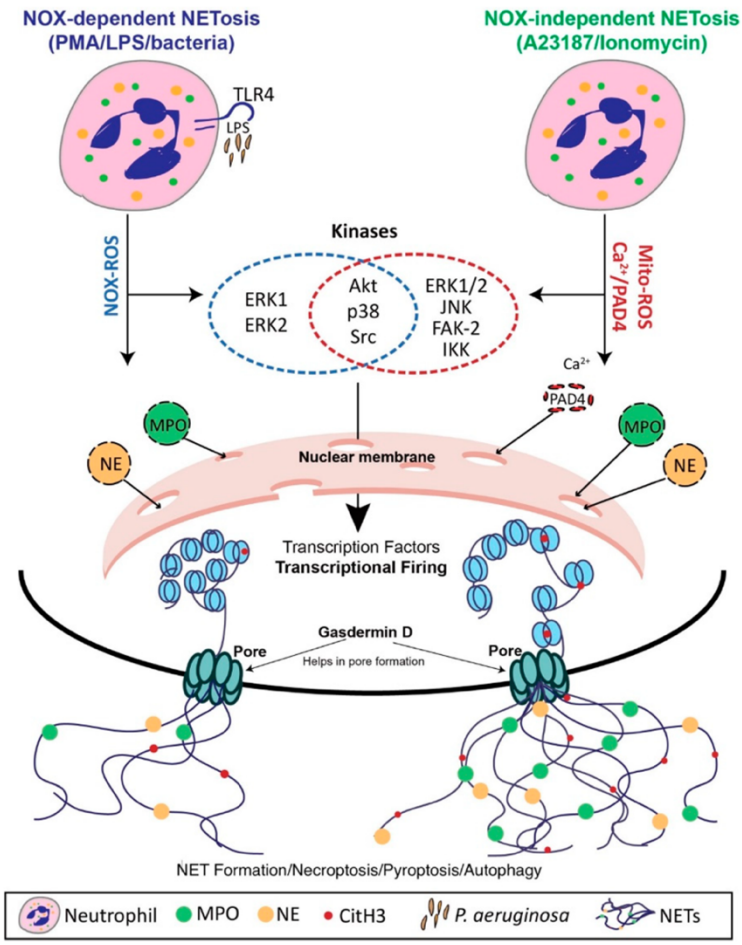

Figure 14 : voies de signalisation de la NETose

(source : Mithunan Ravindran et Al, juillet 2019 [411])

d) La NETose vitale

La NETose a été décrite comme étant une forme de mort cellulaire, cependant d'autres études ont révélé qu'il existe une NETose dite « vitale » préservant les capacités protectrices et microbicides du neutrophile.

Ce processus se produit beaucoup plus rapidement que la NETose suicidaire. Il se produit en seulement 5 à 60 minutes, impliquant l'ADN nucléaire ou mitochondrial [412 413]. Les travaux menés par Yipp et Kubes utilisant la microscopie intravitale pour visualiser les neutrophiles dans le contexte d'une infection cutanée de souris ont révélé que ces neutrophiles étaient encore capables de subir une chimiotaxie et de phagocyter des bactéries après la libération de NET indépendante de Nox.[412]. Yousefi a proposé que la formation de NET vitale d'ADN mitochondrial nécessite à la fois le GM-CSF, le LPS ou le C5a[398]. Comme son nom l'indique, la principale différence entre cette forme de formation de NET et celle proposée par Yipp et Kubes est que l'ADN détecté par Yousefi et al. était mitochondrial, plutôt que nucléaire, et

nécessite des ROS mitochondriales. Il a été démontré que ce processus vital faisant appel à l'ADN mitochondrial dépend des Nox[398].

Ce mécanisme entraine également la migration de PAD-4 et la NE vers le noyau, indépendamment de la présence des formes réactives de l'oxygène, afin d'engager la décondensation de la chromatine. La membrane plasmique n'est pas rompue car les filaments de chromatine sont transportés vers le milieu extracellulaire sous formes de vésicules formées à partir de la membrane nucléaire.

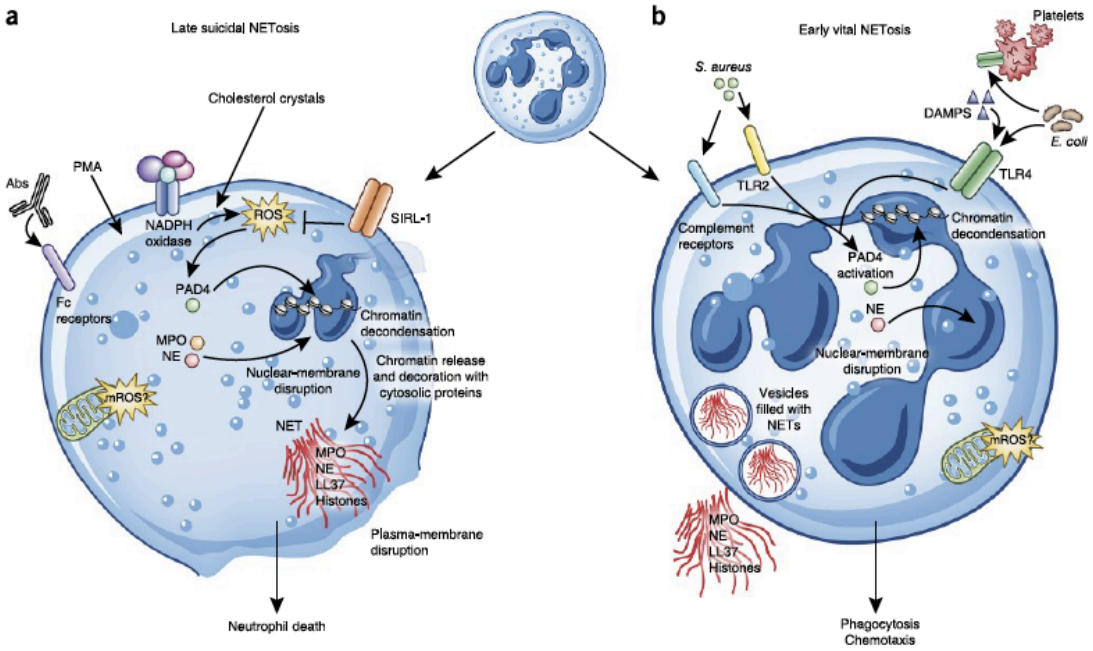

Figure 15 : NETose suicidaire et NETose "vitale"(Source : Jorsh K Selina et Al., 2017 [413])

4. ETosis

La libération de filets extracellulaires appelée ETs pour « Extracellular traps » est un phénomène qui s'étend à d'autres types cellulaires. D'autres cellules polynuclées tels que les éosinophiles[414], les basophiles[415] secrètent des ETs mais aussi des cellules mononuclées comme les mastocytes[416], les monocytes[417] et les macrophages[418].

a) Eosinophiles

La production d'ETs par les éosinophiles suit un processus similaire à celui décrit pour la libération d'ADN mitochondrial par les PMN. Il n'aboutit pas à la mort cellulaire et dépend de la production de FRO[419,414]. Les éosinophiles génèrent des filaments d'ADN extracellulaire rapidement en réponse à une stimulation par LPS, éotaxine ou C5a cependant une pré-incubation avec de l'IL-5 ou de l'IFN-γ est nécessaire[414]. La lymphopoïétine thymique

stromale et le *Staphylococcus aureus* sont également à l'origine de la production d'ETs par des éosinophiles adhérents[419].

Les ETs d'éosinophiles sont issus d'ADN mitochondrial comme le révèle la présence de plusieurs gènes mitochondriaux tels que Co1 (sous-unité du cytochrome oxydase 1), ND1 (sous- unité NADH déshydrogénase 1), ou Cyb (cytochrome b). Les protéines des granulations des éosinophiles sont libérées en même temps que l'ADN mitochondrial cependant aucune protéines cytosoliques, nucléaires, et membranaires n'est détécté sur ces filaments d'ADN[420]. Les ETs d'éosinophiles ont été décrits dans la physiopathologie des maladies inflammatoires de la peau, de l'intestin et dans l'asthme[421,414,422]. Alors que ces structures sont aussi capables de piéger et tuer les bactéries, leur rôle dans les maladies infectieuses n'est pas clairement établi[414].

b) Basophiles

Les polynucléaires basophiles ont également montré une capacité à secréter des ETs. Cela a été observé dans la goutte, qui est une maladie chronique des articulations en relation avec la production de cristaux d'acide urique[415]. Ces études montrent que ces cristaux sont capables d'induire *in vitro* et *in vivo* la production d'ETs par les basophiles. Par contre, ces résultats n'ont pas pu être reproduits en utilisant les inducteurs de NETose plus classiques, comme le LPS[415]. Cela est en contradiction avec d'autres résultats obtenus par l'équipe de Yousefi S. qui présentent le LPS comme l'un des nombreux inducteurs d'ETose des basophiles. Son effet semble plus important lorsque les cellules sont préalablement stimulées avec de l'IL3 [423]. Le fragment du complément c5a, l'éotaxine sont également des inducteurs. Cependant cet effet est observé uniquement après une pré incubation avec l'IL-3[423]. Ceci confirme encore une fois la complexité du mécanisme de libération des ETs et l'idée que ce processus est lié à l'état de la cellule et au type d'inducteur utilisé.

c) Mastocytes

Les mastocytes sont des cellules fortement présentes au niveau du tissu conjonctif caractérisé par un nombre très important de granule contenant des médiateurs chimiques comme la sérotonine, l'histamine, la tryptase ou l'héparine.

La génération de filament extracellulaire par les mastocytes a été évoquée par Kockritz-Blickwede, lors de l'infection à *Streptococcus Pyogenes*. Ce processus intervient contre les bactéries groupées dans le milieu extracellulaire que les mastocytes sont incapables de

phagocyter [416]. La production d'ETs par les mastocytes est un mécanisme actif, dépendant des ROS et conduisant à la mort cellulaire[416].

De plus, ces structures contiennent des protéines issues des granulations mastocytaires comme la tryptase et le CRAMP/LL-37[416]. Contrairement aux PMN où les NETs peuvent être dégradés par de la DNase, les ETs des mastocytes nécessitent l'action conjointe de la DNase et d'enzymes qui dégradent la tryptase, révélant l'importance structurale de cette enzyme[416]. Il n'est pas encore tout à fait clair comment la formation des MCET est régulée transcriptionnellement. Cependant, le régulateur transcriptionnel central de la réponse cellulaire au stress hypoxique, à savoir le facteur 1α inductible par l'hypoxie (HIF-1α), a été incriminé dans la formation des ETs par les mastocytes[424]. Ce phénomène est probablement important dans les maladies inflammatoires car HIF-1α joue un rôle dans la régulation des PMN et des macrophages[425].

d) Monocytes et Macrophages

La libération d'ADN extracellulaire par les monocytes a également été observé lors d'infection bactérienne. Les monocytes du sang périphérique est la composante des phagocytes mononuclées assurant la défense rapide de l'hôte, générant des réponses antibactériennes vigoureuses. L'exposition à des charges bactériennes élevées entraine une perte rapide de la viabilité cellulaire et une diminution des compétences fonctionnelles. L'exposition à un grand nombre d' *Escherichia coli* et de *Klebsiella pneumoniae* induit une mort non-apoptotique avec perte de l'intégrité de la membrane cellulaire, une perturbation marquée des phagolysosomes et une activation de la caspase-1, certaines cellules libèrent des pièges extracellulaires régulés par la caspase-1[417].

Les macrophages sont également capables de générer des filaments d'ADN extracellulaires. Le premier rapport détaillé de formation des ETs par des macrophages matures et différenciés est apparu dans Cell Host & Microbe en 2010, dans le cadre d'une étude liant la formation d'ET à la régulation de la voie de synthèse des stérols[426]. Il a été décrit que les cellules de lignées cellulaires humaines et murines de monocytes/macrophages (U937 et RAW 264.7) libèrent des ETs en réponse aux statines, inhibiteurs de la 3-hydroxy 3-méthylglutaryl coenzyme A (HMG- CoA) réductase, utilisées dans le traitement des hyperlipidémies. L'effet anti-infectieux potentiel décrit pour ces statines serait potentiellement due à la forte production des ETs par les monocytes/macrophages, mais aussi des NETs par les PMN[426]. Le

mécanisme moléculaire impliqué dans l'effet des statines semble être lié à l'inhibition de la voie des stérols dans les cellules.

Les macrophages infectés par *Mycobacterium tuberculosis* forment des ETs[418]. L'IFN-γ participe à ce phénomène notamment dans l'agrégation de *M. Tuberculosis* dans les macrophages ainsi que la formation d'ETs[418]. Le facteur de virulence, ESX-1, important dans la pathogenèse des mycobactéries, codant pour le système de sécrétion de protéines semble être nécessaire à l'induction de l'ETose des macrophages[418].

5. Effets bénéfiques des NETs

Comme cité précédemment, un grand nombre de microorganismes induisent la NETose (Tableau 2).

Bacteria, fungi, viruses, protozoa	**Organic factors**
Staphylococcus aureus	Lipopolysaccharide (LPS)
Streptococci pyogenes, S. pneumonia	Lipophosphoglycan (LPG)
	Immune complexes
Aspergillus fumigatus, A. nidulans	Activated platelets
	Phorbol myristate acetate (PMA)
Candidia glabrata	N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP)
Leishmania	
Toxoplasma gondii	Platelet activating factor (PAF)
Influenza	Alumn
Human immunodeficiency virus (HIV)	Calcium ionophore (Ionomycyn)
	Glucose oxidase
Cytokines	**Inorganic factors**
Interleukin-8	Calcium ions
Tumor necrosis factor (TNF-α)	Nitric oxide (NO)
	Hydrogen peroxide (H_2O_2)
MIP-2 (CXCL2)	

Tableau 2 : differents inducteurs de la NETose.

Différents types de microorganismes incluant les bactéries, les champignons et les virus induisent la NETose. La mise en évidence de protéines microbicides au sein de la structure des NETs a rapidement suggère l'hypothèse d'une activité antimicrobienne des NETs. Il est maintenant admis que les NETs sont capables de piéger et de détruire les pathogènes, pour

autant, les mécanismes régissant ces activités ne sont pas totalement élucidés. Les NETs présentent ainsi plusieurs aptitudes :

a) La séquestration des pathogènes

La capacité des NETs à séquestrer certains pathogènes est potentiellement lié à la charge négative de la chromatine qu'ils contiennent. En effet, les parois de certains microorganismes sont chargées positivement, ce qui permet leur interaction électrostatique aux filaments d'ADN, les piégeant et empêchant leur dissémination au sein de l'organisme. L'utilisation de DNase-1 administré en systémique dans un modèle de sepsis à S. Aureus murin, limite la formation des NETs et favorise la dissémination de la bactérie induisant la mort précose des souris[412]. Cependant, les bactéries possédant une capsule tels que S. pneumoniae, présentent une réduction d'interaction aux filaments d'ADN favorisant leur échappement[427].

b) La destruction des pathogènes

L'aptitude des NETs à détruire les pathogènes est sujette à controverses, des études sur l'effet microbicides des NETs sur S. aureus ont montré qu'après incubation de ces derniers avec les NETs, les bactéries survivaient[428]. Cependant d'autres études ont attribué aux protéines présentent sur les NETs, la capacité de tuer ou d'inhiber les agents pathogènes. Parmi ces protéines, des enzymes telles que le lysozyme et des protéases, des peptides antimicrobiens (la protéine BPI et les défensines), des chélateurs ioniques (calgranuline), des histones ayant la capacité à dégrader des bactéries. L'activité antimicrobienne des NETs semble être déterminée par l'action conjointe de ces composants, ainsi que par leur concentration élevée localement sur les fibrilles de chromatine.

En ce qui concerne S. Aureus, l'activité de la Myeloperoxydase (MPO) sans autre composant des NETs et en présence de peroxyde d'hydrogène, s'est avérée être efficace pour sa destruction[429]. La calgranuline, protéine chélatrice de zinc, également présente dans les NETs, possède une activité fongicide notamment sur *Candida albicans* et *Aspergillus*. Elle agit sur le zinc, oligo-élément nécessaire à la croissance fongique[392].

En plus des activités contre les bactéries, les champignons et les parasites, les NETs ont un effet antiviral. Les enveloppes virales chargées négativement se lient aux histones qui eux sont enrichis en acide aminé chargé positivement[430]. Récemment, Saitoh et al. ont montré que les neutrophiles lorsqu'ils sont en co-culture avec les LT CD4+, inhibent l'infection de ces derniers par le virus de l'immunodéficience humaine 1 (VIH-1) suite à sa capture par les

NETs. Les neutrophiles reconnaissent le VIH-1 grâce aux récepteurs apparemment endosomaux TLR7 et TLR8 activant la voie des ROS conduisant à la NETose des neutrophiles. Lorsque les virions sont piégés par les NETs, la MPO et l'alpha defensine présentent en forte concentration sur les filaments vont les inactiver[430].

Enfin, le rôle important des histones dans la destruction des pathogènes a été démontré. Des expériences avec l'ajout d'anticorps contre les histones ont montré une inhibition de la destruction de différentes classes de micro-organismes déterminée par la formation de NET. Ces faits confirment la supposition que les histones ont la plus forte activité bactéricide[197].

c) L'inactivation des facteurs de virulence

Les agents infectieux possèdent un panel de facteurs de virulence comprenant les adhésines, les facteurs d'invasion, phagocytaires, les endo- et exotoxines. Les protéines présentes à la surface des NETs comme la NE, ont la capacité d'inactiver certains facteurs de virulence notamment au cours des infections à *Salmonella Typhimurium*, *Yersinia Enterocolitica*, *Shigella Flexneri*[431,197]. En ce qui concerne les espèces de *Shigella*, la NE étroitement liée à la cathepsine G, dégradent les facteurs de virulence tels que IpaB et IcsA[432].

d) Signaux de danger

Le système immunitaire inné a évolué pour détecter et réagir à la perturbation de l'homéostasie, grace à des récepteurs qui détectent des molécules appelées « modèles moléculaires associés aux pathogènes » (PAMPs) et des molécules endogènes qui signalent un danger, des «motifs moléculaires associés au danger» (DAMP). Les PAMPs sont communs à de nombreux microbes, par exemple le lipopolysaccharide (LPS), le peptidoglycane et la flagelline, qui sont d'origine bactérienne, ainsi que l'ARN et l'ADN, qui peuvent être d'origine virale, bactérienne ou parasitaire. Certains exemples de DAMP sont les protéines de choc thermique et la protéine HMGB1 pour « high–mobility group box 1 », ainsi que l'ARN et l'ADN de l'hôte[433].

L'ADN peut être détecté par des récepteurs supplémentaires et intracellulaires. L'ADN extracellulaire active le TLR9 (« *Toll like receptor 9* »), présent dans les phagosomes des monocytes et des cellules dendritiques (CD). Le TLR9 est de préférence activé par un ADN non méthylé riche en cytidine et guanosine, ou CpG, qui est plus abondant chez les microbes que chez les eucaryotes. Lande et al. ont montré que l'ADN complexé avec l'antimicrobien LL37 (cathélicidine transformée de 37 acides aminés) ou HMGB1 forme des structures

stables qui activent les cellules dendritiques plus puissamment que l'ADN nu[434]. L'ADN est rarement nu, il se complexe avec des protéines « histoniques » dans les bactéries et avec des histones chez les eucaryotes. Les groupes de Michelle Gilliet et Virginia Pascual ont montré que les NETs activent le TLR9 des cellules dendritiques[395,435]. Les NET peuvent également activer les cellules T, cependant le récepteur par lequel cette activation s'effectue reste inconnu[436]. L'ADN n'est pas le seul composant des NETs qui peut activer le système immunitaire inné. Il a également été rapporté que les histones activent les TLR 2 et 4, ce qui suggère que les NETs sont reconnus par différents récepteurs capables d'activer le système immunitaire inné[437].

6. Implication physiopathologique

a) Effets cytotoxiques des NETs

La cytotoxicité des NETs est en partie due à leur accumulation et leur élimination qui dans certaines pathologies est difficile.

Bien que l'effet bénéfique des NETs dans la lutte contre les agents pathogènes ait été confirmé dans de nombreux résultats cliniques, d'autres études ont montré que les NETs peuvent endommager également les tissus et conduire au développement et à l'intensification d'une affection inflammatoire. Des études récentes ont montré que la formation excessive des NETs et le default de leur dégradation par le DNase sont liés à la pathogenèse de nombreuses maladies inflammatoires et auto-immunes[438]. De plus, des études *in vitro*, ont souligné le rôle prépondérant des histones dans la mort cellulaire induite par les NETs[439]. La cytotoxicité des histones repose essentiellement sur les interactions électrostatiques entre les histones chargées positivement et les molécules chargées négativement perturbant ainsi l'intégrité de la membrane plasmique.

De même, la MPO dont l'effet bactéricide est médié par la conversion du peroxyde d'hydrogène en acide hypochloreux, est capable d'induire l'activation de la caspase-3 dans des cellules leucémiques humaines HP-60 et la dégradation des brins d'ADN des cellules épithéliales pulmonaires[440].

De nombreuses études se sont focalisées sur le potentiel pro-inflammatoire des NETs dans les maladies des voies respiratoires. Les indications de la présence de telles structures dans les alvéoles pulmonaires et le plasma chez les patients présentant une lésion pulmonaire aiguë liée à la transfusion (TRALI) et un syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA)

suggèrent que les NET endommagent l'endothélium et perturbent l'étanchéité des capillaires pulmonaires[441].

b) NETose et maladies thrombotiques

Ces dernières années, le rôle des NETs dans la thrombose a beaucoup été étudié au sein de la recherche clinique et fondamentale. Des études ont démontré que les NET peuvent fournir un échafaudage pour la liaison de la fibronectine, du fibrinogène, du facteur de von Willebrand (vWF) et d'autres composants protéiques impliqués dans la thrombose[442]. Les NETs sont capables de lier les globules rouges, entrainant l'agrégation plaquettaire et favorisant la formation de thrombus[443]. D'autres composants des NETs participent directement ou indirectement au processus de coagulation tels que la MPO et les sérines protéases neutrophiles pouvant inactiver les anticoagulants, tels que les inhibiteurs de la voie TF (TFPI) et la thrombomoduline[444,445]. Les NETs contiennent également des facteurs tissulaires, considérés comme un initiateur principal de la voie extrinsèque de la coagulation plasmatique *in vivo*. L'activation du système de coagulation par les NETs s'effectue par les voies extrinsèques, augmentant le risque de coagulation par la génération de thrombine[446] ; de façon intéressante, la dégradation des NETs suite à l'utilisation de DNase augmente d'avantage la production de thrombine, suggérant que la dégradation des filaments induit la libération de facteurs coagulants. Cependant, ces résultats sont en contradiction avec ceux de Noubouossie et al. qui a constaté que les NETs et les histones citrullinées n'ont aucun effet sur la génération de thrombine alors que l'ADN isolé et les histones neutrophiles humains purifiés induisent de manière significative la génération de thrombine[447]. Ces résultats reflètent la controverse concernant l'effet des NETs sur le système de coagulation. Cela peut être expliqué par la différence de modèle utilisé, et comme expliqué précédemment, la multitude d'inducteur de NETs qui vont induire des filaments extracellulaires dont les compositions varient.

Les NETs, activant la coagulation, leur participation à la thrombose a été étudié. Des études histopathologiques ont montré l'implication des NETs dans la thrombose artérielle et la thrombose veineuse. Des études sur l'induction de la thrombose veineuse profonde réalisées sur le babouin ont révélé le rôle important des NETs dans ce processus[443]. Des études ultérieures ont confirmé que les neutrophiles sont cruciaux pour le processus de thrombose et que le blocage de la formation de NET empêche la formation de thrombus[448]. En plus des modèles animaux, cela a été observé chez l'homme notamment lors d'une étude clinique où les thrombus des patients atteints de thrombose veineuse profonde et

d'hypertension pulmonaire thromboembolique chronique (CTEPH) contenaient des NETs et existent principalement dans le thrombus organisateur. De plus, les taux plasmatiques du complexe ADNdb, MPO, NE et MPO-ADN sont significativement plus élevés chez les patients atteints de CTEPH que chez les volontaires sains[449]. Les NET sont également impliqués dans la thrombose coronarienne ; les thrombus coronaires contiennent plus de NET que les thrombus veineux et les caillots *in vitro*[452]. De plus, les thrombus générés par les NETs montrent des difficultés à être dégradés entièrement par l'activateur tissulaire du plaminogène, cependant une combinaison avec la DNase I est plus efficace[450]. Ceci pourrait être expliqué par les observations de Longstaff et al. qui a constaté que l'ajout de complexes histone-ADN à la fibrine entraînait des fibres plus épaisses accompagnées d'une stabilité et d'une rigidité améliorées[452].

c) Role des NETs dans le cancer

La NETose peut influencer le développement de la tumeur à de nombreux stades, y compris la croissance, l'angiogenèse et les métastases. Leur rôle dans la croissance tumorale est médié par les protéines qui les décors, telles que la NE et la matrice métalloprotéinase-9 (MMP-9). En effet, il a été démontré que la NE pénètre dans les cellules tumorales et hyperactive la phosphatidylinositol-3 kinase tandis que la MMP-9 élimine la matrice extracellulaire environnante pour faciliter la croissance[452,453].

Il a également été démontré que les NETs favorisent les métastases en servant de cadre de capture pour les cellules tumorales en circulation. Une étude a rapporté un dépôt des NETs sur la microvascularisation et un piégeage local ultérieur des cellules cancéreuses en circulation. Les cellules tumorales, immobilisées par les NET, ont survécu et proliféré pour former des nodules. Cela suggère un rôle des NET dans l'amélioration des métastases tumorales[454].

Il a été observé qu'il existe une grande zone nécrotique de neutrophiles morts et de structures de type NET dans le carcinome pulmonaire de Lewis et le sarcome d'Ewing. Ces NETs présents dans les noyaux nécrotiques de tumeurs sous-cutanées de carcinome pulmonaire de Lewis sécrétant du G-CSF, pourraient également favoriser la croissance tumorale, cette supposition est faite car il a été observé que ces tumeurs se développent plus lentement chez les souris déficientes en PAD4[455]. De façon intéressante, l'administration de nanoparticules comprenant de la DNase I inhibe les métastases pulmonaires de tumeurs mammaires agressives[456]. Le mécanisme sous-jacent de cette inhibition pourrait être médiée

par la capture par les NETs de cellules tumorales en migration, en particulier au niveau des sites d'inflammation, qui peuvent être bloquées avec des inhibiteurs de NE et PAD4[454]. Par conséquent, cibler les NETs par ces voies peut être une option thérapeutique prometteuse pour traiter le cancer.

Dans le cas de l'adénocarcinome canalaire du pancréas, une étude a démontré que la voie de l'IL-17 est primordiale pour le recrutement des PMNs dans le micro environnement tumoral. Ces PMNs vont alors entrer en NETose et vont avoir un rôle immunosuppresseur[457]. Le procédé par lequel les NETs influencent la croissance tumorale reste à être exploré.

d) La NETose associée aux maladies auto-immunes

Suite à leur découverte, les NETs ont été proposés pour servir de source d'auto-antigène chez maladies auto-immunes, en particulier celles associées à auto-anticorps contre les protéines dérivées des neutrophiles. En effet, des travaux ont révélé que les NETs induit par des stimulus auto-immuns activent les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) au travers des récepteurs TLR9 et TLR7, favorisant l'expression d'IFN de type I et conduisant à une pathologie auto-immune dans des modèles animaux[395,435]. La capacité des NET à activer les pDC est attribuée à l'association d'ADN avec le peptide antimicrobien LL-37, qui potentialise l'activation du récepteur d'ADN TLR9[435]. Les auto-anticorps secrétés des suites de l'activation des lymphocytes B activés par les pDC, forment des complexes immuns qui à leur tour activent les neutrophiles, formant une boucle d'auto-amplification[435].

Dans la vascularite associée aux auto-anticorps cytoplasmiques appelés ANCA-IgG, un dépôt abondant de NETs a été observé au niveau des reins. Les auto-anticorps produits dans cette maladie sont dirigés contre certains composants des NETs comme la MPO et la protéinase-3[458]. De plus, la susceptibilité des neutrophiles issus des patients atteints de vascularite associée aux auto-anticorps à entrer en NETose est augmenté suite à la stimulation par les IgG. Après 180 min, 23% des neutrophiles incubés avec des ANCA-IgG ont produit des NETs contre 11% des neutrophiles traités par IgG témoins. L'augmentation de la NETose chez ces patients pourrait expliquer les comorbidités associées à leur pathologie.

Dans la polyarthrite rhumatoide, maladie affectant les articulations, il est observé que les auto-anticorps sont dirigés contre des protéines citrullinés. Les NETs étant riches en protéine citrulliné, peuvent être source d'autoantigène dans le cadre de la polyarthrite rhumatoïde [459]. Cela est confirmé par le fait qu'environ 40% des anticorps monoclonaux produits par les cellules B auto-réactifs de PR issus des structures ectopiclymphoïdes synoviales, montrent

une forte réactivité contre les histones H2A / H2B à citrullinés, suivies du fibrinogène citrulliné et de la vimentine citrullinée[459]. Dans l'ensemble, ces études soutiennent l'hypothèse d'un cercle vicieux où la NETose stimule la synthèse des auto-anticorps, qui eux-mêmes augmentent NETosis. En effet, les anticorps anti-vimentine citrulliné induisent puissamment la formation de NET[460].

Dans le cas du lupus erythémateux systémique (LES), les patients présentent des auto-anticorps dirigés contre l'ADN. La chromatine étant un constituant majeur des NETs, cela soulève la question légitime de leur implication dans la physiopathologie de la maladie. Il a été observé que la sous population de PMN de faible densité chez les patients atteint de LES, a une plus forte susceptibilité à la NETose et s'active de manière spontanée[461]. Même les PMNs avec une densité normale, produisent des NETs en réponse aux sérums de ces patients ou aux anticorps anti-ribonucléoprotéine issus de patient LES, après une pré-stimulation par les interférons de type I (IFN), par un mécanisme dépendent des ROS[395]. Les NETs sont également capable d'activiter le récepteur « *nucleotide oligomerization domain receptors* » (NOD) contenant l'inflammasome NLRP3 et d'importants inducteurs d'IFN-α (via les TLR-7 et 9). Il a également été observé une diminution de la degradation des NETs chez les patients SLE potentiellement du à plusieurs mécanismes impliquant l'absence de DNase-1 plasmatique liée à un déficit enzymatique génétique, la présence d'inhibiteurs de DNase-1 et la présence d'Ac anti-NETs les protégeant de l'activité de la DNase-1[438]. Tous ces arguments sont en faveur d'une participation des NETs à la physiopathologie du LES, notamment par leur fort potentiel immunogène et leur participation à la sécrétion d'IFN de type I et leur cytotoxicité directe due à leur accumulation au sein de certains organes comme les reins.

e) Rôle des NETs dans les pathologies pulmonaires

La migration et l'activation des neutrophiles au sein du parenchyme pulmonaire peuvent provoquer une inflammation et une sensibilisation directe. La réaction inflammatoire est vraiment importante pour éliminer des agents pathogènes et solutionner les infections. Mais l'inflammation persistante du système respiratoire conduit fréquemment à certaines maladies indésirables telles que l'asthme, la fibrose pulmonaire et la BPCO.

L'asthme est une maladie pulmonaire inflammatoire chronique très répandue caractérisée par une hyperréactivité des voies respiratoires aux allergènes, une obstruction réversible des voies respiratoires, un œdème des voies respiratoires et une augmentation de la sécrétion de mucus. Les neutrophiles en tant que granulocytes essentiels ont été rapportés par de nombreux

chercheurs comme jouant un rôle critique dans de nombreuses maladies associées à l'immunité, dont l'asthme, en particulier l'asthme sévère réfractaire aux stéroïdes[462]. Le nombre de neutrophiles dans les expectorations induites des asthmatiques est significativement corrélé avec le degré d'obstruction des voies respiratoires et les niveaux d'CXCL8/IL-8[463]. Leur nombre au sein des lavages bronchoalvéolaires permet de discriminer un asthme modéré d'un asthme sévère suggérant que le neutrophile est un facteur aggravant. De plus, la présence de NETs et de ETs issus de polynucléaire éosinophile a été constaté au sein des voies respiratoires des patients asthmatique[422]. Une étude a révélé que l'accumulation de NETs endommageait l'épithélium des voies respiratoires et stimulait la réponse inflammatoire susceptible d'aggraver la maladie[464]. Cependant, le mécanisme par lequel les NETs participent à l'aggravation de l'asthme reste inconnu, bien que l'on peut supposer que leur accumulation au sein du parenchyme pulmonaire peut entrainer des lésions aggravantes notamment du à leur effet cytotoxique direct. Cela est supporter par le fait que les macrophages issus de patients asthmatiques non-éosinophile présentent un défaut d'efferocytose favorisant alors l'accumulation de PMN[465].

Les mutations du gène CFTR dans la mucoviscidose, altère l'activité des canaux chlorures, entrainant la déshydratation des sécrétions muqueuses, en particulier au niveau du tractus respiratoire et digestif à l'origine d'un épaississement des sécrétions. La sensibilité de ces patients aux infections des voies respiratoires, est augmentée. Les neutrophiles sont recrutés dans les voies respiratoires lors de l'infection et exacerbent la maladie en produisant des NETs qui peuvent augmenter la viscosité du mucus déjà problématique chez les patients atteints de mucoviscidose et les protéases telles que NE et MPO peuvent endommager l'épithélium respiratoire et le tissu conjonctif. Au cours de la mucoviscidose, l'effet ambivalent des NETs apparait aux différents stades de la maladie. Les NETs au stade précoce de la maladie ont un rôle bénéfique car il emprisonne les pathogènes, cela a été mis en lumière car l'utilisation de DNase à ce stade libère les pathogènes et les protéases nocives. Cependant, lorsque la maladie est avancée, l'accumulation de NETs dans le mucus bronchique amplifie la réaction inflammatoire et favorise les infections[466].

Comme cité précédemment, les neutrophiles ont un rôle important dans la physiopathologie de la BPCO. La présence de NETs au sein des expectorations induites chez les patients atteints de BPCO stable et exacerbée a clairement été établie[393]. Leur nombre au sein des expectorations est corrélé au degré d'obstruction pulmonaire[467]. Les NETs induit par le virus *influenza pneumonitis*, participe à la cytotoxicité directe des cellules épithéliales et endothéliale des voies respiratoires. Le nombre de NETs et la concentration de leur

composant dans les voies respiratoires des patients atteints de BPCO sont associés à d'autres marqueurs d'activation des réponses immunitaires innées, notamment l'expression de cytokines pro-inflammatoires IL-1β, de la chimiokine CXCL8 et le récepteur NLRP3 retrouvés augmenté chez les patients BPCO comparé aux donneurs sains[468]. Par conséquent, la rétroaction positive des cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines contribue à la persistance des PMNs dans les voies respiratoires observée dans la BPCO et favorise la production de NET supplémentaires, créant ainsi un cercle vicieux. La présence en forte concentration d'CXCL8/IL-8, puissant chémoattractant des neutrophiles, semble être également responsable de l'induction de la NETose chez les patients BPCO. En effet, des preuves émergentes impliquent la signalisation CXCR2 dans la régulation de la production de NET chez les neutrophiles de la BPCO. Le blocage sélectif de CXCR2 utilisant un l'anti-CXCR2, AZD5069, limite la formation de NET *ex vivo* dans le sang autologue et les neutrophiles des expectorations provenant des mêmes patients atteints de BPCO[469].

De plus, la capacité des PMN, issus de patients BPCO qui dans leur expectoration ont beaucoup de NETs, à phagocyter les bactéries est réduite suggérant leur rôle dans la dysbiose microbienne (déséquilibre de la flore microbienne) observée dans la BPCO[470].

Lors des exacerbations, qui sont majoritairement dues à un pathogène tels que le virus respiratoire syncytial (VRS) (figure n°15), les rhinovirus, le virus *influenza A* ou *S. aureus,* cela entraine un recrutement plus important de PMN au sein des poumons qui en présence de ces pathogènes vont libérer des NETs contribuant davantage à l'encombrement pulmonaire et à la destruction du parenchyme pulmonaire. Ceci a été observé dans un modèle murin instillé avec le virus *parainfluenza* de type I, où une réponse inflammatoire a été observée accompagnée de lésions pulmonaires aigues[471].

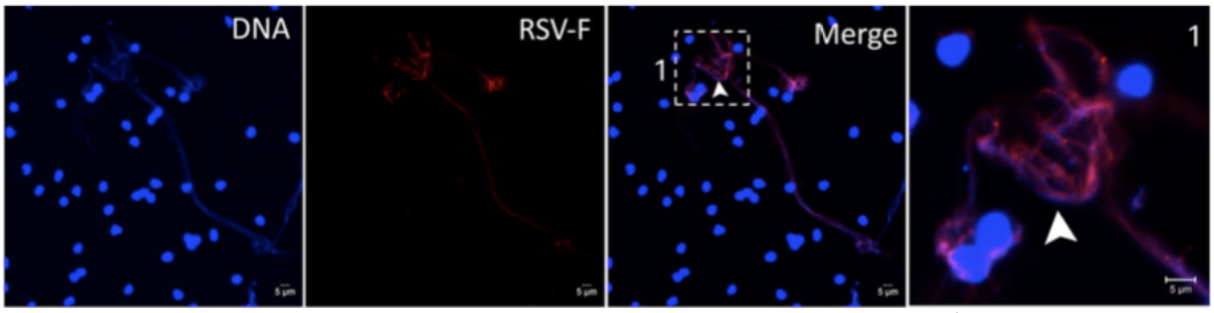

Figure 16 : Microscopie à fluorescence de neutrophile en présence de RSV fluorescent. (source :Muraro S. Scientific reports,2018 [472])

BUT DU TRAVAIL

La BPCO est une maladie inflammatoire complexe qui implique un remodelage des voies aériennes. La fumée de cigarette est le facteur étiologique principale de cette maladie. Les cellules épithéliales bronchiques réagissent aux composants toxiques de la cigarette en recrutant des PMN grâce à la sécrétion de plusieurs médiateurs, notamment l'IL-8 et l'IL-17. L'augmentation de l'expression de l'IL-17 a été corrélée à l'augmentation du nombre de PMN présents dans la muqueuse bronchique des patients BPCO. Cependant, aucun lien direct n'a été établi entre l'IL-17 et l'induction de la NETose des PMN qui contribue avec le mucus à l'obstruction pulmonaire.

L'inflammation pulmonaire est amplifiée lors des exacerbations d'origine virale, notamment suite à l'infection des patients BPCO par le VRS. Le VRS se fixe sur les récepteurs de surface de l'épithélium bronchique grâce à sa protéine G d'attachement et infecte les cellules épithéliales. La première réponse des cellules épithéliales se manifeste par la production de l'IFN-a/b et plusieurs cytokines dont l'IL-17. Aussi, lorsque des souris sont exposées à la fumée de la cigarette (CS) et infectées par le VRS, l'inflammation accrue et l'étendue de l'emphysème constatés au niveau pulmonaire s'accompagnent d'une augmentation de l'expression de l'IL-17. De plus, le VRS induit directement la libération des NETs par les PMN qui sont de véritables réseaux d'ADN recouverts de protéines granulaires (NE et de MPO) qui piègent le VRS. Cependant, bien que la protéine G du VRS soit sécrétée par les cellules épithéliales infectées, son rôle dans l'induction de la NETose des PMN n'a pas été exploré.

L'objectif majeur de ce travail, est d'identifier le rôle d'IL-17 et la protéine G sécrétée du VRS dans l'induction de la NETose des PMNs.

Ainsi, la première partie de ce travail a consisté à caractériser les récepteurs de l'IL-17 présents sur la surface du PMN, qui permettent de fixer l'IL-17. Cette étude s'est effectuée en deux temps : (**1**) une étude en cytométrie en flux sur les PMNs de sang périphérique total ou après purification à partir de sang de plusieurs donneurs sains en utilisant des anticorps dirigés contre les différents récepteurs : IL-17RA, IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD, IL-17RE. (**2**) une étude moléculaire ayant pour but la détection de l'ARNm synthétisé par 1es PMNs grâce à l'utilisation de la technique de RT-PCR.

La deuxième partie de ce travail a consisté à évaluer 1'activation des PMNs par l'IL-17 via son site de liaison, laissant envisager une fonction physiologique de cette cytokine très abondante dans les sécrétions pulmonaires où elle peut être en contact avec les PMNs. On a choisi la Nétose qui se manifeste par le relargage de l'ADN et des protéines (NE et MPO) issues des granules des PMN.

La troisième partie de ce travail a consisté à évaluer l'effet de la protéine G sécrétée du VRS sur la formation des NETs au niveau des PMNs. Sachant que les PMNs sont les principales cellules responsables de la NETose. Cette étude a été effectuée sur des PMNs hautement purifiés par la technique de MACS qui permet d'obtenir des neutrophiles par sélection négative à partir du sang périphérique.

MATERIELS ET METHODES

- **Isolement des PMNs à partir de sang périphérique humain**

Cette étude a été approuvée par le comité d'éthique du Pôle santé de l'Université de Reims Champagne-Ardenne. Le sang a été prélevé, par l'Établissement Français du Sang (EFS - Reims, France) dans des tubes contenant un anticoagulant stérile, de la veine du pli du coude de donneurs sains, bénévoles et consentants. La population étudiée est constituée de 67% d'homme et 33% de femme avec une moyenne d'âge de 45,4 ans (22-65 ans). Suivant la méthode de purification utilisée, le sang est prélevé dans des tubes contenant de l'héparine de lithium ou de l'EDTA (K2E, Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France). Plusieurs méthodes de séparations ont été utilisées. Les PMNs sont obtenus par gradient de densité Granulosep® (Eurobio, Les Ulis, France) après centrifugation à 500xg pendant 1h. A l'issue de la centrifugation, l'anneau contenant les PMNs est collecté et lavé dans du RPMI-1640 Glutamax (Gibco), de meme que l'anneau contenant les PBMCs afin d'effectuer divers contrôle d'experience. Les érythrocytes sont lysés par incubation avec un tampon d'érythrolyse (0,2 M NaCl) pendant 30 secondes maximum, puis 10 ml de tampon de rééquilibrage (NaCl 1,6M) sont ajoutés rapidement pour rétablir l'isotonie. L'autre méthode de séparation consiste en une sélection négative des PMN par billes magnétiques (MACSxpress® Whole Blood Neutrophil Isolation Kit) à partir de sang total prélevé sur EDTA, selon les recommandations du fournisseur (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Allemagne). Brièvement, 8mL de sang total sont incubés avec 4mL d'un mélange de billes magnétiques couplées à des anticorps dirigés contre les cellules sanguines qui ne sont pas des PMNs pendant 5 min en rotation à 12 rpm. Le tube après ouverture est ensuite placé dans un portoir magnétique pendant 15 min. Le surnageant est collecté puis centrifugés afin de récupérer un culot de PMN. Les PMNs sont repris dans le milieu de culture RPMI-1640 Glutamax (Gibco) contenant 0,1% de Penicillin/Streptomycin. Les PMNs sont comptés et suspendus à raison de 10^6/ml.

- **Préparation de l'Extrait de Fumée de Cigarette (CSE)**

Les cigarettes du commerce (Marlboro; Philip Morris USA, Richmond, VA) ont été utilisées dans cette étude. La préparation de la solution d'extrait de fumée de cigarette, a été effectuée comme le montre la figure 12. Chaque cigarette a été placée à l'extrémité d'un tube en silicone relié à un erlenmeyer contenant 100 ml de milieu de culture. A l'autre extrémité, un deuxième tuyau en silicone relié à l'erlenmeyer a été raccordé à une pompe à vide standard. La cigarette était allumée, et la fumée était extraite par application du vide, en aspirant la fumée directement dans le milieu de culture créant des bulles dans le milieu. Les

bulles de fumée imprègnent le milieu de culture. Le processus a été répété pour un total de vingt cigarettes entières. La solution d'extrait de fumée de cigarette obtenue (considérée à 100% CSE) a ensuite été stérilisée par filtration à travers un filtre de 0,22 µm et conservée à 4°C jusqu'à son utilisation.

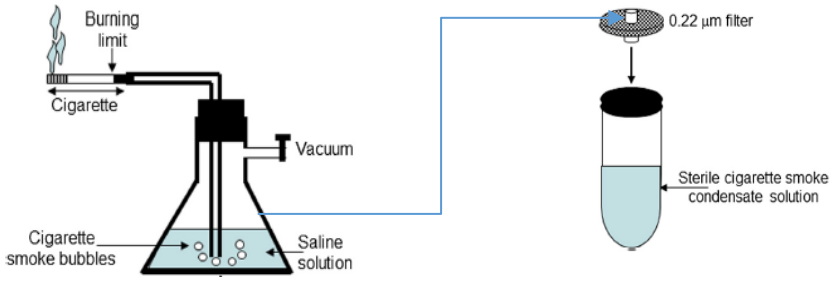

Figure 17 : Schéma du dispositif permettant le génération du CSE. (adapté d'après Semlali et al. [262])

- **Transcription inverse et analyse par PCR**

Afin de limiter la dégradation de l'ARN par les ribonucléases, le matériel et les solutions sont autoclavés à 200°C pendant deux heures. L'ARN total des PMNs est obtenu en utilisant la méthode du Trizol (TRI-Reagent (Euromedex, Bas-Rhin, France). L'ADN complémentaire est synthétisé par rétrotranscription en utilisant la transcriptase inverse (RT) Maxima, une enzyme dérivée par évolution de la RT M-MuLV (Maxima First Strand cDNA kit ; Life Technologies, Carlsbad, Californie, Etats-Unis). L'ARN (2µg) est dénaturé à 60°C pendant 2 minutes et la transcription en cDNA est réalisée à 37°C pendant une heure dans un volume de 20 µl en présence de 0.5 µl d'oligo dT (0.8 µg/ml) (Promega), 1.5 µl MuLV (200U/µl), 1µl de dNTPs (l00mM).

L'amplification des ARNm codants pour l'IL-17RA, l'IL-17RB, l'IL-17RC, l'IL-17RD, IL-17RE et GAPDH a été effectuée par RT-PCR. Le mélange réactionnel pour la PCR se composait de 1,5 mM $MgCl_2$, 1 µl tampon de PCR, 0,25 mM mélange de dNTP, 2,5 unités de Taq polymérase (Invitrogen Life Technologies), 0,4 µM de chacune des amorces sens et antisens, ainsi que de 3 µl de cDNA. Les amorces utilisées sont les suivantes :

Oligo-nucléotide	Séquence sens	Séquence anti-sens	Amplicon (pb)
IL-17RA	TGCCCCTGTGGGTGTACTGGT	GCAGGCAGGCCATCGGTGTA	151
IL-17RC	CTGCCCTTGTGCAGTTTGG	CAGATTCGTACCTCACTCCCTA	85
GAPDH	TGCACCACCAACTGCTTAGC	GGCATGGACTGTGGTCATGAG	87

Les échantillons ont été amplifiés dans un thermocycler (PCR express, Hybaid) durant 35 cycles composés d'une phase de dénaturation à 95°C, d'hybridation à 62°C et d'extension à 72°C. Les produits de PCR ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% contenant du bromure d'éthidium (0,1 µg/ml). La taille correcte des bandes a été déterminée par comparaison avec un marqueur de poids moléculaire (Invitrogen).

- **Analyse de l'expression de l'IL-17R par cytométrie en flux**

Sang Total : le sang total est prélevé sur EDTA et 10 µl de sang sont immédiatement incubées pendant 30 min à température ambiante avec des anticorps monoclonaux de souris dirigés contre l'IL17RA, l'IL-17RB, l'IL-17RC, l'IL-17RD et IL-17RE. Ces anticorps sont couplés à l'APC (R&D system) dans des tubes différents. En parallèle, des contrôles isotypiques ont été utilisés afin d'écarter toute fixation non-spécifique des anticorps d'intérêt. Les érythrocytes sont lysés dans le tampon de lyse, BD FACS™ Lysing Solution 10X Concentrate, préalablement dilué (BD biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, Etats-Unis) et les cellules sont fixées. Les cellules sont centrifugées et le culot cellulaire est remis en suspension dans du PBS contenant 2mM d'EDTA (PBS-EDTA). La fixation des anticorps sur les récepteurs correspondants est analysée par cytométrie en flux grâce au cytomètre BD LSR Fortessa (BD Biosciences) et les données sont analysées par les logiciels : BD Diva (BD Biosciences) et FlowJo (FlowJo, Ashland, OR).

PMNs purifiés : Les PMNs isolés avec ou sans pré-stimulation avec le TNF-α à 20 ng/mL pendant 1 heure à 37°C sous atmosphère enrichi en CO_2, sont dispatchés à raison de 250000 cellules par tube et incubés pendant 15min à température ambiante avec le marqueur de viabilité FVS 450 (BD Biosciences) dilué au 1000ème. Ce colorant de viabilité cellulaire se lie de manière covalente aux amines intracellulaires. Les cellules vivantes sont uniquement marquées à la membrane, lorsque les cellules sont mortes, la membrane est compromise, les colorants pénètrent dans les cellules et réagissent avec les amines primaires intracellulaires. La fluorescence est alors plus importante en raison de l'augmentation de la teneur en amines libres accessibles dans les cellules mortes, ce qui permet de les distinguer facilement des cellules vivantes. Les cellules sont lavées avec du PBS-EDTA à 0,5% de sérum de veau fœtal afin d'éliminer l'excès de colorant. Les cellules subissent une centrifugation de 5 min à 500xg. Les récepteurs Fc au niveau des PMNs sont bloqués grâce au BD Fc Block (BD biosciences) pendant 15 min à 4°C. Les cellules sont ensuite lavées PBS-EDTA à 0,5% de sérum de veau fœtal et sont centrifugées à 500xg pendant 5min. Le culot cellulaire obtenu est mis en suspension dans du PBS-EDTA et 0,5% de sérum de veau fœtal puis incubées avec les

anticorps primaires dirigés contre l'IL17RA, l'IL-17RB, l'IL-17RC, l'IL-17RD, IL-17RE et directement couplés à l'APC (R&D system) dilués au 50ème dans des tubes différents. Après 30 min d'incubation à l'abris de la lumière et à 4°C, les anticorps non-fixés sont éliminés par deux lavages successifs au PBS-EDTA. Le culot cellulaire obtenu est repris dans 100 µl de Paraformaldehyde (PAF) à 4% pendant 15 minutes à l'abris de la lumière et à température ambiante. Après fixation, les cellules sont lavées puis suspendues dans une solution de PBS-EDTA et analysées par le cytomètre en flux BD comme décrit précédemment.

- **Induction de la NETose des neutrophiles**

Les PMN ($2x10^5$ cellule/puit) purifiés sont déposés dans une microplaque de 96 puits dans un volume final de 100 µl. Dans les expériences d'imagerie les PMNs sont déposés sur une lamelle de verre préalablement recouverte de la Poly-L-Lysine (L-Lysine 98%) dans un volume total de 200 µl. Les PMN sont stimulés avec l'IL-17, la protéine G recombinante du VRS (sG) ou les CSE à 2,5% et 5% pendant 3h à 37°C, 5% de CO_2. Le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA, 25 nM) (Sigma Aldrich, Lyon, France), connu pour sa capacité à induire les NETs, est utilisé comme contrôle positif dans ces expériences. Dans certaines conditions, les PMNs sont pré-stimulés durant 1 heure avec le TNF-α à 20 ng/mL sous atmosphère à 5% de CO_2 et à 37°C. Après l'incubation, le milieu contenant le TNF-α est délicatement collecté puis remplacé par du milieu contenant des concentrations croissantes d'IL-17A (1, 10, 25, 50 ou 100 ng/mL) (R&D system) durant 3 heures. Lorsqu'il n'y a pas de pré-stimulation, les PMNs sont directement incubés avec du milieu de culture contenant des concentrations croissantes d'IL-17A (1, 10, 25, 50 ou 100 ng/mL). Pour induire la NETose, les différents inducteurs sont ajoutés individuellement à chaque puit aux concentrations mentionnées dans les légendes des figures ou en combinaison. Nous avons arrêté l'incubation avec les stimulus après trois heures, car après ce temps, une mort cellulaire spontanée a été observée chez des PMNs témoins.

- **Quantification de la NETose**

Les NETs induits sont détachés des PMNs grâce au traitement par la nucléase micrococcale (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis) diluée dans un tampon contenant 50 mM NaCl, 10 mM TrisHcl, 10mM $MgCl_2$, 2mM $CaCl_2$ à pH 7,5 à raison de 0,6 U/mL, durant 30 minutes à 37°C sous atmosphère enrichie à 5% de CO_2. La réaction est arrêtée par addition de l'EDTA à une concentration finale de 2mM. L'ADN double brin contenu dans le surnageant est dosé par le kit Quant-it™ dsDNA Assay Kit, High sensitivity (Invitrogen) suivant les recommandations du fournisseur. La fluorescence qui est proportionnelle à la

quantité d'ADN présente dans les surnageants des PMNs est mesurée par le lecteur de plaque FLUOstar Omega microplate reader (BMG Labtech, Champigny-sur-marne, France) et la concentration de l'ADN est déterminée grâce à une gamme d'étalonnage de concentration connue en ADNdb.

- **Quantification par imagerie**

Les PMNs fraîchement isolés sont incubés dans des puits contenant des lamelles couvre-objet préalablement recouvertes de Poly-L-Lysine puis stimulés comme décrit précédemment. Après 3h de stimulation, les lamelles sont collectées puis rincées au PBS puis les cellules sont fixées au PAF 4% pendant 15 min à température ambiante. Après deux lavages successifs au PBS, les cellules sont colorées au DAPI et au sytox orange tout deux dilués au 1/5000 (Invitrogen) durant 15 min à température ambiante à l'abri de la lumière. Après deux lavages au PBS, les lamelles sont montées avec du milieu Shandon™ Immu-Mount™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis) sur des lames. Les lames sont lutées à l'aide de vernis à ongle puis observées au microscope à épifluorescence inversée (AxioObserver Z1: Zeiss, Germany; camera Cool Snap HQ2: Roper Scientific, Les Ulis, France) avec l'aide du logiciel Metamorph (Molecular devices, version 7.7.10, San Jose, Californie, Etats-Unis).
Une méthode de quantification des NETs faisant appel à une application dans le logiciel Image J, a été développée au sein du laboratoire en collaboration avec la plateforme d'imagerie PICT. Cette application permet de déterminer le nombre de noyaux de PMN coloré au DAPI et les NETs sont quantifiés par le signal émis par le Sytox Orange. Les

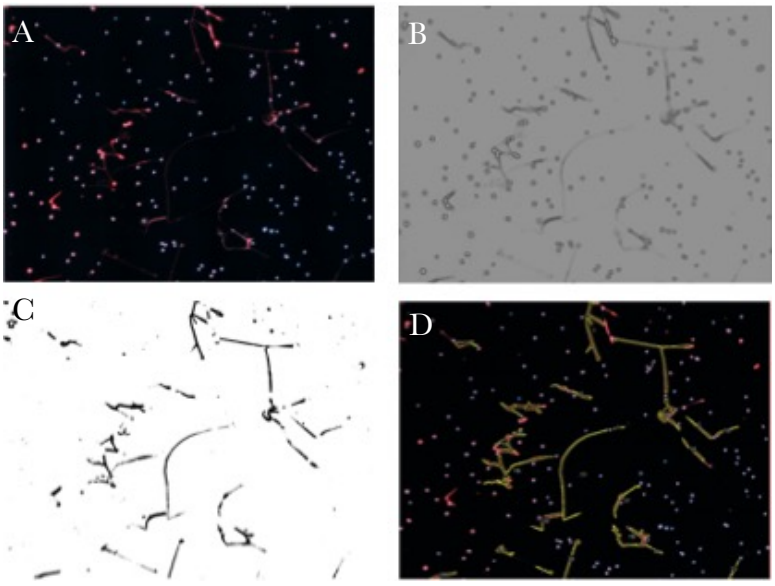

Figure 18 : Méthode de quantification par l'application d'Image J. (A) Image d'origine. (B) Image floutée afin d'accentuer le contraste des NETs. (C) Image inversée et suppression du signal émis par le DAPI afin de révéler les NETs. (D) Les NETs identifiés par l'application sont entourés en jaune sur l'image d'origine afin de vérifier manuellement l'exactitude de leur tracé. Source : Kevin Didier et Al. J Clin Med. 2020 (263)

images de microscopie obtenues sont traitées suivant le processus illustré dans la figure 13 ci-après. L'image d'origine (Fig. 13A) est floutée afin d'accentuer les bords des NETs et augmenter le contraste (Fig. 13B), puis inversée de façon à obtenir une image en noir et blanc (Fig. 13C). Les NETs (nombre et aire) sont ensuite quantifiés en soustrayant le signal émis par le DAPI du signal émis par le Sytox Orange. Ce processus permet ainsi une mesure du nombre total de NETs, du nombre moyen de NETs par PMN et de l'aire moyenne de NETs par PMN sur la zone analysée[473] .

- **Visualisation des NETs et immunofluorescence**

Pour visualiser la NETose sur les lamelles recouvertes de Poly-L-Lysine, ces dernières sont rincées deux fois dans le PBS puis les PMNs sont fixées avec une solution de PBS contenant 4% de PAF pendant 20 minutes à température ambiante. Après deux rinçages au PBS, les sites de fixation non-spécifique sont saturés avec 100 µl d'une solution contenant 10% de sérum de cheval pendant 30 min à température ambiante. La présence de NETs est révélée grâce à la technique d'immunofluorescence un anticorps monoclonale de lapin dirigé contre la MPO ou un anticorps monoclonale issus d'hamster, dirigé contre l'élastase du Neutrophile couplé directement au FITC et à l'Alexa fluor 647 respectivement (Cell signaling, Danvers, Massachusetts, États-Unis)(Biotechne, Minneapolis, Minnesota, Etats-Unis) dilué au 1/50. Après incubation à 4°C durant une nuit, les lamelles sont lavées deux fois au PBS. L'ADN des noyaux cellulaires est marqué grâce au colorant DAPI dilué au 1/5000 et pendant 30 min à 4°C. Après deux rinçages au PBS, les lamelles sont montées sur une lame avec un produit permettant leur adhérence, le Shandon™ Immu-Mount™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis). Les NETs sont observés avec un microscope à épifluorescence inversée (AxioObserver Z1: Zeiss, Germany; camera Cool Snap HQ2: Roper Scientific, Les Ulis, France) avec l'aide du logiciel Metamorph (Molecular devices, version 7.7.10, San Jose, Californie, Etats-Unis). En parallèle de l'immunofluorescence, les neutrophiles ainsi que les NETs obtenus après stimulation sont colorés par la variante rapide de la coloration May-Grünwald Giemsa avec le kit RAL555 (RAL diagnostics, Martillac, France). Brièvement, les lamelles sont plongées pendant 5 secondes dans la solution de fixation, FIX-RAL 555, puis 5 secondes dans la solution EOSINE-RAL 555 contenant une solution d'éosine, ayant une affinité particulière avec les éléments basiques tel que le cytoplasme des cellules et 5 secondes dans la solution BLEU-RAL 555 contenant une solution de bleu de méthylène, se fixant aux éléments cellulaires acides comme la chromatine des cellules et donc les noyaux. Les lamelles sont ensuite rincées à l'eau claire puis fixées sur des lames pour être observées à la lumière blanche au microscope inversé (Zeiss, Germany).

- **Statistiques**

Les résultats obtenus sont représentés sous forme de diagramme en boite. Les résultats ont été comparés statistiquement avec un test RM One-way ANOVA. Les graphiques et les statistiques ont été réalisés avec le logiciel Prism 9 (GraphPad, La Jolla, CA, USA).

RESULTATS

- **Caractérisation des récepteurs de l'IL-17 présents à la surface des PMNs, par cytométrie en flux.**

Nous avons débuté notre étude par la caractérisation des récepteurs à l'IL-17 au niveau de la surface cellulaire des PMNs humains issus de donneurs sains. Les cellules de sang total ont d'abord été analysées. La sélection de la population d'intérêt a été effectuée avec les paramètres de taille et de structure cellulaires SSC et FSC et grâce au marqueur de survie. Les cellules dans la population sélectionnée en taille/structure ont été analysées pour le marqueur de viabilité FVS450, sélectionnant uniquement les cellules non-marquées. Afin de vérifier que la population sélectionnée est bien celle des PMNs, un marquage au CD16 a été effectué comme contrôle confirmant l'identité de la population sélectionnée. Nos résultats de cytométrie en flux montrent que les rapports des médianes de fluorescence de l'APC marquant l'IL-17RA contre les cellules non-marquées ont une médiane de 13,7 (n=7). Les PMNs issus de sang total, expriment fortement l'IL-17RA à leur surface. L'IL-17RA est la sous-unité commune des récepteurs, car elle s'apparie à la plupart des autres membres de l'IL-17R pour la liaison des membres de la famille de l'IL-17.

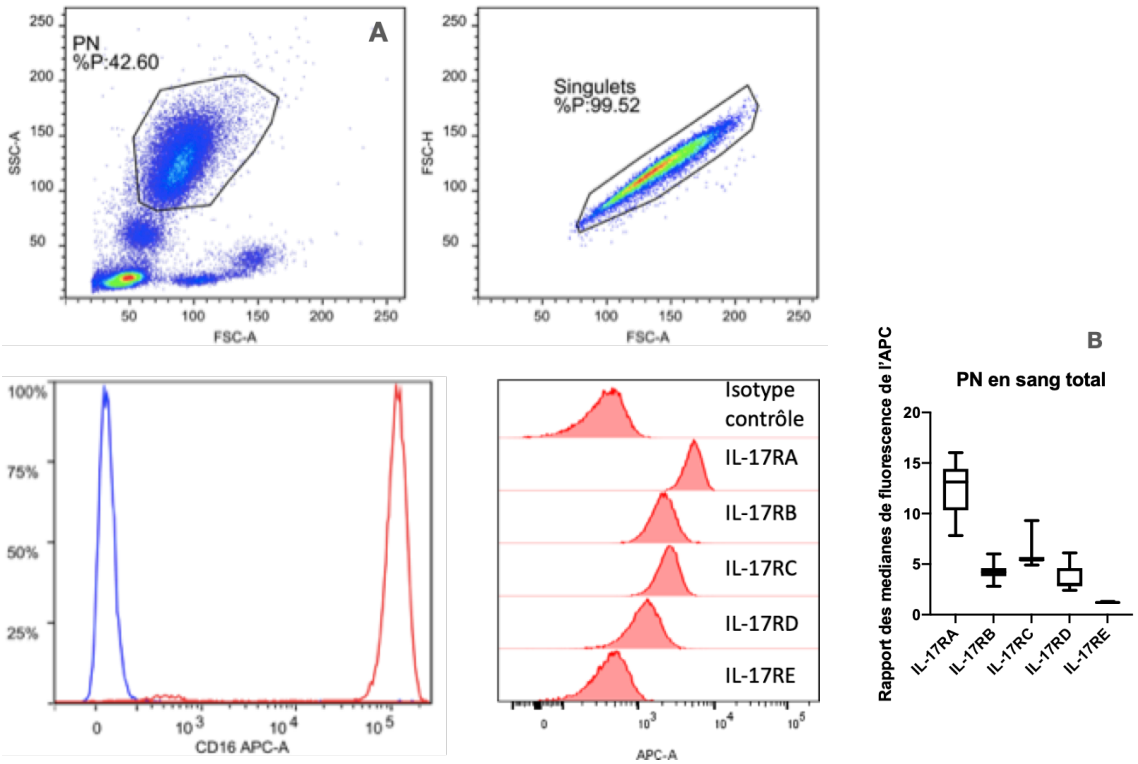

Figure 19 : Cytographe illustrant (A) la selection de la population de PMN en sang total et les résultats de phénotypes des récepteurs à l'IL-17 sur ces PMNs. (B) Rapport des médianes de fluorescence de l'APC couplé aux anticorps dirigés contre les récepteurs de l'IL-17 sur les PMN isolés par Granulosep (n=7). Le rapport a été effectué par rapport à la mediane de fluorescence obtenue sur les cellules non marquées.

Nos résultats montrent également que l'IL-17RB, l'IL-17RC, l-IL-17RD sont présents à des taux variables au niveau de la surface des PMNs du sang périphérique. Cependant, ces

trois récepteurs sont moins exprimés que l'IL-17RA avec des médianes de 4, 5 et 3 respectivement. Quant à l'IL-17RE, il n'est pas retrouvé au niveau de la surface des PMNs obtenus et manipulés dans les mêmes conditions. Les rapports des médianes de fluorescence de l'APC des cellules incubées avec l'anticorps anti IL-17RE-APC et celles des cellules non marquées étant tous égaux à 0.

L'analyse des récepteurs a été effectuée également sur les PMNs de 3 donneurs sains et isolés sur un gradient de densité Granulosep (Fig. 15). L'analyse par cytométrie en flux, nous a permis dans un premier temps d'observer que la population sélectionnée en taille structure était positive au marqueur CD16 confirmant qu'il s'agit bien de PMN (Figure 15A).

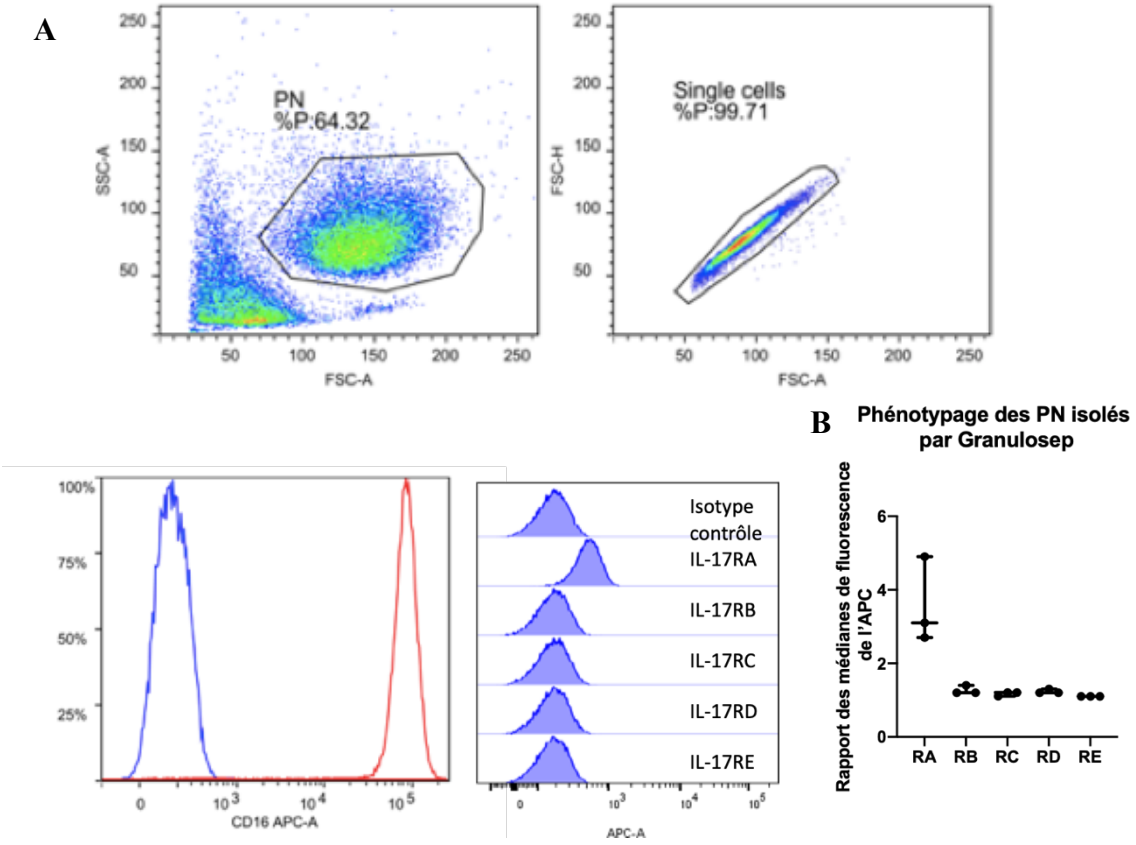

Figure 20 Cytographes illustrant (A) la sélection de la population de PMN isolée par granulosep et les résultats de phénotypes des récepteurs à l'IL-17 sur ces PMNs et (B) les rapports des médianes de fluorescence de l'APC couplé aux anticorps dirigés contre les récepteurs de l'IL-17 sur les PMNs isolés par Granulosep (n=3). Les rapports ont été calculés par rapport à la médiane de fluorescence obtenue sur les cellules non marquées.

Nos résultats montrent que seul le récepteur IL-17RA est exprimé au niveau de la surface cellulaire alors que les autres récepteurs, IL-17RB-E, ne semblent pas être présents au niveau de la surface cellulaire (Fig. 15A). Les résultats montrent que le rapport des médianes de fluorescence des PMNs marqués/non marqués avec l'anticorps anti-IL-17RA-APC est égale ou supérieure à 3 pour les 3 donneurs tandis que pour l'IL-17RB-E ces rapports sont de 1 (Figure 15B). Des résultats similaires ont été obtenus après purification des PMNs sur Ficoll-

Dextran ou après sélection négative grâce à des billes magnétiques couplées à des anticorps dirigés contre différents leucocytes (MACSxpress).

- **Expression de l'ARNm d'IL-17Rs par les PMNs de donneurs sains, détectée par RT-PCR**

Les expériences réalisées ci-dessus, suggèrent que les PMN de donneurs sains expriment les IL-17RA-D au niveau protéique. Nous avons cherché par la suite l'expression de deux récepteurs, IL-17RA et IL-17RC, au niveau moléculaire par RT-PCR sur de l'ARN de PMN de sang périphérique de deux donneurs et purifiés à 98% (Fig. 16). Nous avons focalisé nos recherches sur l'IL-17RA et l'IL-17RC car ils constituent le récepteur hétéro-trimérique de l'IL-17A. Les PBMCs ont été utilisés comme témoins positifs car la littérature a démontré qu'ils exprimaient ces deux récepteurs. L'analyse de l'expression de ces récepteurs par RT-PCR montre que les PMNs synthétisent l'ARNm codant pour l'IL-17RA (Fig. 16A) et l'IL-17RC (Fig. 16B).

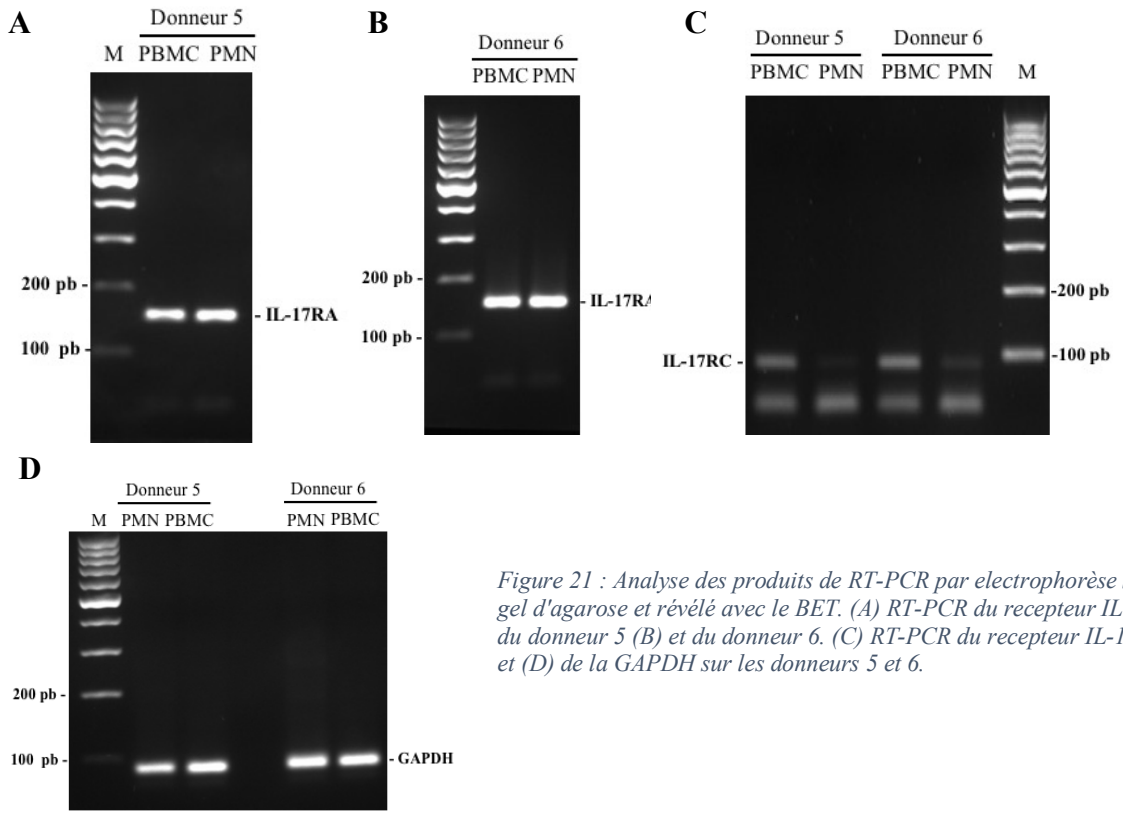

Figure 21 : Analyse des produits de RT-PCR par electrophorèse sur gel d'agarose et révélé avec le BET. (A) RT-PCR du recepteur IL-RA du donneur 5 (B) et du donneur 6. (C) RT-PCR du recepteur IL-17RC et (D) de la GAPDH sur les donneurs 5 et 6.

Les résultats de RT-PCR montrent également la présence de l'ARNm de ces deux récepteurs au niveau des PBMC. La même expérience réalisée en absence de transcriptase inverse ne donne aucun signal (résultats non montrés), confirmant que la RT-PCR permet la détection de l'ARNm et non l'ADN génomique. En parallèle, le cDNA correspondant à la GAPDH (figure 16, C) a également été amplifié pour s'assurer de la quantité et de qualité de

l'ARNm entre les échantillons. Ces résultats suggèrent que la procédure d'isolation peut influencer l'expression des IL-17Rs au niveau des PMNs.

- **Expression des IL-17Rs suite au priming des PMN de donneurs sains par le TNF-α, détectée par cytométrie en flux.**

De par son rôle d'immunomodulateur et pro-inflammatoire dans différentes pathologies respiratoires, le TNF-*α* a été utilisé dans ces expériences de priming pour étudier son effet sur l'expression des IL-17Rs. Les PMNs de 3 donneurs différents sont incubés pendant 1 heure avec du TNF-α (20 ng/mL) et analysés par cytométrie en flux après réalisation d'un immunomarquage grâce aux anticorps dirigés contre les IL-17Rs (Figure 17). Nos résultats montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre les rapports de médianes de fluorescence des PMN pré-stimulés par le TNF-α et les PMN non stimulés.

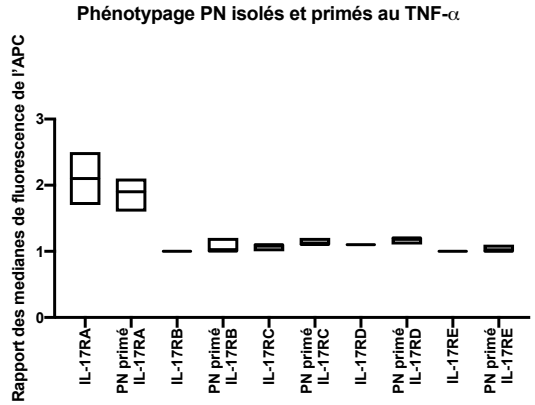

Figure 22 : Rapport des médianes de fluorescence de l'APC couplé aux anticorps dirigés contre les récepteurs de l'IL-17 sur les PN isolés par MACSxpress puis primés avec du TNF- à 20 g/mL (n=3). Le rapport a été effectué par rapport à la médiane de fluorescence obtenue sur les cellules non marquées

- **Induction de la NETose des PMNs par l'IL-17**

Pour étudier la capacité de l'IL-17A à induire la NETose au niveau des PMNs, nous avons effectué des expériences de coloration au MGG et d'immunofluorescence (Figure 18). Nos résultats montrent que par rapport aux PMNs non stimulés (Fig. 18A), la stimulation des PMNs par l'IL-17A recombinante à différentes concentrations induit le relargage de l'ADN des cellules stimulées dans le milieu extracellulaire sous forme de Nets (Fig. 18 B-E). Comme décrit par plusieurs auteurs, le PMA représente un bon inducteur de la Nétose au niveau des PMNs (Fig. 18F).

Plusieurs données de la littérature ont démontré la présence de protéines granulaires du PMN au sein des NETs. Une expérience d'immunofluorescence a été donc réalisée afin de confirmer la présence des filaments d'ADN décondensés et recouverts de protéines (Fig. 18 G-I). Nos résultats montrent un marquage des brins d'ADN extracellulaires avec la

neutrophile élastase (Alexa Fluor 647, marquage rouge) ainsi qu'avec la MPO (FITC, marquage vert) avec co-localisation à certains endroits. Le signal émis par le DAPI étant plus faible que celui du FITC et de l'Alexa Fluor 647, cela ne nous permet pas de distinguer l'ADN des deux protéines granulaires constitutives des NETs sur les images présentées.

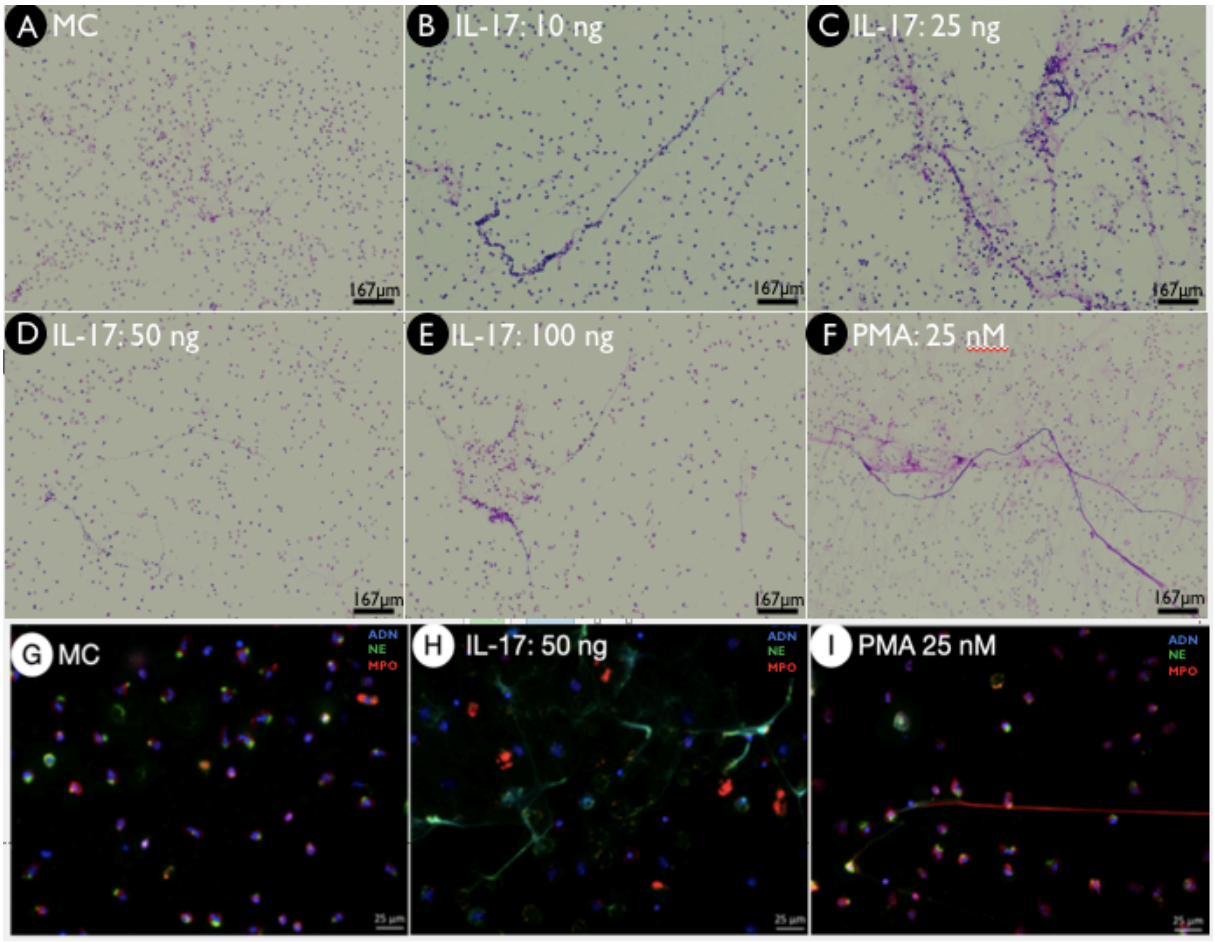

Figure 23 :Image de microscopie des PMN dans différentes conditions de stimulation.(A-F) Images des PMN colorés par le kit RAL observée au microscope inversé sous objectif x10 et suite à un immunomarquage fluorescent avec des Anticorps dirigés contre la NE couplés à l'Alexa fluor 647(coloré en rouge) et la MPO couplés au FITC,(coloré en vert) et le DAPI (colorant l'ADN en bleu) (G-I).

- **Quantification de la NETose par Imagerie**

Nos résultats montrent que la quantification par imagerie de la NETose induite par l'IL-17A ne donne aucune différence significative par rapport à celle obtenue avec les PMNs non stimulés (NS), et ce, quel que soit le paramètre observé (nombre de Nets total, DANA et nombre de NETs par noyau) (Fig. 19). Une légère tendance à l'augmentation à partir de 50 ng/mL est constatée, cependant les tests statistiques ne démontrent pas de différence significative entre la NETose des PMNs stimulés avec l'IL-17A recombinante et celle des PMNs non stimulés.

L'application qui sert à la quantification des NETs s'est révélée inadaptée pour la quantification des images obtenues bien qu'elle ait été utilisée avec succès dans d'autres études menées au laboratoire. En effet, le nombre de NETs semble surestimé, de même que le calcul de leurs surfaces. Malgré les tentatives d'ajustement des différents paramètres de cette application afin de palier à ces problèmes de surestimation, la détection des NETs était toujours erronée. Pour pallier à ce problème, une quantification manuelle des noyaux, des NETs et de leurs surfaces, a été mise en place dont les résultats sont présentés sur la figure 19 ci-après.

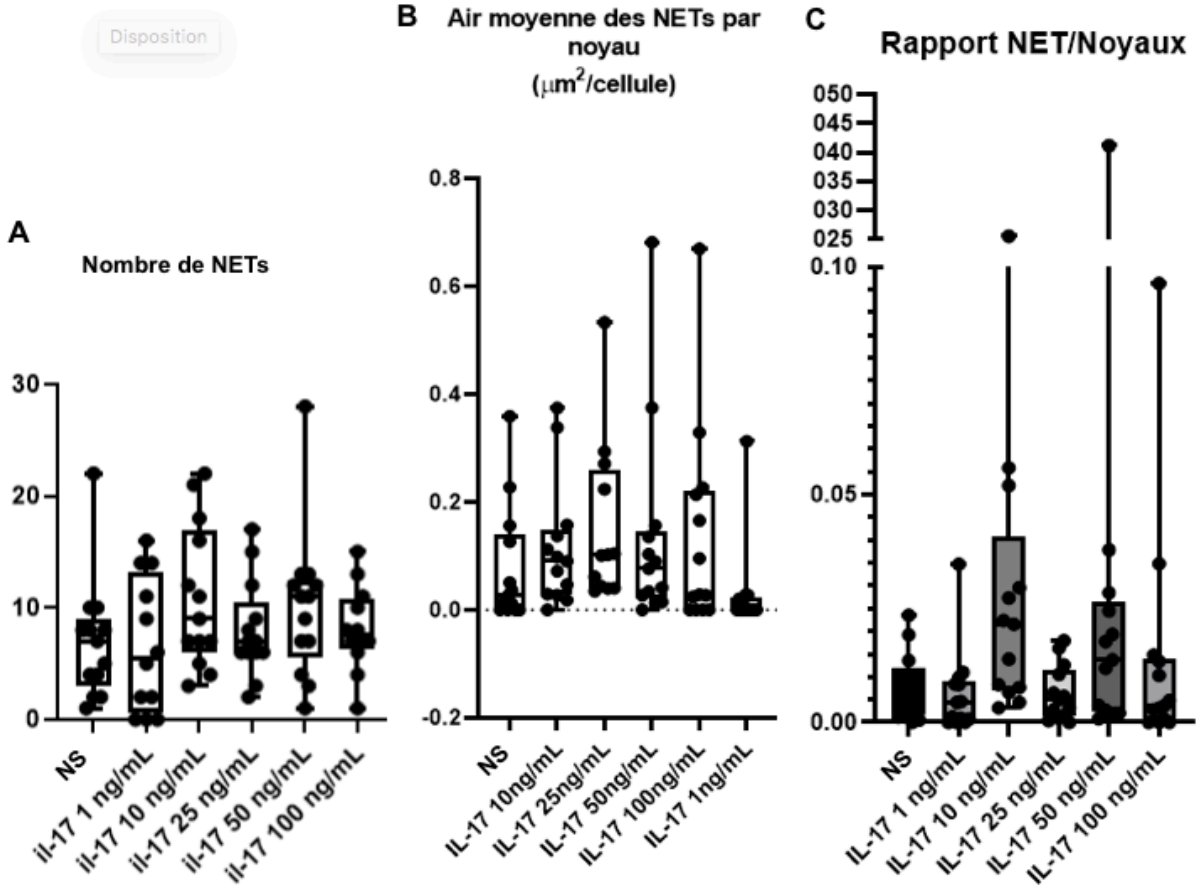

Figure 24 : Etude de la NETose des PMN isolés induite par l'IL-17A. La quantification a été effectuée par imagerie suite au traitement des images de microscopie à fluorescence réalisées sur les NETs colorés au DAPI et SytoxOrange. La quantification a été réalisée avec l'aide d'Image J notamment pour le calcul des surfaces des NETs.(A) Quantification du nombre de NETs observés par condition,(B) DANA : DNA area and NETosis analysis est une méthode de quantification décrite par Ryan Rebernick et représente l'air moyenne des NETs par cellule.(C) Graphique représentant le nombre de NETs par rapport au nombre de cellule comptée en fonction des conditions de stimulation (n= 13).

Afin de confirmer ou réfuter les résultats obtenus avec la quantification par imagerie de la NETose induite par l'IL-17A, une technique de quantification de l'ADN obtenu après digestion des NETs par la MNase a été utilisée (figure 20). On observe que la concentration d'ADN obtenue après digestion des NETs induits par différentes concentrations d'IL-17A recombinante n'est pas significativement différente de celle obtenue à partir des PMNs non stimulés (NS). On peut constater que pour certains donneurs la concentration en ADN est augmentée dans les conditions de stimulation par l'Il-17A.

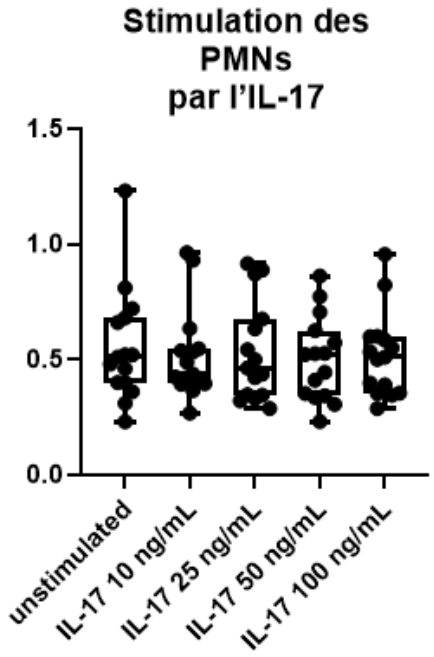

Figure 25 : Graphique représentant les résultats de quantification de l'ADN relargué par les NETs après digestion par la Mnase. (n =15).

- **Induction de la NETose des PMNs par l'IL-17 et la fumée de cigarette (CSE)**

Au sein du parenchyme pulmonaire, lors de la consommation de cigarette, les PMNs recrutés sont exposés à la fois à la fumée de cigarette et à des concentrations élevées d'IL-17A. Nous avons voulu explorer l'effet simultané de l'IL-17A et le CSE sur la NETose (fig. 21). Les PMNs isolés sont à la fois stimulés avec l'IL-17A (50ng/mL) et différentes concentrations de CSE (0,5% et 1,5%) pendant 3 heures. L'ADN des NETs libéré par la MNase a été quantifié et rapporté à celui des PMNs non stimulés. Nos résultats montrent que la stimulation des PMNs par 0,5% de CSE a un rapport de concentration d'ADN ayant une médiane de 2,5 par rapport aux PMNs non stimulés. Cependant, les tests statistiques ne démontrent pas de différence significative entre la NETose induite par la CSE seule ou celle induite simultanément par l'IL-17A et le CSE.

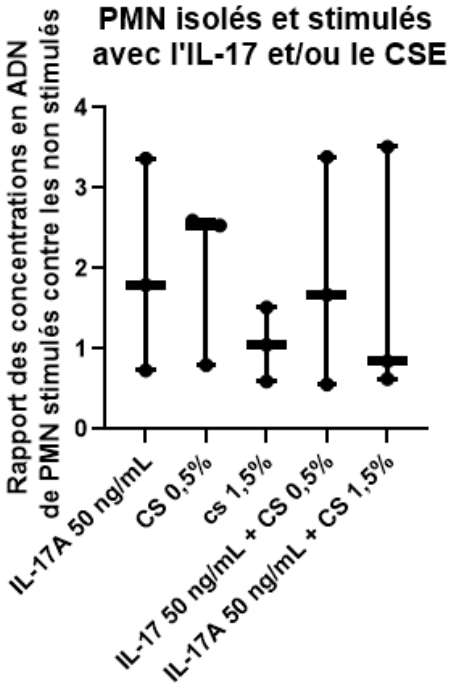

Figure 26 : graphique représentant le rapport de la concentration de l'ADN issus des PMNs stimulés avec le CSE (0,5 et 1,5%) combiné ou non avec l'IL-17A (50ng/mL) avec la concentration d'ADN libéré par les PMN non stimulés. (n=3)

- **Induction de la NETose des PMNs par l'IL-17 après priming par le TNF-α**

L'étude du priming avant la stimulation des PMNs par l'IL-17 a été entreprise dans cette étude afin de mimer les conditions inflammatoires, et créer des conditions beaucoup plus propices à l'activation des PMNs. Nous avons choisi le TNF-α, connu pour sa capacité à moduler l'effet de plusieurs médiateurs ainsi que l'expression de leurs récepteurs. Nos résultats (Fig. 19) montrent que le priming avec le TNF-α (20 ng/mL) peut induire la NETose des PMNs comparé aux PMNs incubés dans le milieu de culture seul (NS) ($P<0,005$, n=14). De même le priming avec le TNF-α (20 ng/mL) et la stimulation avec l'IL-17 (10 à 100 ng/mL) induit d'une façon significative la NETose des PMNs comparé aux PMNs préstimulés avec le TNF-α (20 ng/mL) et incubés dans le milieu de culture seul ($P<0,005$, n=14). Ces résultats suggèrent que c'est le TNF-α qui est responsable de cette augmentation de la NETose des PMNs.

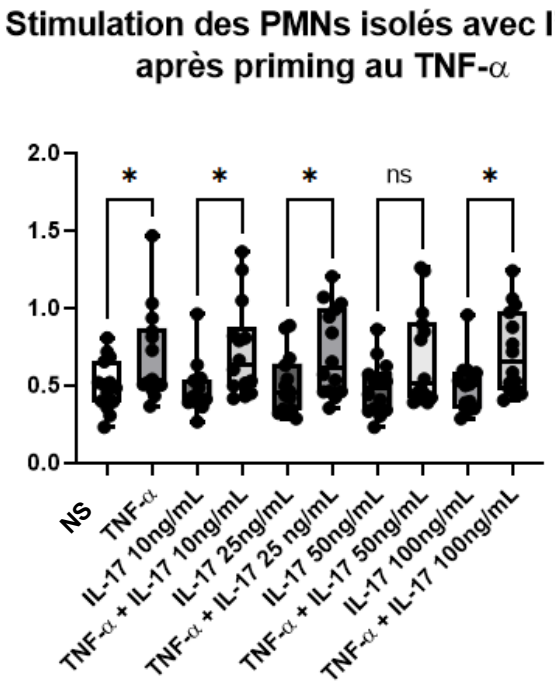

Figure 27 : graphique illustrant la Quantification de l'ADN relargué dans le surnageant suite au traitement des NETs avec la Mnase sur les PN isolés, primé ou non avec du TNF-□ (20ng/mL) pendant 1 heure et stimulés durant 3 heures avec de l'IL-17A recombinante à différentes concentrations (NS : non stimulés).

- **Induction de la NETose des PMNs par la protéine G d'attachement du VRS**

Les neutrophiles et leurs médiateurs sont souvent présents dans les voies aériennes des patients infectés par le VRS et qui ont développé une importante maladie respiratoire. Les NETs sont formés par la libération des contenus nucléaires et granulaires des PMNs dans l'espace extracellulaire en réponse à différents stimuli. Des études récentes ont proposé un rôle important des infections virales dans le relarguage des NETs. Ainsi, les particules du VRS et la protéine de fusion du VRS (VRS-F) sont capables d'induire la formation de NETs par les PMNs humains. Bien que la protéine G du VRS soit sécrétée (sG) par les cellules épithéliales bronchiques infectées par le VRS et participe à l'inflammation et son amplification au niveau pulmonaire, le rôle de cette protéine virale dans l'induction des NETs n'a pas été étudié.

Pour étudier l'effet de la sG sur l'induction de la NETose, les PMNs isolés ont été incubés avec des concentrations croissantes de sG puis visualisés à l'aide d'un microscope à fluorescence (Fig. 23). Nos résultats montrent que, par rapport aux cellules stimulées par le milieu seul ou par la sG à 0,1 µg/mL (Fig. 23A), la stimulation par la sG à 1 µg/mL (Fig. 23B) et à 5 µg/mL (Fig. 23B, C) induit la NETose des PMNs.

De même la stimulation des PMNs directement par le CSE à 0,5% induit la NETose des PMNs qui semble plus importante lorsque les cellules sont stimulées simultanément avec la CSE et la sG (Fig. 23E, F).

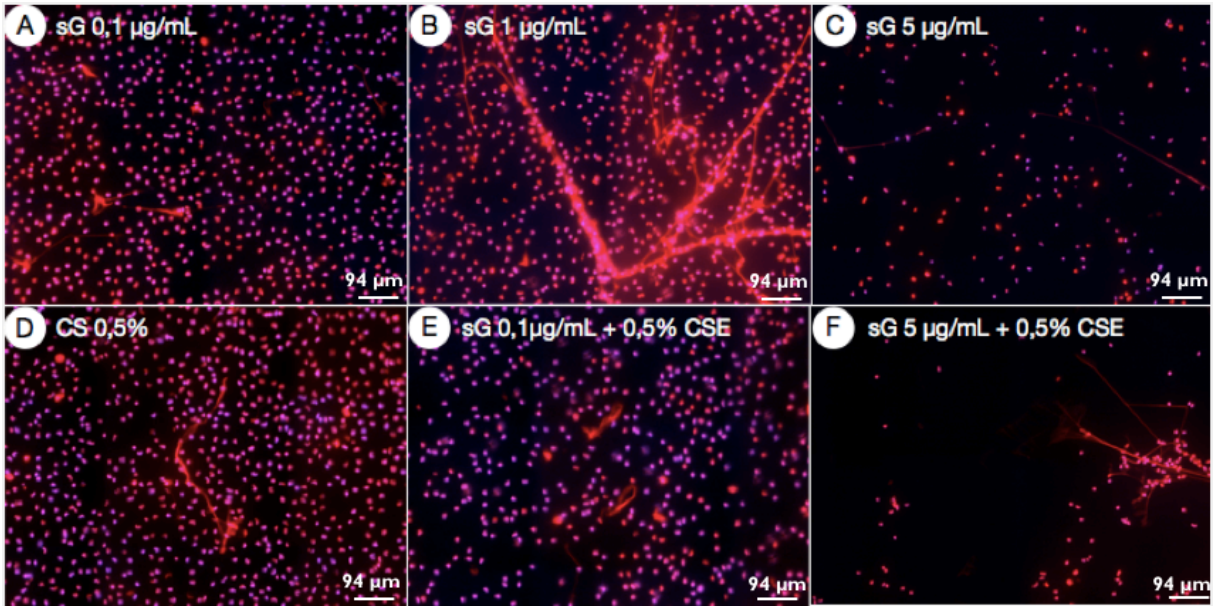

Figure 28 : Image des PN isolés et stimulés avec différentes concentrations de Protéine G recombinante du VRS puis colorés avec du DAPI (bleu) et du sytox (rouge) afin de révèler la présence des NETs. Ces images ont été réalisés sous microscope inversé AxioObserver Z1: Zeiss avec la camera Cool Snap HQ2: Roper Scientific sous objectif x20.

Bien que les résultats du dosage de l'ADN relargué par les cellules donnent des résultats concordants avec ceux observés par microscopie sur certains donneurs, la quantification des NETs par mesure de la concentration d'ADN présente dans les surnageants des PMNs (stimulés par la sG) suite à la digestion de l'ADN par la MNase ne donne pas de différence significative comparée au PMNs incubés dans le milieu de culture seul pendant 3h et ce pour l'ensemble des donneurs testés (figure 24). Il semble que l'induction de la NETose dépend des PMNs de chaque donneur. Il reste à déterminer le ou les facteurs qui prédisposent les PMNs pour de tel phénomène.

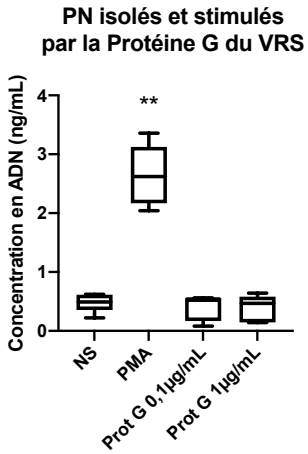

Figure 29 : Quantification de l'ADN relargué dans le surnageant suite au traitement des NETs avec la Mnase sur les PN isolés et stimulés durant 4 heures avec la protéine G recombinante du VRS a différente concentration (n=5).

- **Induction de la NETose des PMNs stimulés par le CSE, la sG et/ou l'IL-17A**

Après l'induction de la NETose, les neutrophiles subissent une série de modifications morphologiques. La plus importante est la décondensation progressive de la chromatine et l'augmentation de l'espace cellulaire occupé par l'ADN par rapport à d'autres processus de mort cellulaire tels que l'apoptose, la nécrose ou la pyroptose, dans lesquels la chromatine n'est pas modifiée ou se condense[474].

Les changements morphologiques des PMNs ont été visualisés grâce à un microscope à fluorescence après le marquage des NETs avec des anticorps dirigés contre la NE et la MPO et la coloration de l'ADN avec le DAPI. L'effet de l'IL-17 seule, ou combinée avec la sG ou avec le CSE, sur l'induction de la NETose a été étudié. Les PMNs isolés ont été incubés avec l'IL-17A (25 ng/mL) (Fig. 25A), la sG (1 µg/mL) (Fig. 25B) ou les deux à la fois (Fig. 25C). Nos résultats montrent que les PMNs non stimulés conservent un noyau à plusieurs lobes, mais qu'après stimulation avec l'IL-17A, la sG et/ou le CSE les PMNs deviennent rapidement adhérents et plus tard leurs noyaux commencent à se décondenser et perdent leurs plus lobes (Fig. 25 A-D).

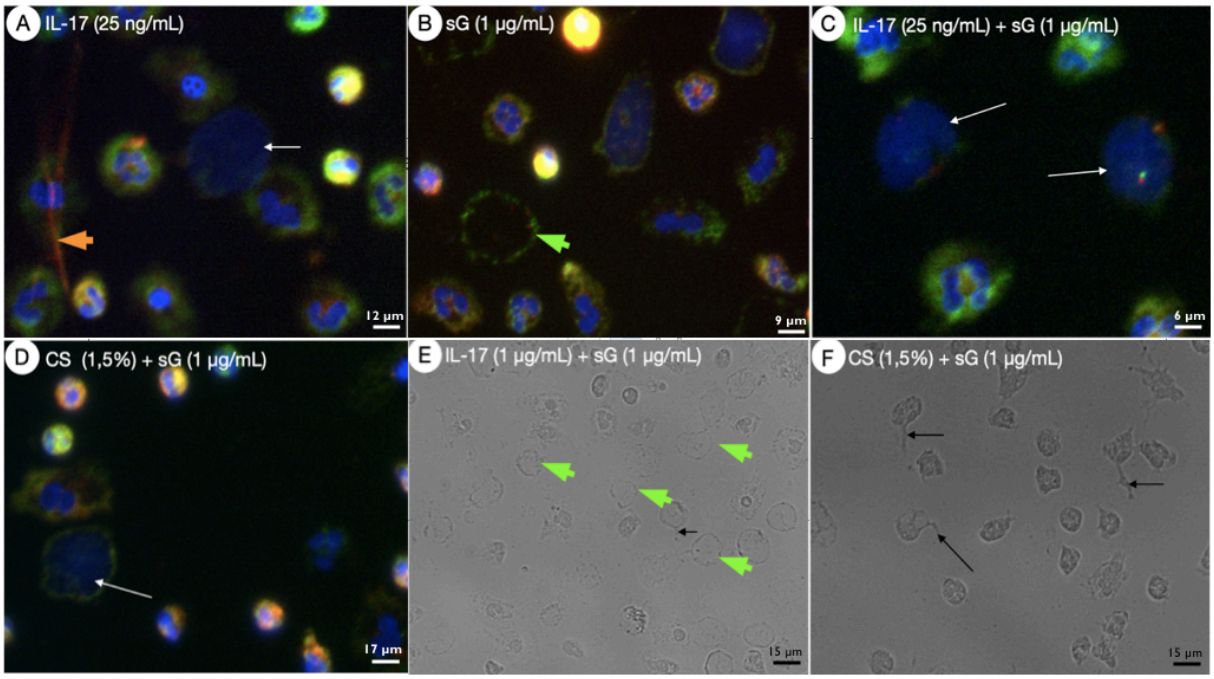

Figure 30 : Image de microscopie à fluorescence des PMN stimulés avec la sG en combinaison avec le CSE ou l'IL-17A. Ici les PMN sont incubés avec des anticorps dirigés contre la NE couplés à l'Alexa-fluor 647 (coloré en rouge), des anticorps dirigés contre la MPO couplés au FITC (coloré en vert) et le DAPI (colorant les noyaux et l'ADN, coloré en bleu)

Dans la phase finale de la NETose, la cellule relargue son ADN et est entièrement remplie d'une masse homogène de cytoplasme et de caryoplasmes entrmêlés (Fig. 25 E-F). Les mêmes résultats sont obtenus avec les cellules stimulées conjointement avec l'IL-17A et le CSE (Fig. 25C, E) ou la sG et le CSE (Fig. 25D, F).

DISCUSSION et PERSPECTIVES

En un siècle, le PMN est passé du statut du phagocyte mal caractérisé à celui de cellule à part entière dans la réponse immunitaire innée et inflammatoire. Par sa localisation à dominante tissulaire, le PMN exerce une dualité fonctionnelle en participant à la réaction inflammatoire ainsi qu'à la défense de l'organisme contre différents éléments pathogènes. Une fois qu'il atteigne le site de la lésion tissulaire, l'engagement des récepteurs de surface du PMN avec des signaux pro-inflammatoires, tels que des composants microbiens ou des cytokines, induit une cascade de signalisation résultant en une amplification des fonctions effectrices des neutrophiles (c'est-à-dire une activation)[475].

Le PMN activé peut ainsi neutraliser les envahisseurs en libérant le contenu de ses granules après la dégranulation, en internalisant et en dégradant les pathogènes par phagocytose, ou en libérant des NETs. Les NETs sont des structures extracellulaires, issus de la chromatine nucléaire dont le rôle est très ambigu, bénéfique lors de la défense contre les pathogènes et néfaste pour l'hôte suite à une inflammation chronique. La NETose requiert une activation des neutrophiles. Les ligands des récepteurs couplés aux protéines G, le TNF et les récepteurs Fc ont été signalés comme de véritables inducteurs de la NETose, ce qui suggère que ces récepteurs pourraient être impliqués dans le déclenchement de la NETose. Des études ont également montré que l'adressage des PMNs vers les tissus est régi par des cytokines qui peuvent induire l'activation cellulaire et le relargage des NETs. Ainsi, dans un modèle animal de cancer de pancréas, il a été démontré récemment que l'IL17 recrute des PMN, entraîne le déclenchement des NETs et exclut les cellules T CD8+ cytotoxiques de la tumeur cela via la sécrétion d'IL-8[476]. Bien que des taux élevés d'IL-17 et de PMNs aient été trouvés chez des patients atteints de BPCO, la capacité de l'IL-17 à induire directement la formation des NETs n'a pas été totalement élucidée.

Les résultats présentés dans ce mémoire ont abouti :
- à la démonstration de l'existence de récepteur pour le IL-17A au niveau des PMNs.
- à la démonstration d'un effet directe de l'IL-17 sur l'induction de la NETose des PMNs.
- à la démonstration de l'induction de la NETose des PMN par la sG du VRS.

Nos travaux ont tout d'abord contribué à la mise en évidence de l'IL-17RA à la surface des PMNs isolées à partir du sang périphérique. De plus, nous avons mis en évidence l'expression de l'ARNm de l'IL-17RA et l'IL-17RC par les PMNs. Ces résultats sont en accord avec ceux de plusieurs groupes ayant démontré, grâce à des expériences de cytométrie en flux, que les PMNs de donneurs sains, soit fraîchement isolés, soit incubés pendant 3 h en

l'absence, ou en présence de IFNγ plus LPS, ne présentent que l'IL-17RA au niveau de leur surface, mais pas l'IL-17RC[238,477]

Ces résultats suggèrent que grâce à l'IL-17RA, l'IL-17A pourrait jouer un double rôle dans la régulation de l'inflammation ; un premier rôle dans l'initiation et l'amplification de la réponse immunitaire primaire locale en stimulant les cellules structurelles à libérer des chimiokines (sécrétion de l'IL-8 par les cellules épithéliales) et des facteurs de croissance myéloïdes, et un second rôle dans la modulation directe des mécanismes effecteurs des PMNs. Plusieurs études sur l'IL-17RA ont fourni un modèle pour comprendre le rôle de l'IL-17RC dans la signalisation médiée par les IL-17A et IL-17F. En effet, les études de transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET) de l'IL-17RA ont indiqué que des multimères de l'IL-17RA existent à la surface des cellules en l'absence de ligand. Cependant, après liaison de l'IL-17A ou de l'IL-17F, un changement de conformation rapide se produit, entraînant une perte du signal FRET[478,479]. Cette observation est due à une dissociation complète des sous-unités IL-17RA les unes des autres, et évoque la possibilité que cette perte du signal FRET (dépendante du ligand) entre les sous-unités IL-17RA résulte de l'oligomérisation avec l'IL-17RC. Cela est soutenu par des travaux récents qui ont montré une co-immunoprécipitation de l'IL-17RA et de l'IL-17RC[480]. Nos résultats, démontrant l'expression de l'ARNm de l'IL-17RC au niveau des PMNs, suggèrent qu'il est possible que la liaison de l'IL-17A à l'IL-17RA induit l'expression de l'IL-17RC au niveau de la surface cellulaire pour faciliter la stimulation optimale des PMN. Des expériences de coimmunoprécipitation de l'IL-17RA et de l'IL-17RC sont nécessaires pour valider cette hypothèse et démontrer la présence de la chaine IL-17RC au niveau de l'extrait protéique totale des PMNs utilisés.

Bien que l'IL-17RC puisse agir principalement par sa fonction en tant que partie intégrante du complexe de signalisation de l'IL-17R, les données émergentes indiquent que l'IL-17RC peut jouer également un rôle plus large et plus nuancé. Toutefois, il faut souligner que les résultats obtenus *in vitro* ne reflètent pas ce qu'il se passe réellement *in vivo*. En effet, nos résultats de cytométrie en flux sur le sang total démontrent que les PMNs expriment tous les récepteurs de la famille de l'IL-17R sauf l'IL-17RE. Les PMNs de sang périphérique peuvent donc interagir avec différentes IL-17, notamment l'IL-17A qui semble avoir une activité chimiotactique directe sur les PMN ainsi que l'induction des NETs par les PMNs de patients ayant la polyarthrite rhumatoïde[460]. Nos données suggèrent que la technique de purification pourrait apporter une activation non-spécifique des PMNs et une modulation de l'expression de ces récepteurs.

La NETose, est un phénomène bien décrit dans la littérature. La libération de NETs débute par l'activation des récepteurs de surface, suivie de changements dans la concentration

intracellulaire de calcium, de l'activation des cascades de signalisation des kinases et de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Ces premiers événements de signalisation se traduisent par des changements morphologiques, en particulier une augmentation de la taille cellulaire et des modifications de leur forme. En effet, après assemblage intracellulaire, les NETs sont libérés par perforation de la membrane plasmique et lyse cellulaire. Ce processus a lieu quelques heures après un stimulation, et une fois libérées, les NETs peuvent piéger, immobiliser et tuer les bactéries, les champignons et les virus. L'utilisation d'inhibiteurs de petite taille montre que la NE est impliquée dans la NETose par hydrolyse de l'histone H4 conduisant à la décondensation de la chromatine[394]. Nos résultats démontrent que la stimulation par l'IL-17A et/ou le CSE des PMNs induit le relargage des NETs. En plus des filaments d'ADN, on a pu détecter des protéines granulaires du PMN, la NE et la MPO décorant l'ADN décondensé. Cependant, le rôle de ces protéines dans la NETose reste ambigu. De études récentes ont rapporté que la NE libérée par les PMNs au cours de NETose est liée sous une forme inactive aux NETs. D'autres études ont montré que l'utilisation d'inhibiteurs hautement efficaces et sélectifs des sérines protéases du neutrophile NSP dans les expériences d'induction des NEToses, n'a eu aucun effet sur les NEToses induites par un quelconque stimulus (LPS, PMA, E. *coli*, C. *albicans*). Il faut souligner également que les souris déficientes en NE peuvent former des NETs. L'ensemble de ces études sont en contradiction avec une étude précédente impliquant la NE dans la génération de NET[394]. Quoi qu'il en soit, le rôle des NETs libérés par les PMNs suite à la stimulation par l'IL-17A et/ou la fumée de cigarette peut contribuer dans le cas de la BPCO et de l'asthme à un encombrement des bronches. L'IL-17A pourrait avoir également un rôle indirect sur la NETose en stimulant la sécrétion de l'IL-8 par les cellules épithéliales bronchiques. Cette chimiokine a été décrite récemment comme étant un bon inducteur de la NETose.

Durant ce travail de thèse, un autre groupe s'intéressant à la NETose des PMNs dans le cas de lésions hépatiques d'ischémie/reperfusion (I/R) a démontré récemment dans des expériences *in vitro*, que l'IL-17A était un puissant promoteur de la formation de NETs des PMNs murins[482]. Nos résultats joints à ceux d'autres groupes suggèrent que la relation entre l'IL-17A, les PMNs, et les NETs est une forme de « communication en retour » qui conduit à un cercle vicieux qui peut être à l'origine de lésions tissulaires causées par l'inflammation. L'inhibition des NETs ou de l'IL-17A peut rompre ce cercle vicieux et empêcher les lésions tissulaires induites par les PMN/NETs.

La NETose requiert une activation des PMNs. Par conséquent, les PMNs au repos dans des conditions non-inflammatoires ne sont pas sujets à la NETose. Comme mentionnés auparavant, le TNF-a et les récepteurs Fc ont été signalés comme de véritables inducteurs de la NETose. Étant donné que l'expression de l'IL-17A et du TNF-(sont augmentées au niveau des voies respiratoires des patients BPCO et son exacerbation viro-induite, nous avons décidé d'effectuer un priming des PMNs par le TNF-a et afin d'induire la NETose par L'IL-17A. Le priming au TNF-a suivie par une stimulation à l'IL-17A, augmente le nombre de NETs par rapport au PMN sans priming (résultats d'IF). Il faut souligner également que le priming des PMNs au TNF-a entraine aussi une augmentation de la NETose comparée aux PMNs sans priming. Cette augmentation de la NETose semble être due principalement au TNF-a (résultats de dosage). Bien que les résultats d'immunofluorescence donnent des résultats intéressants, aucune différence significative n'a été observée entre la quantité d'ADN extracellulaire sécrétée par les PMNs stimulés par l'IL-17 ou le CSE et celle par les PMNs non stimulés. Le dosage de l'ADN par le kit Quant-it dsDNA s'est avéré délicat et les résultats décevants. Nous suspectons que l'ADN restait collé au support et le traitement par la Mnase pour décrocher l'ADN n'était pas suffisant pour obtenir la totalité de l'ADN extracellulaire. Cette méthode de quantification reste alors à être d'avantage développée afin de garantir un résultat reproductible. De plus, cette méthode ne permet pas de discriminer l'ADN obtenu à partir de NET ou l'ADN issus de cellule en nécrose. Nous avons effectué également une méthode de quantification permettant de quantifier l'activité de la NE issus des NETs par un kit appelé NETosis Assay kit, cependant les résultats n'étaient pas satisfaisants, les contrôles de manipulation n'ont pas été validés, de ce fait les résultats n'étaient pas exploitables.

La fumée de cigarette en plus d'être un inducteur de la NETose, pourrait également moduler l'expression de certaines protéines nécessaires à ce processus. De même les PMNs issus de patients BPCO pourraient être plus susceptibles aux inducteurs de la NETose, et notamment à l'IL-17A. Des études menées récemment sur la E-cigarette, révèlent que les PMNs pré-stimulés avec du milieu conditionné par la E-cigarette ont une NETose augmentée après stimulation par la PMA comparés aux PMN non stimulés, révélant ainsi un potentiel de conditionnement des PMNs par la fumée de E-cigarette[483]. Parmi les donneurs de l'EFS étudiés au cours de notre étude, nous n'avons collecté que très peu de fumeurs, ce qui ne nous a pas permis d'en avoir un nombre suffisant pour étudier le pré-conditionnement potentiel par la fumée de cigarette des PMNs circulants. Il est possible que de façon similaire à la E-

cigarette, les PMNs issus de fumeur ont une susceptibilité augmentée à la NETose comparés aux PMNs de sujet non-fumeur.

Les études de la polyarthrite rhumatoïdes soutiennent le concept selon lequel tous les NETs ne sont pas similaires, car leur teneur en protéines varie en fonction de la source de stimulation et de l'état du PMN qui dans un contexte pathologique peut devenir plus susceptible à entrer en NETose. Cela souligne la nécessité de mieux comprendre comment la composition des NETs est régulée chez un individu sain et dans le cas de pathologie, pour développer des molécules thérapeutiques pour cibler sélectivement certains des aspects délétères déclenchés par les NETs. En effet, il sera important d'explorer davantage la pertinence de l'expression différentielle des protéines dans les NETs déclenchés par des auto-anticorps, des cytokines, et d'autres conditions «stériles». Des travaux récents ont révélé une différence de la composition protéique des NETs mais également des modifications post-traductionnelles propres à certaines conditions de stimulation[484]. Les études menées sur les PMNs isolés ne font pas état de leur phénotype après isolation, il est probable que les PMNs en condition pathologique présentent des expressions différentes des récepteurs aux cytokines pro-inflammatoires et un état d'activation très avancé. Ce pré-conditionnement des PMNs issus de la circulation sanguine peut au moment du recrutement au site inflammatoire participer à une réponse accrue et non contrôlée des PMNs. Cette réponse disproportionnée peut de ce fait participer à l'entretien de l'inflammation et participer à la chronicité de la maladie.

La bronchiolite due au VRS déclenche une forte réponse immunitaire innée caractérisée par une infiltration excessive de PMN qui contribue à la physiopathologie de la maladie. L'IL-17A favorise l'infiltration des PMNs dans les poumons infectés par le virus. Toutefois, l'IL-17A est mieux connue comme un effecteur des réponses immunitaires adaptatives. Le rôle de l'IL-17A dans la modulation immunitaire précoce dans l'infection par le VRS est a été récemment élucidé. Il a été démontré que la production locale et précoce de l'IL-17A dans les voies respiratoires lors d'une bronchiolite à VRS facilite le recrutement de PMN et est suivie de conséquences pathologiques dramatiques au niveau des poumons du nourrisson. En plus de son implication dans la bronchiolite, le VRS est aussi responsable de l'exacerbation de l'asthme et de la BPCO. Les particules de VRS et la protéine F de fusion du VRS sont toutes deux capables d'induire la formation de NETs par les PMNs humains [472]. En plus de la protéine F de fusion, le VRS possède une protéine d'attachement sG qui peut être sécrétée par les cellules infectées par le VRS. Nos résultats récents démontrent que la sG peut se lier au récepteur CCR3 des éosinophiles et des lymphocytes Th2 et exercer un chimiotactisme sur

ces cellules (manuscrit en cours de publication dans iScience). Ainsi, le chimiotactisme des lymphocytes Th2 plutôt que des lymphocytes Th1 au niveau du site infectieux peut être considéré comme un mécanisme d'échappement à une réponse immunitaire délétère pour le virus. S'il n'y a pas de données à l'heure actuelle concernant l'expression de CCR3 par les PMNs, des travaux récents ont montré que le CX3CR1, un autre récepteur de la sG, est exprimé par les PMNs humains[274]. Nos résultats montrent que la sG induit la libération des NETs par les PMNs. L'interaction de la sG avec le PMN peut avoir lieu grâce au récepteur CX3CR1 et la libération des NETs par la sG viendra s'ajouter à celles induites par le VRS et sa protéine F. Ces NETs peuvent piéger le VRS et atténuer l'inflammation voire l'exacerbation des maladies respiratoires ou au contraire augmenter la sécrétion de l'IL-17 par les PMNs. Cette sécrétion d'IL-17 contribuerait ainsi à la sécrétion des NETs, l'amplification de l'inflammation et l'altération des fonctions pulmonaires. Il a été récemment montré que le virus de la grippe A induisait la formation de NETs, enchevêtrées avec les alvéoles dans les zones de lésions tissulaires, leur attribuant un rôle potentiel dans les lésions pulmonaires. Ainsi dans le cadre des exacerbations d'origine virale, les NETs pourraient participer à la progression de la maladie en participant à la destruction des alvéoles[467]. Sachant que des concentrations en IL-17 sont également élevées lors des exacerbations de la BPCO, l'IL-17A et la protéine sG du VRS peuvent agir de concert pour induire la NETose et participer à la physiopathologie des exacerbations qui contribuent davantage à la progression de la maladie en dégradant le parenchyme pulmonaire.

L'extension de ce travail de thèse sera :

1. D'étendre l'étude aux patients BPCO afin d'observer si l'expression des récepteurs de l'IL-17 est augmentée à la surface des PMNs et si cela est différent en fonction du stade de la maladie ou/et dans les conditions d'exacerbation

2. D'étudier au niveau des PMNs issus de patient BPCO les différences d'expression protéique des composants des NETs et une potentielle prédisposition à la NETose notamment induite par l'IL-17A.

3. Étudier l'hétérogénéité des populations de PMNs des patients BPCO notamment en explorant la proportion des PMNs de faible densité.

4. D'inclure les peptides d'élastine dans la stimulation des PMNs issus de la BPCO puisque les travaux réalisés précédemment au laboratoire ont montré une modulation de certaines fonctions de ces derniers, il serait intéressant d'en étudier l'impact sur la NETose

5. D'étudier dans le cadre d'un modèle murin d'emphysème induit par le peptide d'élastine l'influence de l'IL-17A sur la NETose des PMNs in vivo et également l'expression des récepteurs à la surface de ces PMNs

CONCLUSION

La BPCO est une maladie avec une physiopathologie complexe dont plusieurs acteurs ont été identifiés. Cependant, il subsiste plusieurs zones d'ombre concernant la compréhension des mécanismes qui conduisent à la dérégulation du système immunitaire et à l'inflammation chronique. Parmi les acteurs majeurs, sont retrouvés les PMNs qui au sein de la BPCO vont contribuer à l'entretien de l'inflammation, la dégradation du parenchyme pulmonaire et l'encombrement pulmonaire. Lorsqu'ils entrent en NETose, ils libèrent une grande quantité de protéase et de médiateurs inflammatoires contribuant à la maladie. Parmi les médiateurs inflammatoires retrouvés, l'IL-17 est retrouvée à des taux augmentés à la fois au sein des expectorations et de la circulation sanguine. Cette cytokine pro-inflammatoire a un rôle important dans le recrutement de cellule inflammatoire et l'entretien de l'inflammation. Ces phénomènes sont exacerbés lors d'infection par le VRS, où des phénomènes tels que le recrutement cellulaire, le nombre de NETs, les cytokines pro-inflammatoires et la destruction du tissu pulmonaire sont augmentés. Parmi les médiateurs de la NETose sont retrouvés des cytokines, des protéines d'origine bactérienne ou virale, mais au sein de la BPCO, bien que l'IL-17A et la protéine G soient retrouvées en grande quantité, leur effet inducteur sur la NETose n'ont pas été explorés.

Pour se placer dans le contexte de la BPCO, nous avons combiné l'IL-17A ou la sG à la fumée de cigarette ou au TNF-a afin de mimer le contexte pathologique. Nous avons exploré les récepteurs à l'IL-17 présent à la surface des PMNs en sang total ou après différentes techniques d'isolation de ces derniers. Nous avons mis en place des expériences d'imagerie et de quantification de la NETose afin d'étudier le potentiel inducteur de l'IL-17A et de la protéine G.

Les résultats obtenus nous permettent de conclure que les PMNs sont des cellules difficiles à étudier, nous avons constaté que leur phénotype au niveau de l'expression des récepteurs à l'IL-17 était différent après leur isolation. Après isolation, seul le récepteur IL-17RA est retrouvé à la surface des PMNs tandis qu'on observe que l'ARNm correspondant à l'IL-17RC est retrouvé dans l'ARN purifié à partir de PMNs isolés. Nous avons également constaté que l'IL-17A, ainsi que la protéine sG induisent la NETose des PMNs grâce aux résultats d'imagerie. Cependant, ces observations n'ont pas pu être appuyées par les techniques de quantifications de la NETose mise en place au laboratoire. La combinaison de l'IL-17A et la protéine sG semblent également induire d'avantage la NETose des PMNs comparés aux inducteurs utilisés seuls.

Les résultats obtenus sur l'IL-17A confirment son effet inducteur de la NETose comme cela a été étudié dans d'autres pathologies telles que le lupus[440]. Le fait qu'il y ait uniquement la sous unité IL-17RA à la surface des PMNs a également été observé dans une autre étude qui révèle que l'IL-17 à un effet modulateur sur l'apoptose des suites de la stimulation par le GM-CSF. L'absence de la sous-unité IL-17RC au sein de cette étude n'empêche pas à l'IL-17 d'agir sur les PMNs[240]. Ce que nous avons également constaté. La présence de l'ARNm codant pour l'IL-17RC dans les extraits d'ARN totaux est un indicateur qu'il peut être potentiellement traduit en protéine des suites d'une pré-stimulation ou de la stimulation par l'IL-17A.

Le VRS induit la NETose des PMNs. Des études ont été menées pour comprendre d'avantage le mécanisme d'induction de NETs par le VRS. Cette étude a incriminé la protéine de fusion F comme induisant la NETose. Nous avons contribué à la compréhension de ce mécanisme en explorant le potentiel inducteur de la sG. Nos résultats ont permis d'incriminer la sG dans l'induction de la NETose. La protéine G est une protéine essentielle pour l'infection du VRS, contribue à l'inflammation et pour la première fois, nous avons pu observer qu'elle contribuait également à l'induction de la NETose. Dans le contexte de la BPCO, on a pu observer que la cytokine pro-inflammatoire IL-17A et la protéine sG, contribuent à la physiopathologie de la maladie en induisant la NETose des PMNs au cours de l'exacerbation. Cela pourrait permettre de comprendre d'avantage la physiopathologie des exacerbations par le VRS et potentiellement de développer des thérapies inhibant la NETose, mécanisme contribuant à l'obstruction pulmonaire et à la dégradation du parenchyme pulmonaire.

Ces résultats sont encourageants et aspirent à être confortés avec l'aide de méthodes quantitatives de la NETose. Les méthodes entreprissent au laboratoire n'ont pas été concluantes et doivent être développées. Pour se rapprocher d'avantage du contexte de l'étude, c'est-à-dire de la BPCO, des PMNs issus de patient COPD auraient permis potentiellement d'étudier une potentielle prédisposition à la NETose induite par l'IL-17A sur ces cellules.

REFERENCES

1. Vogelmeier, C. F. *et al.* Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease 2017 Report. GOLD Executive Summary. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **195**, 557–582 (2017).
2. Mathers, C. D. & Loncar, D. Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030. *PLOS Med.* **3**, e442 (2006).
3. Burney, P., Patel, J., Newson, R., Minelli, C. & Naghavi, M. Global and Regional Trends in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Mortality 1990-2010. *Eur. Respir. J.* **45**, 1239–1247 (2015).
4. Zhou-Suckow, Z., Duerr, J., Hagner, M., Agrawal, R. & Mall, M. A. Airway mucus, inflammation and remodeling: emerging links in the pathogenesis of chronic lung diseases. *Cell Tissue Res.* **367**, 537–550 (2017).
5. Kuwano, K. *et al.* Small airways dimensions in asthma and in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. Rev. Respir. Dis.* **148**, 1220–1225 (1993).
6. Bagdonas, E., Raudoniute, J., Bruzauskaite, I. & Aldonyte, R. Novel aspects of pathogenesis and regeneration mechanisms in COPD. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* **10**, 995–1013 (2015).
7. C, F. & Mc, D. [Epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease in France]. *Revue des maladies respiratoires* vol. **27** (2010).
8. R, de M. *et al.* An international survey of chronic obstructive pulmonary disease in young adults according to GOLD stages. *Thorax* vol. **59** (2004).
9. Jm, H. & R, T. Alpha 1 anti-trypsin: one protein, many functions. *Current molecular medicine* vol. **12** (2012).
10. Reséndiz-Hernández, J. M. *et al.* TNF promoter polymorphisms are associated with genetic susceptibility in COPD secondary to tobacco smoking and biomass burning. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* **13**, 627 (2018).
11. Jx, L. *et al.* A functional SNP upstream of the ADRB2 gene is associated with COPD. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease* vol. 13 (2018).
12. Sr, L. *et al.* Association between the length of the MUC8-minisatellite 5 region and susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Genes & genomics* vol. 40 (2018).
13. O, S. & Cs, U. Early life insults as determinants of chronic obstructive pulmonary disease in adult life. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease* vol. 13 (2018).
14. Jr, B. & Nj, S. Some chronic obstructive pulmonary disease will originate in neonatal intensive care units. *Paediatric respiratory reviews* vol. 6 https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15698812/ (2005).
15. Mannino, D. M. & Buist, A. S. Global burden of COPD: risk factors, prevalence, and future trends. *Lancet Lond. Engl.* **370**, 765–773 (2007).
16. Rodgman, A., Smith, C. J. & Perfetti, T. A. The composition of cigarette smoke: a retrospective, with emphasis on polycyclic components. *Hum. Exp. Toxicol.* **19**, 573–595 (2000).
17. Opitz, B., van Laak, V., Eitel, J. & Suttorp, N. Innate immune recognition in infectious and noninfectious diseases of the lung. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **181**, 1294–1309 (2010).
18. D, B., H, M. & A, G. Maternal smoking promotes chronic obstructive lung disease in the offspring as adults. *European journal of medical research* vol. 14 Suppl 4 https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20156720/ (2009).
19. C, S. *et al.* Parental smoking in childhood and adult obstructive lung disease: results from the European Community Respiratory Health Survey. *Thorax* vol. 59 (2004).
20. A, L., P, L., H, S., P, F. & J, V. Developing COPD: a 25 year follow up study of the general population. *Thorax* vol. 61 (2006).
21. B, L. *et al.* Epidemiological aspects and early detection of chronic obstructive airway

diseases in the elderly. *The European respiratory journal. Supplement* vol. 40 (2003).
22. Stanaway, J. D. *et al.* Global, regional, and national comparative risk assessment of 84 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet* **392**, 1923–1994 (2018).
23. GBD Compare | IHME Viz Hub. http://vizhub.healthdata.org/gbd-compare.
24. Mortaz, E. *et al.* Cigarette smoke induces the release of CXCL-8 from human bronchial epithelial cells via TLRs and induction of the inflammasome. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* **1812**, 1104–1110 (2011).
25. Gao, W. *et al.* Bronchial epithelial cells: The key effector cells in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease? *Respirol. Carlton Vic* **20**, 722–729 (2015).
26. Yamasaki, K. & van Eeden, S. F. Lung Macrophage Phenotypes and Functional Responses: Role in the Pathogenesis of COPD. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
27. Fischer, B. M., Pavlisko, E. & Voynow, J. A. Pathogenic triad in COPD: oxidative stress, protease–antiprotease imbalance, and inflammation. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* **6**, 413–421 (2011).
28. Niewoehner, D. E., Kleinerman, J. & Rice, D. B. Pathologic Changes in the Peripheral Airways of Young Cigarette Smokers. (2010).
29. Tam, A., Wadsworth, S., Dorscheid, D., Man, S. F. P. & Sin, D. D. The airway epithelium: more than just a structural barrier. *Ther. Adv. Respir. Dis.* **5**, 255–273 (2011).
30. L, P. *et al.* Bronchial airway epithelial cell damage following exposure to cigarette smoke includes disassembly of tight junction components mediated by the extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway. *Chest* vol. 135 (2009).
31. Shaykhiev, R. *et al.* EGF shifts human airway basal cell fate toward a smoking-associated airway epithelial phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 12102–12107 (2013).
32. R, S. & Rg, C. Early events in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. Smoking-induced reprogramming of airway epithelial basal progenitor cells. *Annals of the American Thoracic Society* vol. 11 Suppl 5 (2014).
33. Araya, J. *et al.* Squamous metaplasia amplifies pathologic epithelial-mesenchymal interactions in COPD patients. *J. Clin. Invest.* **117**, 3551–3562 (2007).
34. Barnes, P. J. Alveolar macrophages as orchestrators of COPD. *COPD* **1**, 59–70 (2004).
35. Uddin, M., Watz, H., Malmgren, A. & Pedersen, F. NETopathic Inflammation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Severe Asthma. *Front. Immunol.* **10**, 47 (2019).
36. Jeffery, P. K. Comparison of the structural and inflammatory features of COPD and asthma. Giles F. Filley Lecture. *Chest* **117**, 251S–60S (2000).
37. Saetta, M. *et al.* CD8+ T-Lymphocytes in Peripheral Airways of Smokers with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **157**, 822–826 (1998).
38. Barnes, P. J. Small airway fibrosis in COPD. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **116**, 105598 (2019).
39. Kuhn, C. & Senior, R. M. The role of elastases in the development of emphysema. *Lung* **155**, 185–197 (1978).
40. Vidal, D. *et al.* Alterations in pulmonary structure by elastase administration in a model of emphysema in mice is associated with functional disturbances. *Rev. Port. Pneumol.* **18**, 128–136 (2012).
41. Betsuyaku, T. *et al.* Neutrophil Granule Proteins in Bronchoalveolar Lavage Fluid from Subjects with Subclinical Emphysema. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **159**, 1985–1991 (1999).
42. Sethi, S. Molecular diagnosis of respiratory tract infection in acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **52 Suppl 4**, S290-295 (2011).

43. Donaldson, G. C., Seemungal, T., Jeffries, D. J. & Wedzicha, J. A. Effect of temperature on lung function and symptoms in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur. Respir. J.* **13**, 844–849 (1999).
44. Greenberg, S. B., Allen, M., Wilson, J. & Atmar, R. L. Respiratory viral infections in adults with and without chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **162**, 167–173 (2000).
45. Schneider, D. *et al.* Increased cytokine response of rhinovirus-infected airway epithelial cells in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **182**, 332–340 (2010).
46. Retamales, I. *et al.* Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **164**, 469–473 (2001).
47. Higashimoto, Y. *et al.* Inflammatory mediator mRNA expression by adenovirus E1A-transfected bronchial epithelial cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **166**, 200–207 (2002).
48. Shukla, S. D. *et al.* The main rhinovirus respiratory tract adhesion site (ICAM-1) is upregulated in smokers and patients with chronic airflow limitation (CAL). *Respir. Res.* **18**, (2017).
49. Cameron, R. J. *et al.* Virus infection in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease requiring ventilation. *Intensive Care Med.* **32**, (2006).
50. Bassis, C. M. *et al.* Analysis of the Upper Respiratory Tract Microbiotas as the Source of the Lung and Gastric Microbiotas in Healthy Individuals. *mBio* **6**, (2015).
51. Wu, D. *et al.* Analysis of the bacterial community in chronic obstructive pulmonary disease sputum samples by denaturing gradient gel electrophoresis and real-time PCR. *BMC Pulm. Med.* **14**, (2014).
52. Belkaid, Y. & Hand, T. W. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell* **157**, 121–141 (2014).
53. Patel, I. S. *et al.* Relationship between bacterial colonisation and the frequency, character, and severity of COPD exacerbations. *Thorax* **57**, 759–764 (2002).
54. Sethi, S. *et al.* Airway bacterial concentrations and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **176**, 356–361 (2007).
55. Jacobs, D. M., Ochs-Balcom, H. M., Zhao, J., Murphy, T. F. & Sethi, S. Lower Airway Bacterial Colonization Patterns and Species-Specific Interactions in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *J. Clin. Microbiol.* **56**, (2018).
56. Anderson, H. R. *et al.* Health effects of an air pollution episode in London, December 1991. *Thorax* **50**, 1188–1193 (1995).
57. Yang, I. A., Clarke, M. S., Sim, E. H. A. & Fong, K. M. Inhaled corticosteroids for stable chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD002991 (2012).
58. Nannini, L. J., Poole, P., Milan, S. J. & Kesterton, A. Combined corticosteroid and long-acting beta(2)-agonist in one inhaler versus inhaled corticosteroids alone for chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD006826 (2013).
59. Lee, H., Lee, J., Hong, S.-H., Rahman, I. & Yang, S.-R. Inhibition of RAGE Attenuates Cigarette Smoke-Induced Lung Epithelial Cell Damage via RAGE-Mediated Nrf2/DAMP Signaling. *Front. Pharmacol.* **9**, (2018).
60. Repine, J. E., Bast, A. & Lankhorst, I. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. Oxidative Stress Study Group. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **156**, 341–357 (1997).
61. Barnes, P. J. Cellular and molecular mechanisms of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin. Chest Med.* **35**, 71–86 (2014).
62. Doran, A. C., Yurdagul, A. & Tabas, I. Efferocytosis in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **20**, 254–267 (2020).
63. Martinez, F. O. & Gordon, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime Rep.* **6**, 13 (2014).

64. Bazzan, E. *et al.* Dual polarization of human alveolar macrophages progressively increases with smoking and COPD severity. *Respir. Res.* **18**, 40 (2017).
65. Costabel, U. & Guzman, J. Effect of smoking on bronchoalveolar lavage constituents. *Eur. Respir. J.* **5**, 776–779 (1992).
66. Arora, S., Dev, K., Agarwal, B., Das, P. & Syed, M. A. Macrophages: Their role, activation and polarization in pulmonary diseases. *Immunobiology* **223**, 383–396 (2018).
67. Chana, K. K., Fenwick, P. S., Nicholson, A. G., Barnes, P. J. & Donnelly, L. E. Identification of a distinct glucocorticosteroid-insensitive pulmonary macrophage phenotype in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* **133**, 207-216.e1–11 (2014).
68. Eapen, M. S. *et al.* Abnormal M1/M2 macrophage phenotype profiles in the small airway wall and lumen in smokers and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Sci. Rep.* **7**, 13392 (2017).
69. Taylor, A. E. *et al.* Defective macrophage phagocytosis of bacteria in COPD. *Eur. Respir. J.* **35**, 1039–1047 (2010).
70. Hodge, S. *et al.* Smoking alters alveolar macrophage recognition and phagocytic ability: implications in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **37**, 748–755 (2007).
71. Hagimoto, N. *et al.* Induction of apoptosis and pulmonary fibrosis in mice in response to ligation of Fas antigen. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **17**, 272–278 (1997).
72. Capelli, A. *et al.* Increased MCP-1 and MIP-1beta in bronchoalveolar lavage fluid of chronic bronchitics. *Eur. Respir. J.* **14**, 160–165 (1999).
73. Keatings, V. M., Collins, P. D., Scott, D. M. & Barnes, P. J. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **153**, 530–534 (1996).
74. Mio, T. *et al.* Cigarette smoke induces interleukin-8 release from human bronchial epithelial cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **155**, 1770–1776 (1997).
75. Woolhouse, I. S., Bayley, D. L. & Stockley, R. A. 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* **57**, 709–714 (2002).
76. Paone, G. *et al.* Human neutrophil peptides sputum levels in symptomatic smokers and COPD patients. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **15**, 556–562 (2011).
77. Hodge, S., Hodge, G., Scicchitano, R., Reynolds, P. N. & Holmes, M. Alveolar macrophages from subjects with chronic obstructive pulmonary disease are deficient in their ability to phagocytose apoptotic airway epithelial cells. *Immunol. Cell Biol.* **81**, 289–296 (2003).
78. Richens, T. R. *et al.* Cigarette smoke impairs clearance of apoptotic cells through oxidant-dependent activation of RhoA. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **179**, 1011–1021 (2009).
79. Borges, V. M. *et al.* TNFalpha inhibits apoptotic cell clearance in the lung, exacerbating acute inflammation. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **297**, L586-595 (2009).
80. Sapey, E. *et al.* Behavioral and structural differences in migrating peripheral neutrophils from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **183**, 1176–1186 (2011).
81. Yamagata, T. *et al.* Overexpression of CD-11b and CXCR1 on circulating neutrophils: its possible role in COPD. *Chest* **132**, 890–899 (2007).
82. Wang, Y. *et al.* Increased neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) promotes airway remodelling in chronic obstructive pulmonary disease. *Clin. Sci. Lond. Engl. 1979* **131**, 1147–1159 (2017).
83. Pilette, C. *et al.* Increased galectin-3 expression and intra-epithelial neutrophils in

small airways in severe COPD. *Eur. Respir. J.* **29**, 914–922 (2007).
84. Mebius, R. E., Rennert, P. & Weissman, I. L. Developing lymph nodes collect CD4+CD3- LTbeta+ cells that can differentiate to APC, NK cells, and follicular cells but not T or B cells. *Immunity* **7**, 493–504 (1997).
85. Artis, D. & Spits, H. The biology of innate lymphoid cells. *Nature* **517**, 293–301 (2015).
86. Spits, H. *et al.* Innate lymphoid cells — a proposal for uniform nomenclature. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 145–149 (2013).
87. Juelke, K. & Romagnani, C. Differentiation of human innate lymphoid cells (ILCs). *Curr. Opin. Immunol.* **38**, 75–85 (2016).
88. Bernink, J. H. *et al.* Interleukin-12 and -23 Control Plasticity of CD127(+) Group 1 and Group 3 Innate Lymphoid Cells in the Intestinal Lamina Propria. *Immunity* **43**, 146–160 (2015).
89. Cella, M. *et al.* Subsets of ILC3-ILC1-like cells generate a diversity spectrum of innate lymphoid cells in human mucosal tissues. *Nat. Immunol.* **20**, 980–991 (2019).
90. Wang, X., Peng, H. & Tian, Z. Innate lymphoid cell memory. *Cell. Mol. Immunol.* **16**, 423–429 (2019).
91. De Grove, K. C. *et al.* Characterization and Quantification of Innate Lymphoid Cell Subsets in Human Lung. *PloS One* **11**, e0145961 (2016).
92. Bal, S. M. *et al.* IL-1β, IL-4 and IL-12 control the fate of group 2 innate lymphoid cells in human airway inflammation in the lungs. *Nat. Immunol.* **17**, 636–645 (2016).
93. Silver, J. S. *et al.* Inflammatory triggers associated with exacerbations of COPD orchestrate plasticity of group 2 innate lymphoid cells in the lungs. *Nat. Immunol.* **17**, 626–635 (2016).
94. Shikhagaie, M. M. *et al.* Neuropilin-1 Is Expressed on Lymphoid Tissue Residing LTi-like Group 3 Innate Lymphoid Cells and Associated with Ectopic Lymphoid Aggregates. *Cell Rep.* **18**, 1761–1773 (2017).
95. Kearley, J. *et al.* Cigarette Smoke Silences Innate Lymphoid Cell Function and Facilitates an Exacerbated Type I Interleukin-33-Dependent Response to Infection. *Immunity* **42**, 566–579 (2015).
96. Barbara U Schraml et *al*. Defining dendritic cells. *Curr. pin. Immunol*. 13-20(2015).
97. Demedts, I. K. *et al.* Accumulation of dendritic cells and increased CCL20 levels in the airways of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **175**, 998–1005 (2007).
98. Wang, G.-Z. *et al.* Tobacco smoke induces production of chemokine CCL20 to promote lung cancer. *Cancer Lett.* **363**, 60–70 (2015).
99. Tsoumakidou, M. *et al.* Decreased small airway and alveolar CD83+ dendritic cells in COPD. *Chest* **136**, 726–733 (2009).
100. Freeman, C. M. *et al.* Lung dendritic cell expression of maturation molecules increases with worsening chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **180**, 1179–1188 (2009).
101. Vassallo, R. *et al.* Cigarette smoke promotes dendritic cell accumulation in COPD; a Lung Tissue Research Consortium study. *Respir. Res.* **11**, 45 (2010).
102. LIAO, S.-X. *et al.* Cigarette smoke affects dendritic cell maturation in the small airways of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Mol. Med. Rep.* **11**, 219–225 (2015).
103. Stoll, P. *et al.* Impact of smoking on dendritic cell phenotypes in the airway lumen of patients with COPD. *Respir. Res.* **15**, 48 (2014).
104. Wu, C. *et al.* IFN-γ Primes Macrophage Activation by Increasing Phosphatase and Tensin Homolog via Downregulation of miR-3473b. *J. Immunol.* **193**, 3036–3044 (2014).
105. D'hulst, A. I. *et al.* Cigarette smoke-induced pulmonary emphysema in scid-mice. Is the acquired immune system required? *Respir. Res.* **6**, 147 (2005).

106. Borchers, M. T. *et al.* CD8+ T Cells Contribute to Macrophage Accumulation and Airspace Enlargement Following Repeated Irritant Exposure. *Exp. Mol. Pathol.* **83**, 301–310 (2007).
107. Hogg, J. C. & Timens, W. The pathology of chronic obstructive pulmonary disease. *Annu. Rev. Pathol.* **4**, 435–459 (2009).
108. Saetta, M. *et al.* Increased expression of the chemokine receptor CXCR3 and its ligand CXCL10 in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **165**, 1404–1409 (2002).
109. Hashimoto, S. *et al.* Upregulation of two death pathways of perforin/granzyme and FasL/Fas in septic acute respiratory distress syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **161**, 237–243 (2000).
110. Majo, J., Ghezzo, H. & Cosio, M. G. Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema. *Eur. Respir. J.* **17**, 946–953 (2001).
111. Stefano, A. D. *et al.* Cellular and molecular mechanisms in chronic obstructive pulmonary disease: an overview. *Clin. Exp. Allergy* **34**, 1156–1167 (2004).
112. Di Stefano, A. *et al.* 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).
113. Barczyk, A. *et al.* Cytokine production by bronchoalveolar lavage T lymphocytes in chronic obstructive pulmonary disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* **117**, 1484–1492 (2006).
114. Hogg, J. C. *et al.* The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N. Engl. J. Med.* **350**, 2645–2653 (2004).
115. Feghali-Bostwick, C. A. *et al.* Autoantibodies in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **177**, 156–163 (2008).
116. Rinaldi, M. *et al.* Antielastin B-cell and T-cell immunity in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* **67**, 694–700 (2012).
117. Seys, L. J. M. *et al.* Role of B Cell-Activating Factor in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **192**, 706–718 (2015).
118. Steri, M. *et al.* Overexpression of the Cytokine BAFF and Autoimmunity Risk. *N. Engl. J. Med.* **376**, 1615–1626 (2017).
119. Polverino, F. *et al.* B Cell–Activating Factor. An Orchestrator of Lymphoid Follicles in Severe Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **192**, 695–705 (2015).
120. Montuschi, P., Kharitonov, S. A., Ciabattoni, G. & Barnes, P. J. Exhaled leukotrienes and prostaglandins in COPD. *Thorax* **58**, 585–588 (2003).
121. Tager, A. M. *et al.* Leukotriene B4 receptor BLT1 mediates early effector T cell recruitment. *Nat. Immunol.* **4**, 982–990 (2003).
122. Ichinose, M., Sugiura, H., Yamagata, S., Koarai, A. & Shirato, K. Increase in reactive nitrogen species production in chronic obstructive pulmonary disease airways. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **162**, 701–706 (2000).
123. Rogers, L. K. & Cismowski, M. J. Oxidative stress in the lung – The essential paradox. *Curr. Opin. Toxicol.* **7**, 37–43 (2018).
124. Kirkham, P. A. & Barnes, P. J. Oxidative Stress in COPD. *Chest* **144**, 266–273 (2013).
125. Rahman, I. *et al.* 4-Hydroxy-2-nonenal, a specific lipid peroxidation product, is elevated in lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **166**, 490–495 (2002).
126. Di Stefano, A. *et al.* Increased expression of nuclear factor-kappaB in bronchial biopsies from smokers and patients with COPD. *Eur. Respir. J.* **20**, 556–563 (2002).
127. Ito, K., Hanazawa, T., Tomita, K., Barnes, P. J. & Adcock, I. M. Oxidative stress reduces histone deacetylase 2 activity and enhances IL-8 gene expression: role of tyrosine nitration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **315**, 240–245 (2004).
128. Bhowmik, A., Seemungal, T. A., Sapsford, R. J. & Wedzicha, J. A. Relation of

sputum inflammatory markers to symptoms and lung function changes in COPD exacerbations. *Thorax* **55**, 114–120 (2000).
129. Celli, B. R. *et al.* Inflammatory biomarkers improve clinical prediction of mortality in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **185**, 1065–1072 (2012).
130. Wei, J., Xiong, X.-F., Lin, Y.-H., Zheng, B.-X. & Cheng, D.-Y. Association between serum interleukin-6 concentrations and chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review and meta-analysis. *PeerJ* **3**, e1199 (2015).
131. Kimura, A. & Kishimoto, T. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur. J. Immunol.* **40**, 1830–1835 (2010).
132. Zhang, L., Cheng, Z., Liu, W. & Wu, K. Expression of interleukin (IL)-10, IL-17A and IL-22 in serum and sputum of stable chronic obstructive pulmonary disease patients. *COPD* **10**, 459–465 (2013).
133. Xu, W.-H., Hu, X.-L., Liu, X.-F., Bai, P. & Sun, Y.-C. 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.)* **129**, 909–916 (2016).
134. Vargas-Rojas, M. I. *et al.* Increase of Th17 cells in peripheral blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir. Med.* **105**, 1648–1654 (2011).
135. Eustace, A. *et al.* Identification of cells expressing IL-17A and IL-17F in the lungs of patients with COPD. *Chest* **139**, 1089–1100 (2011).
136. Caramori, G., Adcock, I. M., Di Stefano, A. & Chung, K. F. Cytokine inhibition in the treatment of COPD. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* **9**, 397–412 (2014).
137. Donnelly, L. E. & Barnes, P. J. Chemokine receptors as therapeutic targets in chronic obstructive pulmonary disease. *Trends Pharmacol. Sci.* **27**, 546–553 (2006).
138. Aaron, S. D. *et al.* Granulocyte inflammatory markers and airway infection during acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **163**, 349–355 (2001).
139. de Boer, W. I. *et al.* Monocyte chemoattractant protein 1, interleukin 8, and chronic airways inflammation in COPD. *J. Pathol.* **190**, 619–626 (2000).
140. Sauleda, J. *et al.* Pulmonary and systemic hepatocyte and keratinocyte growth factors in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* **3**, 719–725 (2008).
141. Takizawa, H. *et al.* Increased expression of transforming growth factor-beta1 in small airway epithelium from tobacco smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **163**, 1476–1483 (2001).
142. Ihn, H. Pathogenesis of fibrosis: role of TGF-beta and CTGF. *Curr. Opin. Rheumatol.* **14**, 681–685 (2002).
143. Takeyama, K., Fahy, J. V. & Nadel, J. A. Relationship of epidermal growth factor receptors to goblet cell production in human bronchi. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **163**, 511–516 (2001).
144. Burgel, P. & Nadel, J. Roles of epidermal growth factor receptor activation in epithelial cell repair and mucin production in airway epithelium. *Thorax* **59**, 992–996 (2004).
145. Shao, M. X. G., Nakanaga, T. & Nadel, J. A. Cigarette smoke induces MUC5AC mucin overproduction via tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme in human airway epithelial (NCI-H292) cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **287**, L420-427 (2004).
146. de Boer, W. I. *et al.* Expression of epidermal growth factors and their receptors in the bronchial epithelium of subjects with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Clin. Pathol.* **125**, 184–192 (2006).
147. Santos, S. *et al.* Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in pulmonary arteries of smokers and patients with moderate chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **167**, 1250–1256 (2003).
148. Kasahara, Y. *et al.* Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and

emphysema. *J. Clin. Invest.* **106**, 1311–1319 (2000).
149. Nandakumar, S. K., Ulirsch, J. C. & Sankaran, V. G. Advances in Understanding Erythropoiesis: Evolving Perspectives. *Br. J. Haematol.* **173**, 206–218 (2016).
150. Lawrence, S. M., Corriden, R. & Nizet, V. The Ontogeny of a Neutrophil: Mechanisms of Granulopoiesis and Homeostasis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **82**, (2018).
151. Rørvig, S., Østergaard, O., Heegaard, N. H. H. & Borregaard, N. Proteome profiling of human neutrophil granule subsets, secretory vesicles, and cell membrane: correlation with transcriptome profiling of neutrophil precursors. *J. Leukoc. Biol.* **94**, 711–721 (2013).
152. Bowers, E. *et al.* Granulocyte-derived TNFα promotes vascular and hematopoietic regeneration in the bone marrow. *Nat. Med.* **24**, 95–102 (2018).
153. Kawano, Y. *et al.* G-CSF-induced sympathetic tone provokes fever and primes antimobilizing functions of neutrophils via PGE2. *Blood* **129**, 587–597 (2017).
154. Casanova-Acebes, M. *et al.* Rhythmic modulation of the hematopoietic niche through neutrophil clearance. *Cell* **153**, 1025–1035 (2013).
155. Hellebrekers, P., Vrisekoop, N. & Koenderman, L. Neutrophil phenotypes in health and disease. *Eur. J. Clin. Invest.* **48 Suppl 2**, e12943 (2018).
156. Bai, M. *et al.* CD177 modulates human neutrophil migration through activation-mediated integrin and chemoreceptor regulation. *Blood* **130**, 2092–2100 (2017).
157. Adrover, J. M., Nicolás-Ávila, J. A. & Hidalgo, A. Aging: A Temporal Dimension for Neutrophils. *Trends Immunol.* **37**, 334–345 (2016).
158. Ella, K., Csépányi-Kömi, R. & Káldi, K. Circadian regulation of human peripheral neutrophils. *Brain. Behav. Immun.* **57**, 209–221 (2016).
159. Zhang, D. *et al.* Neutrophil ageing is regulated by the microbiome. *Nature* **525**, 528–532 (2015).
160. Hacbarth, E. & Kajdacsy-Balla, A. Low density neutrophils in patients with systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and acute rheumatic fever. *Arthritis Rheum.* **29**, 1334–1342 (1986).
161. Hassani, M. *et al.* On the origin of low-density neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* **107**, 809–818 (2020).
162. Liu, Y. *et al.* Phenotypic and clinical characterization of low density neutrophils in patients with advanced lung adenocarcinoma. *Oncotarget* **8**, 90969–90978 (2017).
163. Carmona-Rivera, C. & Kaplan, M. J. Low-density granulocytes: a distinct class of neutrophils in systemic autoimmunity. *Semin. Immunopathol.* **35**, 455–463 (2013).
164. Hinshaw, D. C. & Shevde, L. A. The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression. *Cancer Res.* **79**, 4557–4566 (2019).
165. Fridlender, Z. G. *et al.* Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: 'N1' versus 'N2' TAN. *Cancer Cell* **16**, 183–194 (2009).
166. van Egmond, M. & Bakema, J. E. Neutrophils as effector cells for antibody-based immunotherapy of cancer. *Semin. Cancer Biol.* **23**, 190–199 (2013).
167. Zhu, Q. *et al.* The IL-6-STAT3 axis mediates a reciprocal crosstalk between cancer-derived mesenchymal stem cells and neutrophils to synergistically prompt gastric cancer progression. *Cell Death Dis.* **5**, e1295 (2014).
168. Sagiv, J. Y. *et al.* Phenotypic diversity and plasticity in circulating neutrophil subpopulations in cancer. *Cell Rep.* **10**, 562–573 (2015).
169. Wu, F., Cao, W., Yang, Y. & Liu, A. Extensive infiltration of neutrophils in the acute phase of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *Histochem. Cell Biol.* **133**, 313–322 (2010).
170. Casserly, C. S., Nantes, J. C., Whittaker Hawkins, R. F. & Vallières, L. Neutrophil perversion in demyelinating autoimmune diseases: Mechanisms to medicine. *Autoimmun. Rev.* **16**, 294–307 (2017).
171. Naegele, M. *et al.* Neutrophils in multiple sclerosis are characterized by a primed

phenotype. *J. Neuroimmunol.* **242**, 60–71 (2012).
172. Zehntner, S. P. *et al.* Neutrophils that infiltrate the central nervous system regulate T cell responses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **174**, 5124–5131 (2005).
173. Villanueva, E. *et al.* Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **187**, 538–552 (2011).
174. Knight, J. S. & Kaplan, M. J. Lupus neutrophils: 'NET' gain in understanding lupus pathogenesis. *Curr. Opin. Rheumatol.* **24**, 441–450 (2012).
175. Denny, M. F. *et al.* A distinct subset of proinflammatory neutrophils isolated from patients with systemic lupus erythematosus induces vascular damage and synthesizes type I IFNs. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **184**, 3284–3297 (2010).
176. Soehnlein, O., Steffens, S., Hidalgo, A. & Weber, C. Neutrophils as protagonists and targets in chronic inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **17**, 248–261 (2017).
177. Manz, M. G. & Boettcher, S. Emergency granulopoiesis. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 302–314 (2014).
178. Pillay, J. *et al.* A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *J. Clin. Invest.* **122**, 327–336 (2012).
179. Lokwani, R. *et al.* Blood Neutrophils In COPD But Not Asthma Exhibit A Primed Phenotype With Downregulated CD62L Expression . *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* **14**, 2517–2525 (2019).
180. Fu, J., Tobin, M. C. & Thomas, L. L. Neutrophil-like low-density granulocytes are elevated in patients with moderate to severe persistent asthma. *Ann. Allergy Asthma Immunol. Off. Publ. Am. Coll. Allergy Asthma Immunol.* **113**, 635-640.e2 (2014).
181. Williams, M. R., Azcutia, V., Newton, G., Alcaide, P. & Luscinskas, F. W. Emerging mechanisms of neutrophil recruitment across endothelium. *Trends Immunol.* **32**, 461–469 (2011).
182. Kobayashi, Y. The role of chemokines in neutrophil biology. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **13**, 2400–2407 (2008).
183. Hallett, M. B. & Lloyds, D. Neutrophil priming: the cellular signals that say 'amber' but not 'green'. *Immunol. Today* **16**, 264–268 (1995).
184. Vogt, K. L., Summers, C., Chilvers, E. R. & Condliffe, A. M. Priming and de-priming of neutrophil responses in vitro and in vivo. *Eur. J. Clin. Invest.* **48 Suppl 2**, e12967 (2018).
185. Vestweber, D. How leukocytes cross the vascular endothelium. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 692–704 (2015).
186. Servant, G. *et al.* Polarization of Chemoattractant Receptor Signaling During Neutrophil Chemotaxis. *Science* **287**, 1037–1040 (2000).
187. Filippi, M.-D. Neutrophil transendothelial migration: updates and new perspectives. *Blood* **133**, 2149–2158 (2019).
188. Ley, K. Integration of inflammatory signals by rolling neutrophils. *Immunol. Rev.* **186**, 8–18 (2002).
189. Didsbury, J. R. *et al.* Receptor class desensitization of leukocyte chemoattractant receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 11564–11568 (1991).
190. Underhill, D. M. & Ozinsky, A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 825–852 (2002).
191. Fairn, G. D. & Grinstein, S. How nascent phagosomes mature to become phagolysosomes. *Trends Immunol.* **33**, 397–405 (2012).
192. Aw, S., M, G., R, G., A, H. & R, M. The respiratory burst of phagocytic cells is associated with a rise in vacuolar pH. *Nature* **290**, 406–409 (1981).
193. Faurschou, M. & Borregaard, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect.* **5**, 1317–1327 (2003).
194. Sengeløv, H., Kjeldsen, L. & Borregaard, N. Control of exocytosis in early neutrophil activation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **150**, 1535–1543 (1993).

195. Delclaux, C. *et al.* Role of gelatinase B and elastase in human polymorphonuclear neutrophil migration across basement membrane. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **14**, 288–295 (1996).
196. Soehnlein, O., Zernecke, A. & Weber, C. Neutrophils launch monocyte extravasation by release of granule proteins. *Thromb. Haemost.* **102**, 198–205 (2009).
197. Brinkmann, V. *et al.* Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* **303**, 1532–1535 (2004).
198. Kaplan, M. J. & Radic, M. Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **189**, 2689–2695 (2012).
199. Winterbourn, C. C., Kettle, A. J. & Hampton, M. B. Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function. *Annu. Rev. Biochem.* **85**, 765–792 (2016).
200. Nauseef, W. M. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunol. Rev.* **219**, 88–102 (2007).
201. Petushkova, A. I. & Zamyatnin, A. A. Redox-Mediated Post-Translational Modifications of Proteolytic Enzymes and Their Role in Protease Functioning. *Biomolecules* **10**, (2020).
202. Shafer, W. M., Martin, L. E. & Spitznagel, J. K. Cationic antimicrobial proteins isolated from human neutrophil granulocytes in the presence of diisopropyl fluorophosphate. *Infect. Immun.* **45**, 29–35 (1984).
203. Almeida, R. P. *et al.* Azurocidin, a natural antibiotic from human neutrophils: expression, antimicrobial activity, and secretion. *Protein Expr. Purif.* **7**, 355–366 (1996).
204. Gordon, Y. J. *et al.* CAP37-derived antimicrobial peptides have in vitro antiviral activity against adenovirus and herpes simplex virus type 1. *Curr. Eye Res.* **34**, 241–249 (2009).
205. Pham, C. T. N. Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 541–550 (2006).
206. Wiesner, J. & Vilcinskas, A. Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. *Virulence* **1**, 440–464 (2010).
207. Neumann, A. *et al.* Novel Role of the Antimicrobial Peptide LL-37 in the Protection of Neutrophil Extracellular Traps against Degradation by Bacterial Nucleases. *J. Innate Immun.* **6**, 860–868 (2014).
208. Tobias, P. S., Soldau, K., Iovine, N. M., Elsbach, P. & Weiss, J. Lipopolysaccharide (LPS)-binding Proteins BPI and LBP Form Different Types of Complexes with LPS *. *J. Biol. Chem.* **272**, 18682–18685 (1997).
209. Corbin, B. D. *et al.* Metal chelation and inhibition of bacterial growth in tissue abscesses. *Science* **319**, 962–965 (2008).
210. Schwab, J. M., Chiang, N., Arita, M. & Serhan, C. N. Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. *Nature* **447**, 869–874 (2007).
211. Serhan, C. N. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature* **510**, 92–101 (2014).
212. Fadok, V. A. *et al.* Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J. Clin. Invest.* **101**, 890–898 (1998).
213. Chiang, N. *et al.* Infection regulates pro-resolving mediators that lower antibiotic requirements. *Nature* **484**, 524–528 (2012).
214. Rouvier, E., Luciani, M. F., Mattéi, M. G., Denizot, F. & Golstein, P. CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **150**, 5445–5456 (1993).
215. Gaffen, S. L. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 556–567 (2009).
216. Kolls, J. K. & Lindén, A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity*

21, 467–476 (2004).
217. Weaver, C. T., Hatton, R. D., Mangan, P. R. & Harrington, L. E. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu. Rev. Immunol.* **25**, 821–852 (2007).
218. Shen, F. & Gaffen, S. L. Structure-function relationships in the IL-17 receptor: implications for signal transduction and therapy. *Cytokine* **41**, 92–104 (2008).
219. Zeng, R. *et al.* Synergy of IL-21 and IL-15 in regulating CD8+ T cell expansion and function. *J. Exp. Med.* **201**, 139–148 (2005).
220. Maitra, A. *et al.* Distinct functional motifs within the IL-17 receptor regulate signal transduction and target gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 7506–7511 (2007).
221. Kuestner, R. E. *et al.* Identification of the IL-17 receptor related molecule IL-17RC as the receptor for IL-17F. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **179**, 5462–5473 (2007).
222. Lee, J. *et al.* IL-17E, a novel proinflammatory ligand for the IL-17 receptor homolog IL-17Rh1. *J. Biol. Chem.* **276**, 1660–1664 (2001).
223. Pande, S., Yang, X. & Friesel, R. Interleukin-17 receptor D (Sef) is a multi-functional regulator of cell signaling. *Cell Commun. Signal. CCS* **19**, 6 (2021).
224. Nies, J. F. & Panzer, U. IL-17C/IL-17RE: Emergence of a Unique Axis in TH17 Biology. *Front. Immunol.* **11**, 341 (2020).
225. Park, H. *et al.* A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat. Immunol.* **6**, 1133–1141 (2005).
226. Qian, Y. *et al.* The adaptor Act1 is required for interleukin 17-dependent signaling associated with autoimmune and inflammatory disease. *Nat. Immunol.* **8**, 247–256 (2007).
227. Monin, L. & Gaffen, S. L. Interleukin 17 Family Cytokines: Signaling Mechanisms, Biological Activities, and Therapeutic Implications. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **10**, (2018).
228. Bulek, K. *et al.* The inducible kinase IKKi is required for IL-17-dependent signaling associated with neutrophilia and pulmonary inflammation. *Nat. Immunol.* **12**, 844–852 (2011).
229. Sun, D. *et al.* Treatment with IL-17 prolongs the half-life of chemokine CXCL1 mRNA via the adaptor TRAF5 and the splicing-regulatory factor SF2 (ASF). *Nat. Immunol.* **12**, 853–860 (2011).
230. Cua, D. J. & Tato, C. M. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 479–489 (2010).
231. Busman-Sahay, K. O., Walrath, T., Huber, S. & O'Connor, W. Cytokine crowdsourcing: multicellular production of TH17-associated cytokines. *J. Leukoc. Biol.* **97**, 499–510 (2015).
232. Ferretti, S., Bonneau, O., Dubois, G. R., Jones, C. E. & Trifilieff, A. IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **170**, 2106–2112 (2003).
233. Holownia, A., Wielgat, P., Rysiak, E. & Braszko, J. J. Intracellular and Extracellular Cytokines in A549 Cells and THP1 Cells Exposed to Cigarette Smoke. *Adv. Exp. Med. Biol.* **910**, 39–45 (2016).
234. Davis, M. M. T cell receptor gene diversity and selection. *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 475–496 (1990).
235. Zhu, J., Yamane, H. & Paul, W. E. Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. *Annu. Rev. Immunol.* **28**, 445–489 (2010).
236. Mailer, R. K. W. *et al.* IL-1β promotes Th17 differentiation by inducing alternative splicing of FOXP3. *Sci. Rep.* **5**, 14674 (2015).
237. Hamada, H. *et al.* Tc17, a Unique Subset of CD8 T Cells That Can Protect against Lethal Influenza Challenge. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **182**, 3469–3481 (2009).

238. Dragon, S., Saffar, A. S., Shan, L. & Gounni, A. S. IL-17 attenuates the anti-apoptotic effects of GM-CSF in human neutrophils. *Mol. Immunol.* **45**, 160–168 (2008).
239. Amatya, N., Garg, A. V. & Gaffen, S. L. IL-17 Signaling: The Yin and the Yang. *Trends Immunol.* **38**, 310–322 (2017).
240. Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M. & Kuchroo, V. K. IL-17 and Th17 Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 485–517 (2009).
241. Manel, N., Unutmaz, D. & Littman, D. R. The differentiation of human TH-17 cells requires transforming growth factor-β and induction of the nuclear receptor RORγT. *Nat. Immunol.* **9**, 641–649 (2008).
242. Yang, L. *et al.* IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature* **454**, 350–352 (2008).
243. Ivanov, I. I. *et al.* The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* **126**, 1121–1133 (2006).
244. Yang, X. O. *et al.* T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity* **28**, 29–39 (2008).
245. Wang, X., Ma, C., Wu, J. & Zhu, J. Roles of T helper 17 cells and interleukin-17 in neuroautoimmune diseases with emphasis on multiple sclerosis and Guillain-Barré syndrome as well as their animal models. *J. Neurosci. Res.* **91**, 871–881 (2013).
246. Wei, L., Laurence, A., Elias, K. M. & O'Shea, J. J. IL-21 is produced by th17 cells and drives IL-17 production in a stat3-dependent manner. *J. Biol. Chem.* **282**, 34605–34610 (2007).
247. Brüstle, A. *et al.* The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. *Nat. Immunol.* **8**, 958–966 (2007).
248. Arican, O., Aral, M., Sasmaz, S. & Ciragil, P. Serum levels of TNF-alpha, IFN-gamma, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, and IL-18 in patients with active psoriasis and correlation with disease severity. *Mediators Inflamm.* **2005**, 273–279 (2005).
249. Villadsen, L. S. *et al.* Resolution of psoriasis upon blockade of IL-15 biological activity in a xenograft mouse model. *J. Clin. Invest.* **112**, 1571–1580 (2003).
250. Wolk, K. *et al.* IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. *Eur. J. Immunol.* **36**, 1309–1323 (2006).
251. Boniface, K. *et al.* IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **174**, 3695–3702 (2005).
252. Liang, S. C. *et al.* Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J. Exp. Med.* **203**, 2271–2279 (2006).
253. Krueger, G. G. *et al.* A human interleukin-12/23 monoclonal antibody for the treatment of psoriasis. *N. Engl. J. Med.* **356**, 580–592 (2007).
254. Toichi, E. *et al.* An anti-IL-12p40 antibody down-regulates type 1 cytokines, chemokines, and IL-12/IL-23 in psoriasis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **177**, 4917–4926 (2006).
255. Zaba, L. C. *et al.* Amelioration of epidermal hyperplasia by TNF inhibition is associated with reduced Th17 responses. *J. Exp. Med.* **204**, 3183–3194 (2007).
256. Rovaris, M. *et al.* Patterns of disease activity in multiple sclerosis patients: a study with quantitative gadolinium-enhanced brain MRI and cytokine measurement in different clinical subgroups. *J. Neurol.* **243**, 536–542 (1996).
257. Chen, K. *et al.* Endocytosis of soluble immune complexes leads to their clearance by FcγRIIIB but induces neutrophil extracellular traps via FcγRIIA in vivo. *Blood* **120**, 4421–4431 (2012).
258. Ishizu, T. *et al.* Intrathecal activation of the IL-17/IL-8 axis in opticospinal multiple sclerosis. *Brain J. Neurol.* **128**, 988–1002 (2005).

259. Kebir, H. *et al.* Human T H 17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat. Med.* **13**, 1173–1175 (2007).
260. Zhang, Z. *et al.* After interleukin-12p40, are interleukin-23 and interleukin-17 the next therapeutic targets for inflammatory bowel disease? *Int. Immunopharmacol.* **7**, 409–416 (2007).
261. Hue, S. *et al.* Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* **203**, 2473–2483 (2006).
262. Mannon, P. J. *et al.* Anti–Interleukin-12 Antibody for Active Crohn's Disease. *N. Engl. J. Med.* **351**, 2069–2079 (2004).
263. Reinecker, H. C. *et al.* Enhanced secretion of tumour necrosis factor-alpha, IL-6, and IL-1 beta by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin. Exp. Immunol.* **94**, 174–181 (1993).
264. Nielsen, O. H., Kirman, I., Rüdiger, N., Hendel, J. & Vainer, B. Upregulation of interleukin-12 and -17 in active inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol.* **38**, 180–185 (2003).
265. Andoh, A. *et al.* Interleukin-22, a member of the IL-10 subfamily, induces inflammatory responses in colonic subepithelial myofibroblasts. *Gastroenterology* **129**, 969–984 (2005).
266. Witowski, J. *et al.* Role of mesothelial cell-derived granulocyte colony-stimulating factor in interleukin-17-induced neutrophil accumulation in the peritoneum. *Kidney Int.* **71**, 514–525 (2007).
267. Yagi, Y., Andoh, A., Inatomi, O., Tsujikawa, T. & Fujiyama, Y. Inflammatory responses induced by interleukin-17 family members in human colonic subepithelial myofibroblasts. *J. Gastroenterol.* **42**, 746–753 (2007).
268. Molet, S. *et al.* IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. *J. Allergy Clin. Immunol.* **108**, 430–438 (2001).
269. Lindén, A. Role of interleukin-17 and the neutrophil in asthma. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **126**, 179–184 (2001).
270. Dragon, S. *et al.* IL-17 enhances IL-1beta-mediated CXCL-8 release from human airway smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **292**, L1023-1029 (2007).
271. Rahman, M. S. *et al.* IL-17A induces eotaxin-1/CC chemokine ligand 11 expression in human airway smooth muscle cells: role of MAPK (Erk1/2, JNK, and p38) pathways. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **177**, 4064–4071 (2006).
272. Laan, M. *et al.* Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **162**, 2347–2352 (1999).
273. Hoshino, H., Lötvall, J., Skoogh, B. E. & Lindén, A. Neutrophil recruitment by interleukin-17 into rat airways in vivo. Role of tachykinins. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **159**, 1423–1428 (1999).
274. Barnes, P. J. & Pedersen, S. Efficacy and safety of inhaled corticosteroids in asthma. Report of a workshop held in Eze, France, October 1992. *Am. Rev. Respir. Dis.* **148**, S1-26 (1993).
275. Maneechotesuwan, K., Kasetsinsombat, K., Wongkajornsilp, A. & Barnes, P. J. Decreased indoleamine 2,3-dioxygenase activity and IL-10/IL-17A ratio in patients with COPD. *Thorax* **68**, 330–337 (2013).
276. Chang, Y. *et al.* Upregulation of IL-17A/F from human lung tissue explants with cigarette smoke exposure: implications for COPD. *Respir. Res.* **15**, 145 (2014).
277. Zhang, J. *et al.* Increased expression of CD4+IL-17+ cells in the lung tissue of patients with stable chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and smokers. *Int. Immunopharmacol.* **15**, 58–66 (2013).
278. Chang, Y. *et al.* Genetic deletion of IL-17A reduces cigarette smoke-induced inflammation and alveolar type II cell apoptosis. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **306**,

L132-143 (2014).
279. Zou, Y. *et al.* Serum IL-1β and IL-17 levels in patients with COPD: associations with clinical parameters. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* **12**, 1247–1254 (2017).
280. Roos, A. B. *et al.* IL-17A Is Elevated in End-Stage Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Contributes to Cigarette Smoke-induced Lymphoid Neogenesis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **191**, 1232–1241 (2015).
281. Bozinovski, S. *et al.* Innate cellular sources of interleukin-17A regulate macrophage accumulation in cigarette- smoke-induced lung inflammation in mice. *Clin. Sci. Lond. Engl. 1979* **129**, 785–796 (2015).
282. Kurimoto, E. *et al.* IL-17A is essential to the development of elastase-induced pulmonary inflammation and emphysema in mice. *Respir. Res.* **14**, 5 (2013).
283. Pichavant, M. *et al.* Oxidative stress-mediated iNKT-cell activation is involved in COPD pathogenesis. *Mucosal Immunol.* **7**, 568–578 (2014).
284. Siew, L. Q. C., Wu, S.-Y., Ying, S. & Corrigan, C. J. Cigarette smoking increases bronchial mucosal IL-17A expression in asthmatics, which acts in concert with environmental aeroallergens to engender neutrophilic inflammation. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* **47**, 740–750 (2017).
285. Blount, R. E., Morris, J. A. & Savage, R. E. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N* **92**, 544–549 (1956).
286. Chanock, R., Roizman, B. & Myers, R. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). I. Isolation, properties and characterization. *Am. J. Hyg.* **66**, 281–290 (1957).
287. Imaz, M. S. *et al.* Clinical and epidemiologic characteristics of respiratory syncytial virus subgroups A and B infections in Santa Fe, Argentina. *J. Med. Virol.* **61**, 76–80 (2000).
288. Stensballe, L. G. *et al.* Seasonal variation of maternally derived respiratory syncytial virus antibodies and association with infant hospitalizations for respiratory syncytial virus. *J. Pediatr.* **154**, 296–298 (2009).
289. Glezen, W. P., Taber, L. H., Frank, A. L. & Kasel, J. A. Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus. *Am. J. Dis. Child. 1960* **140**, 543–546 (1986).
290. Henderson, F. W., Collier, A. M., Clyde, W. A. & Denny, F. W. Respiratory-syncytial-virus infections, reinfections and immunity. A prospective, longitudinal study in young children. *N. Engl. J. Med.* **300**, 530–534 (1979).
291. Hall, C. B. *et al.* Respiratory syncytial virus infections within families. *N. Engl. J. Med.* **294**, 414–419 (1976).
292. Nair, H. *et al.* Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Lond. Engl.* **375**, 1545–1555 (2010).
293. Navas, L., Wang, E., de Carvalho, V. & Robinson, J. Improved outcome of respiratory syncytial virus infection in a high-risk hospitalized population of Canadian children. Pediatric Investigators Collaborative Network on Infections in Canada. *J. Pediatr.* **121**, 348–354 (1992).
294. Hallak, L. K., Kwilas, S. A. & Peeples, M. E. Interaction between respiratory syncytial virus and glycosaminoglycans, including heparan sulfate. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **379**, 15–34 (2007).
295. Levine, S., Klaiber-Franco, R. & Paradiso, P. R. Demonstration that glycoprotein G is the attachment protein of respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.* **68 (Pt 9)**, 2521–2524 (1987).
296. Karron, R. A. *et al.* Respiratory syncytial virus (RSV) SH and G proteins are not essential for viral replication in vitro: clinical evaluation and molecular characterization of a cold-passaged, attenuated RSV subgroup B mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 13961–13966 (1997).

297. Pastey, M. K., Gower, T. L., Spearman, P. W., Crowe, J. E. & Graham, B. S. A RhoA-derived peptide inhibits syncytium formation induced by respiratory syncytial virus and parainfluenza virus type 3. *Nat. Med.* **6**, 35–40 (2000).
298. Jans, J., elMoussaoui, H., de Groot, R., de Jonge, M. I. & Ferwerda, G. Actin- and clathrin-dependent mechanisms regulate interferon gamma release after stimulation of human immune cells with respiratory syncytial virus. *Virol. J.* **13**, 52 (2016).
299. Cowton, V. M., McGivern, D. R. & Fearns, R. 2006. Unravelling the complexities of respiratory syncytial virus RNA synthesis. *J. Gen. Virol.* **87**, 1805–1821.
300. Shahriari, S., Gordon, J. & Ghildyal, R. Host cytoskeleton in respiratory syncytial virus assembly and budding. *Virol. J.* **13**, 161 (2016).
301. García, J., García-Barreno, B., Vivo, A. & Melero, J. A. Cytoplasmic inclusions of respiratory syncytial virus-infected cells: formation of inclusion bodies in transfected cells that coexpress the nucleoprotein, the phosphoprotein, and the 22K protein. *Virology* **195**, 243–247 (1993).
302. Levine, S. Polypeptides of respiratory syncytial virus. *J. Virol.* **21**, 427–431 (1977).
303. Collins, P. L. & Mottet, G. Oligomerization and post-translational processing of glycoprotein G of human respiratory syncytial virus: altered O-glycosylation in the presence of brefeldin A. *J. Gen. Virol.* **73 (Pt 4)**, 849–863 (1992).
304. Wertz, G. W. *et al.* Nucleotide sequence of the G protein gene of human respiratory syncytial virus reveals an unusual type of viral membrane protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 4075–4079 (1985).
305. Gorman, J. J., Ferguson, B. L., Speelman, D. & Mills, J. Determination of the disulfide bond arrangement of human respiratory syncytial virus attachment (G) protein by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **6**, 1308–1315 (1997).
306. Feldman, S. A., Hendry, R. M. & Beeler, J. A. Identification of a linear heparin binding domain for human respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G. *J. Virol.* **73**, 6610–6617 (1999).
307. Johnson, T. R., McLellan, J. S. & Graham, B. S. Respiratory syncytial virus glycoprotein G interacts with DC-SIGN and L-SIGN to activate ERK1 and ERK2. *J. Virol.* **86**, 1339–1347 (2012).
308. Roberts, S. R., Lichtenstein, D., Ball, L. A. & Wertz, G. W. The membrane-associated and secreted forms of the respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G are synthesized from alternative initiation codons. *J. Virol.* **68**, 4538–4546 (1994).
309. Escribano-Romero, E., Rawling, J., García-Barreno, B. & Melero, J. A. The soluble form of human respiratory syncytial virus attachment protein differs from the membrane-bound form in its oligomeric state but is still capable of binding to cell surface proteoglycans. *J. Virol.* **78**, 3524–3532 (2004).
310. Collins, P. L., Huang, Y. T. & Wertz, G. W. Nucleotide sequence of the gene encoding the fusion (F) glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 7683–7687 (1984).
311. Collins, P. L. & Mottet, G. Post-translational processing and oligomerization of the fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.* **72 (Pt 12)**, 3095–3101 (1991).
312. Bolt, G., Pedersen, L. O. & Birkeslund, H. H. Cleavage of the respiratory syncytial virus fusion protein is required for its surface expression: role of furin. *Virus Res.* **68**, 25–33 (2000).
313. González-Reyes, L. *et al.* Cleavage of the human respiratory syncytial virus fusion protein at two distinct sites is required for activation of membrane fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 9859–9864 (2001).
314. Gruber, C. & Levine, S. Respiratory syncytial virus polypeptides. V. The kinetics of glycoprotein synthesis. *J. Gen. Virol.* (1985) doi:10.1099/0022-1317-66-6-1241.

315. Begoña Ruiz-Argüello, M. *et al.* Effect of proteolytic processing at two distinct sites on shape and aggregation of an anchorless fusion protein of human respiratory syncytial virus and fate of the intervening segment. *Virology* **298**, 317–326 (2002).
316. Li, P., McL Rixon, H. W., Brown, G. & Sugrue, R. J. Functional analysis of the N-linked glycans within the fusion protein of respiratory syncytial virus. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **379**, 69–83 (2007).
317. McLellan, J. S., Yang, Y., Graham, B. S. & Kwong, P. D. Structure of Respiratory Syncytial Virus Fusion Glycoprotein in the Postfusion Conformation Reveals Preservation of Neutralizing Epitopes ▿ . *J. Virol.* **85**, 7788–7796 (2011).
318. Anderson, L. J., Bingham, P. & Hierholzer, J. C. Neutralization of respiratory syncytial virus by individual and mixtures of F and G protein monoclonal antibodies. *J. Virol.* **62**, 4232–4238 (1988).
319. Zhang, L. *et al.* Infection of ciliated cells by human parainfluenza virus type 3 in an in vitro model of human airway epithelium. *J. Virol.* **79**, 1113–1124 (2005).
320. Chirkova, T. *et al.* CX3CR1 is an important surface molecule for respiratory syncytial virus infection in human airway epithelial cells. *J. Gen. Virol.* **96**, 2543–2556 (2015).
321. Malhotra, R. *et al.* Isolation and characterisation of potential respiratory syncytial virus receptor(s) on epithelial cells. *Microbes Infect.* **5**, 123–133 (2003).
322. Tayyari, F. *et al.* Identification of nucleolin as a cellular receptor for human respiratory syncytial virus. *Nat. Med.* **17**, 1132–1135 (2011).
323. Behera, A. K. *et al.* Blocking intercellular adhesion molecule-1 on human epithelial cells decreases respiratory syncytial virus infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **280**, 188–195 (2001).
324. Haynes, L. M. *et al.* Involvement of toll-like receptor 4 in innate immunity to respiratory syncytial virus. *J. Virol.* **75**, 10730–10737 (2001).
325. de Graaff, P. M. A. *et al.* Respiratory syncytial virus infection of monocyte-derived dendritic cells decreases their capacity to activate CD4 T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **175**, 5904–5911 (2005).
326. Neilson, K. A. & Yunis, E. J. Demonstration of respiratory syncytial virus in an autopsy series. *Pediatr. Pathol.* **10**, 491–502 (1990).
327. Welliver, T. P., Reed, J. L. & Welliver, R. C. Respiratory syncytial virus and influenza virus infections: observations from tissues of fatal infant cases. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **27**, S92-96 (2008).
328. McNamara, P. S., Flanagan, B. F., Hart, C. A. & Smyth, R. L. Production of Chemokines in the Lungs of Infants with Severe Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis. *J. Infect. Dis.* **191**, 1225–1232 (2005).
329. Heidema, J. *et al.* CD8+ T cell responses in bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood mononuclear cells of infants with severe primary respiratory syncytial virus infections. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **179**, 8410–8417 (2007).
330. Smith, P. K., Wang, S. Z., Dowling, K. D. & Forsyth, K. D. Leucocyte populations in respiratory syncytial virus-induced bronchiolitis. *J. Paediatr. Child Health* **37**, 146–151 (2001).
331. Sebina, I. & Phipps, S. The Contribution of Neutrophils to the Pathogenesis of RSV Bronchiolitis. *Viruses* **12**, (2020).
332. Cortjens, B. *et al.* Neutrophil extracellular traps cause airway obstruction during respiratory syncytial virus disease. *J. Pathol.* **238**, 401–411 (2016).
333. Funchal, G. A. *et al.* Respiratory Syncytial Virus Fusion Protein Promotes TLR-4–Dependent Neutrophil Extracellular Trap Formation by Human Neutrophils. *PLOS ONE* **10**, e0124082 (2015).
334. Kim, H. W. *et al.* Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *Am. J. Epidemiol.* **89**, 422–434 (1969).
335. Jahnsen, F. L. *et al.* Rapid dendritic cell recruitment to the bronchial mucosa of

patients with atopic asthma in response to local allergen challenge. *Thorax* **56**, 823–826 (2001).
336. Lambrecht, B. N., Salomon, B., Klatzmann, D. & Pauwels, R. A. Dendritic cells are required for the development of chronic eosinophilic airway inflammation in response to inhaled antigen in sensitized mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **160**, 4090–4097 (1998).
337. Bartz, H., Büning-Pfaue, F., Türkel, O. & Schauer, U. Respiratory syncytial virus induces prostaglandin E2, IL-10 and IL-11 generation in antigen presenting cells. *Clin. Exp. Immunol.* **129**, 438–445 (2002).
338. Bartz, H. *et al.* Respiratory syncytial virus decreases the capacity of myeloid dendritic cells to induce interferon-γ in naïve T cells. *Immunology* **109**, 49–57 (2003).
339. Smit, J. J., Rudd, B. D. & Lukacs, N. W. Plasmacytoid dendritic cells inhibit pulmonary immunopathology and promote clearance of respiratory syncytial virus. *J. Exp. Med.* **203**, 1153–1159 (2006).
340. Domachowske, J. B. *et al.* MIP-1alpha is produced but it does not control pulmonary inflammation in response to respiratory syncytial virus infection in mice. *Cell. Immunol.* **206**, 1–6 (2000).
341. John, A. E., Berlin, A. A. & Lukacs, N. W. Respiratory syncytial virus-induced CCL5/RANTES contributes to exacerbation of allergic airway inflammation. *Eur. J. Immunol.* **33**, 1677–1685 (2003).
342. Tekkanat, K. K. *et al.* RANTES (CCL5) production during primary respiratory syncytial virus infection exacerbates airway disease. *Eur. J. Immunol.* **32**, 3276–3284 (2002).
343. Rohde, G. *et al.* Respiratory viruses in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease requiring hospitalisation: a case-control study. *Thorax* **58**, 37–42 (2003).
344. Walsh, E. E., Peterson, D. R. & Falsey, A. R. Risk factors for severe respiratory syncytial virus infection in elderly persons. *J. Infect. Dis.* **189**, 233–238 (2004).
345. Kalinowski, A. *et al.* EGFR activation suppresses respiratory virus-induced IRF1-dependent CXCL10 production. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **307**, L186-196 (2014).
346. Hendricks, M. R. *et al.* Respiratory syncytial virus infection enhances Pseudomonas aeruginosa biofilm growth through dysregulation of nutritional immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 1642–1647 (2016).
347. Liu, D. *et al.* Association of Respiratory Syncytial Virus Toll-Like Receptor 3-Mediated Immune Response with COPD Exacerbation Frequency. *Inflammation* **41**, 654–666 (2018).
348. Groskreutz, D. J. *et al.* Respiratory syncytial virus induces TLR3 protein and protein kinase R, leading to increased double-stranded RNA responsiveness in airway epithelial cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **176**, 1733–1740 (2006).
349. Roeder, A. *et al.* Toll-like receptors as key mediators in innate antifungal immunity. *Med. Mycol.* **42**, 485–498 (2004).
350. Kadowaki, N. *et al.* Subsets of Human Dendritic Cell Precursors Express Different Toll-like Receptors and Respond to Different Microbial Antigens. *J. Exp. Med.* **194**, 863–870 (2001).
351. Spisek, R., Bretaudeau, L., Barbieux, I., Meflah, K. & Gregoire, M. Standardized generation of fully mature p70 IL-12 secreting monocyte-derived dendritic cells for clinical use. *Cancer Immunol. Immunother. CII* **50**, 417–427 (2001).
352. Diebold, S. S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S. & Reis e Sousa, C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* **303**, 1529–1531 (2004).
353. Heil, F. *et al.* Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* **303**, 1526–1529 (2004).
354. Yoneyama, M. *et al.* The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat. Immunol.* **5**, 730–737 (2004).

355. Orange, J. S., Wolf, S. F. & Biron, C. A. Effects of IL-12 on the response and susceptibility to experimental viral infections. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **152**, 1253–1264 (1994).
356. Matsuda, K. *et al.* Characteristics of IL-6 and TNF-alpha production by respiratory syncytial virus-infected macrophages in the neonate. *J. Med. Virol.* **48**, 199–203 (1996).
357. Panuska, J. R. *et al.* Respiratory syncytial virus induces interleukin-10 by human alveolar macrophages. Suppression of early cytokine production and implications for incomplete immunity. *J. Clin. Invest.* **96**, 2445–2453 (1995).
358. Becker, S., Quay, J. & Soukup, J. Cytokine (tumor necrosis factor, IL-6, and IL-8) production by respiratory syncytial virus-infected human alveolar macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **147**, 4307–4312 (1991).
359. Faber, T. E., Groen, H., Welfing, M., Jansen, K. J. G. & Bont, L. J. Specific increase in local IL-17 production during recovery from primary RSV bronchiolitis. *J. Med. Virol.* **84**, 1084–1088 (2012).
360. Thornburg, N. J., Shepherd, B. & Crowe, J. E. Transforming growth factor beta is a major regulator of human neonatal immune responses following respiratory syncytial virus infection. *J. Virol.* **84**, 12895–12902 (2010).
361. Lukacs, N. W. *et al.* Respiratory virus-induced TLR7 activation controls IL-17-associated increased mucus via IL-23 regulation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **185**, 2231–2239 (2010).
362. Mukherjee, S. *et al.* IL-17–Induced Pulmonary Pathogenesis during Respiratory Viral Infection and Exacerbation of Allergic Disease. *Am. J. Pathol.* **179**, 248–258 (2011).
363. Rangel-Moreno, J. *et al.* The development of inducible bronchus-associated lymphoid tissue depends on IL-17. *Nat. Immunol.* **12**, 639–646 (2011).
364. Chen, K. *et al.* IL-17RA is required for CCL2 expression, macrophage recruitment, and emphysema in response to cigarette smoke. *PloS One* **6**, e20333 (2011).
365. Dang, E. V. *et al.* Control of T(H)17/T(reg) balance by hypoxia-inducible factor 1. *Cell* **146**, 772–784 (2011).
366. Griffiths, C., Drews, S. J. & Marchant, D. J. Respiratory Syncytial Virus: Infection, Detection, and New Options for Prevention and Treatment. *Clin. Microbiol. Rev.* **30**, 277–319 (2017).
367. Habibi, M. S. *et al.* Impaired Antibody-mediated Protection and Defective IgA B-Cell Memory in Experimental Infection of Adults with Respiratory Syncytial Virus. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **191**, 1040–1049 (2015).
368. Brandenburg, A. H. *et al.* Respiratory syncytial virus specific serum antibodies in infants under six months of age: limited serological response upon infection. *J. Med. Virol.* **52**, 97–104 (1997).
369. Roca, A. *et al.* Prevalence of respiratory syncytial virus IgG antibodies in infants living in a rural area of Mozambique. *J. Med. Virol.* **67**, 616–623 (2002).
370. Piedra, P. A., Jewell, A. M., Cron, S. G., Atmar, R. L. & Glezen, W. P. Correlates of immunity to respiratory syncytial virus (RSV) associated-hospitalization: establishment of minimum protective threshold levels of serum neutralizing antibodies. *Vaccine* **21**, 3479–3482 (2003).
371. Murphy, B. R. *et al.* Serum and nasal-wash immunoglobulin G and A antibody response of infants and children to respiratory syncytial virus F and G glycoproteins following primary infection. *J. Clin. Microbiol.* **23**, 1009–1014 (1986).
372. Crowe, J. E., Firestone, C. Y. & Murphy, B. R. Passively acquired antibodies suppress humoral but not cell-mediated immunity in mice immunized with live attenuated respiratory syncytial virus vaccines. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **167**, 3910–3918 (2001).
373. Walsh, E. E. & Falsey, A. R. Humoral and mucosal immunity in protection from natural respiratory syncytial virus infection in adults. *J. Infect. Dis.* **190**, 373–378 (2004).
374. Taleb, S. A., Al Thani, A. A., Al Ansari, K. & Yassine, H. M. Human respiratory

syncytial virus: pathogenesis, immune responses, and current vaccine approaches. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* **37**, 1817–1827 (2018).
375. Falsey, A. R., Singh, H. K. & Walsh, E. E. Serum antibody decay in adults following natural respiratory syncytial virus infection. *J. Med. Virol.* **78**, 1493–1497 (2006).
376. Reed, J. L. *et al.* Innate immune signals modulate antiviral and polyreactive antibody responses during severe respiratory syncytial virus infection. *J. Infect. Dis.* **199**, 1128–1138 (2009).
377. American Academy of Pediatrics Subcommittee on Diagnosis and Management of Bronchiolitis. Diagnosis and management of bronchiolitis. *Pediatrics* **118**, 1774–1793 (2006).
378. Fernandes, R. M. *et al.* Glucocorticoids for acute viral bronchiolitis in infants and young children. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD004878 (2013).
379. Pinto, R. A., Arredondo, S. M., Bono, M. R., Gaggero, A. A. & Díaz, P. V. T helper 1/T helper 2 cytokine imbalance in respiratory syncytial virus infection is associated with increased endogenous plasma cortisol. *Pediatrics* **117**, e878-886 (2006).
380. Ventre, K. & Randolph, A. G. Ribavirin for respiratory syncytial virus infection of the lower respiratory tract in infants and young children. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD000181 (2007)
381. Kneyber, M. C. J. *et al.* Concurrent bacterial infection and prolonged mechanical ventilation in infants with respiratory syncytial virus lower respiratory tract disease. *Intensive Care Med.* **31**, 680–685 (2005).
382. Ni, K. *et al.* Pharyngeal Microflora Disruption by Antibiotics Promotes Airway Hyperresponsiveness after Respiratory Syncytial Virus Infection. *PLOS ONE* **7**, e41104 (2012).
383. Ruckwardt, T. J., Bonaparte, K. L., Nason, M. C. & Graham, B. S. Regulatory T cells promote early influx of CD8+ T cells in the lungs of respiratory syncytial virus-infected mice and diminish immunodominance disparities. *J. Virol.* **83**, 3019–3028 (2009).
384. Checchia, P. A. *et al.* Mortality and morbidity among infants at high risk for severe respiratory syncytial virus infection receiving prophylaxis with palivizumab: a systematic literature review and meta-analysis. *Pediatr. Crit. Care Med. J. Soc. Crit. Care Med. World Fed. Pediatr. Intensive Crit. Care Soc.* **12**, 580–588 (2011).
385. Gilman, M. S. A. *et al.* Rapid profiling of RSV antibody repertoires from the memory B cells of naturally infected adult donors. *Sci. Immunol.* **1**, (2016).
386. McLellan, J. S., Ray, W. C. & Peeples, M. E. Structure and function of respiratory syncytial virus surface glycoproteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **372**, 83–104 (2013).
387. Costello, H. M., Ray, W. C., Chaiwatpongsakorn, S. & Peeples, M. E. Targeting RSV with vaccines and small molecule drugs. *Infect. Disord. Drug Targets* **12**, 110–128 (2012).
388. Fedechkin, S. O., George, N. L., Wolff, J. T., Kauvar, L. M. & DuBois, R. M. Structures of respiratory syncytial virus G antigen bound to broadly neutralizing antibodies. *Sci. Immunol.* **3**, (2018).
389. Takei, H., Araki, A., Watanabe, H., Ichinose, A. & Sendo, F. Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis. *J. Leukoc. Biol.* **59**, 229–240 (1996).
390. Nascimento, M. T. C. *et al.* DNA extracellular traps are part of the immune repertoire of Periplaneta americana. *Dev. Comp. Immunol.* **84**, 62–70 (2018).
391. Hawes, M. C. *et al.* Extracellular DNA: the tip of root defenses? *Plant Sci. Int. J. Exp. Plant Biol.* **180**, 741–745 (2011).
392. Urban, C. F. *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Contain Calprotectin, a Cytosolic Protein Complex Involved in Host Defense against Candida albicans. *PLoS Pathog.* **5**, (2009).
393. Obermayer, A. *et al.* New aspects on the structure of neutrophil extracellular traps from chronic obstructive pulmonary disease and in vitro generation. *PloS One* **9**, e97784 (2014).
394. Papayannopoulos, V., Metzler, K. D., Hakkim, A. & Zychlinsky, A. Neutrophil

elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* **191**, 677–691 (2010).
395. Garcia-Romo, G. S. *et al.* Netting Neutrophils Are Major Inducers of Type I IFN Production in Pediatric Systemic Lupus Erythematosus. *Sci. Transl. Med.* **3**, 73ra20 (2011).
396. Metzler, K. D. *et al.* Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. *Blood* **117**, 953–959 (2011).
397. Fibrinolysis at the Interface of Thrombosis and Inflammation — The Role of Neutrophil Extracellular Traps | IntechOpen. https://www.intechopen.com/books/fibrinolysis-and-thrombolysis/fibrinolysis-at-the-interface-of-thrombosis-and-inflammation-the-role-of-neutrophil-extracellular-tr
398. Yousefi, S., Mihalache, C., Kozlowski, E., Schmid, I. & Simon, H. U. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ.* **16**, 1438–1444 (2009).
399. Clark, S. R. *et al.* Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat. Med.* **13**, 463–469 (2007).
400. Fuchs, T. A. *et al.* Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* **176**, 231–241 (2007).
401. Azevedo, E. P. C. *et al.* Amyloid fibrils trigger the release of neutrophil extracellular traps (NETs), causing fibril fragmentation by NET-associated elastase. *J. Biol. Chem.* **287**, 37206–37218 (2012).
402. Gupta, A. K. *et al.* Activated endothelial cells induce neutrophil extracellular traps and are susceptible to NETosis-mediated cell death. *FEBS Lett.* **584**, 3193–3197 (2010).
403. Schorn, C. *et al.* Bonding the foe - NETting neutrophils immobilize the pro-inflammatory monosodium urate crystals. *Front. Immunol.* **3**, 376 (2012).
404. Palmer, L. J., Damgaard, C., Holmstrup, P. & Nielsen, C. H. Influence of complement on neutrophil extracellular trap release induced by bacteria. *J. Periodontal Res.* **51**, 70–76 (2016).
405. Patel, S. *et al.* Nitric oxide donors release extracellular traps from human neutrophils by augmenting free radical generation. *Nitric Oxide Biol. Chem.* **22**, 226–234 (2010).
406. Khan, M. A. & Palaniyar, N. Transcriptional firing helps to drive NETosis. *Sci. Rep.* **7**, 41749 (2017).
407. Kenny, E. F. *et al.* Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways. *eLife* **6**, (2017).
408. Li, P. *et al.* PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J. Exp. Med.* **207**, 1853–1862 (2010).
409. Douda, D. N., Khan, M. A., Grasemann, H. & Palaniyar, N. SK3 channel and mitochondrial ROS mediate NADPH oxidase-independent NETosis induced by calcium influx. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 2817–2822 (2015).
410. Fay, A. J., Qian, X., Jan, Y. N. & Jan, L. Y. SK channels mediate NADPH oxidase-independent reactive oxygen species production and apoptosis in granulocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 17548–17553 (2006).
411. Ravindran, M., Khan, M. A. & Palaniyar, N. Neutrophil Extracellular Trap Formation: Physiology, Pathology, and Pharmacology. *Biomolecules* **9**, 365 (2019).
412. Yipp, B. G. *et al.* Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat. Med.* **18**, 1386–1393 (2012).
413. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease | Nature Medicine. https://www.nature.com/articles/nm.4294?platform=hootsuite.
414. Yousefi, S. *et al.* Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nat. Med.* **14**, 949–953 (2008).
415. Schorn, C. *et al.* Monosodium urate crystals induce extracellular DNA traps in neutrophils, eosinophils, and basophils but not in mononuclear cells. *Front. Immunol.* **3**, 277 (2012).

416. von Köckritz-Blickwede, M. *et al.* Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation. *Blood* **111**, 3070–3080 (2008).
417. Webster, S. J. *et al.* Distinct cell death programs in monocytes regulate innate responses following challenge with common causes of invasive bacterial disease. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **185**, 2968–2979 (2010).
418. Wong, K.-W. & Jacobs, W. R. Mycobacterium tuberculosis Exploits Human Interferon γ to Stimulate Macrophage Extracellular Trap Formation and Necrosis. *J. Infect. Dis.* **208**, 109–119 (2013).
419. Morshed, M., Yousefi, S., Stöckle, C., Simon, H.-U. & Simon, D. Thymic stromal lymphopoietin stimulates the formation of eosinophil extracellular traps. *Allergy* **67**, 1127–1137 (2012).
420. Yousefi, S., Simon, D. & Simon, H.-U. Eosinophil extracellular DNA traps: molecular mechanisms and potential roles in disease. *Curr. Opin. Immunol.* **24**, 736–739 (2012).
421. Simon, D. *et al.* Eosinophil extracellular DNA traps in skin diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* **127**, 194–199 (2011).
422. Dworski, R., Simon, H.-U., Hoskins, A. & Yousefi, S. Eosinophil and neutrophil extracellular DNA traps in human allergic asthmatic airways. *J. Allergy Clin. Immunol.* **127**, 1260–1266 (2011).
423. Morshed, M. *et al.* NADPH oxidase-independent formation of extracellular DNA traps by basophils. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **192**, 5314–5323 (2014).
424. Branitzki-Heinemann, K. *et al.* A novel role for the transcription factor HIF-1α in the formation of mast cell extracellular traps. *Biochem. J.* **446**, 159–163 (2012).
425. Scholz, C. C. & Taylor, C. T. Targeting the HIF pathway in inflammation and immunity. *Curr. Opin. Pharmacol.* **13**, 646–653 (2013).
426. Chow, O. A. *et al.* Statins enhance formation of phagocyte extracellular traps. *Cell Host Microbe* **8**, 445–454 (2010).
427. Wartha, F., Beiter, K., Normark, S. & Henriques-Normark, B. Neutrophil extracellular traps: casting the NET over pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* **10**, 52–56 (2007).
428. Menegazzi, R., Decleva, E. & Dri, P. Killing by neutrophil extracellular traps: fact or folklore? *Blood* **119**, 1214–1216 (2012).
429. Parker, H., Albrett, A. M., Kettle, A. J. & Winterbourn, C. C. Myeloperoxidase associated with neutrophil extracellular traps is active and mediates bacterial killing in the presence of hydrogen peroxide. *J. Leukoc. Biol.* **91**, 369–376 (2012).
430. Saitoh, T. *et al.* Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. *Cell Host Microbe* **12**, 109–116 (2012).
431. Weinrauch, Y., Drujan, D., Shapiro, S. D., Weiss, J. & Zychlinsky, A. Neutrophil elastase targets virulence factors of enterobacteria. *Nature* **417**, 91–94 (2002).
432. Averhoff, P., Kolbe, M., Zychlinsky, A. & Weinrauch, Y. Single residue determines the specificity of neutrophil elastase for Shigella virulence factors. *J. Mol. Biol.* **377**, 1053–1066 (2008).
433. Gallucci, S. & Matzinger, P. Danger signals: SOS to the immune system. *Curr. Opin. Immunol.* **13**, 114–119 (2001).
434. Lande, R. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* **449**, 564–569 (2007).
435. Lande, R. *et al.* Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci. Transl. Med.* **3**, 73ra19 (2011).
436. Tillack, K., Breiden, P., Martin, R. & Sospedra, M. T lymphocyte priming by neutrophil extracellular traps links innate and adaptive immune responses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **188**, 3150–3159 (2012).
437. Semeraro, F. *et al.* Extracellular histones promote thrombin generation through platelet-dependent mechanisms: involvement of platelet TLR2 and TLR4. *Blood* **118**, 1952–1961 (2011).

438. Hakkim, A. *et al.* Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 9813–9818 (2010).
439. Saffarzadeh, M. *et al.* Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. *PloS One* **7**, e32366 (2012).
440. Haegens, A., Vernooy, J. H. J., Heeringa, P., Mossman, B. T. & Wouters, E. F. M. Myeloperoxidase modulates lung epithelial responses to pro-inflammatory agents. *Eur. Respir. J.* **31**, 252–260 (2008).
441. Hafez, A. A. E. Could Neutrophil Extracellular Traps Elucidate the Mysteries of Pathogenesis? *J. Clin. Exp. Pathol.* **4**, 1–6 (2014).
442. Brill, A. *et al.* von Willebrand factor-mediated platelet adhesion is critical for deep vein thrombosis in mouse models. *Blood* **117**, 1400–1407 (2011).
443. Fuchs, T. A. *et al.* Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 15880–15885 (2010).
444. Massberg, S. *et al.* Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat. Med.* **16**, 887–896 (2010).
445. Glaser, C. B. *et al.* Oxidation of a specific methionine in thrombomodulin by activated neutrophil products blocks cofactor activity. A potential rapid mechanism for modulation of coagulation. *J. Clin. Invest.* **90**, 2565–2573 (1992).
446. Gould, T. J. *et al.* Neutrophil extracellular traps promote thrombin generation through platelet-dependent and platelet-independent mechanisms. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **34**, 1977–1984 (2014).
447. Noubouossie, D. F. *et al.* In vitro activation of coagulation by human neutrophil DNA and histone proteins but not neutrophil extracellular traps. *Blood* **129**, 1021–1029 (2017).
448. Martinod, K. *et al.* Neutrophil histone modification by peptidylarginine deiminase 4 is critical for deep vein thrombosis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 8674–8679 (2013).
449. Aldabbous, L. *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Promote Angiogenesis: Evidence From Vascular Pathology in Pulmonary Hypertension. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **36**, 2078–2087 (2016).
450. Mangold, A. *et al.* Coronary neutrophil extracellular trap burden and deoxyribonuclease activity in ST-elevation acute coronary syndrome are predictors of ST-segment resolution and infarct size. *Circ. Res.* **116**, 1182–1192 (2015).
451. Longstaff, C. *et al.* Mechanical stability and fibrinolytic resistance of clots containing fibrin, DNA, and histones. *J. Biol. Chem.* **288**, 6946–6956 (2013).
452. Houghton, A. M. *et al.* Neutrophil elastase-mediated degradation of IRS-1 accelerates lung tumor growth. *Nat. Med.* **16**, 219–223 (2010).
453. Acuff, H. B., Carter, K. J., Fingleton, B., Gorden, D. L. & Matrisian, L. M. Matrix metalloproteinase-9 from bone marrow-derived cells contributes to survival but not growth of tumor cells in the lung microenvironment. *Cancer Res.* **66**, 259–266 (2006).
454. Cools-Lartigue, J. *et al.* Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. *J. Clin. Invest.* (2013) doi:10.1172/JCI67484.
455. Demers, M. *et al.* Priming of neutrophils toward NETosis promotes tumor growth. *Oncoimmunology* **5**, e1134073 (2016).
456. Park, J. *et al.* Cancer cells induce metastasis-supporting neutrophil extracellular DNA traps. *Sci. Transl. Med.* **8**, 361ra138 (2016).
457. Zhang, Y. *et al.* Interleukin-17–induced neutrophil extracellular traps mediate resistance to checkpoint blockade in pancreatic cancer. *J. Exp. Med.* **217**, (2020).
458. Tang, S. *et al.* Neutrophil extracellular trap formation is associated with autophagy-related signalling in ANCA-associated vasculitis. *Clin. Exp. Immunol.* **180**, 408–418 (2015).
459. Corsiero, E. *et al.* Single cell cloning and recombinant monoclonal antibodies generation from RA synovial B cells reveal frequent targeting of citrullinated histones of NETs. *Ann. Rheum. Dis.* **75**, 1866–1875 (2016).

460. Khandpur, R. *et al.* NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci. Transl. Med.* **5**, 178ra40 (2013).
461. Kahlenberg, J. M., Carmona-Rivera, C., Smith, C. K. & Kaplan, M. J. Neutrophil extracellular trap-associated protein activation of the NLRP3 inflammasome is enhanced in lupus macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **190**, 1217–1226 (2013).
462. Wang, M. *et al.* Impaired anti-inflammatory action of glucocorticoid in neutrophil from patients with steroid-resistant asthma. *Respir. Res.* **17**, 153 (2016).
463. Ordoñez, C. L., Shaughnessy, T. E., Matthay, M. A. & Fahy, J. V. Increased neutrophil numbers and IL-8 levels in airway secretions in acute severe asthma: Clinical and biologic significance. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **161**, 1185–1190 (2000).
464. Pham, D. L. *et al.* Neutrophil autophagy and extracellular DNA traps contribute to airway inflammation in severe asthma. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* **47**, 57–70 (2017).
465. Simpson, J. L. *et al.* Impaired macrophage phagocytosis in non-eosinophilic asthma. *Clin. Exp. Allergy* **43**, 29–35 (2013).
466. Marcos, V. *et al.* Free DNA in cystic fibrosis airway fluids correlates with airflow obstruction. *Mediators Inflamm.* **2015**, 408935 (2015).
467. Grabcanovic-Musija, F. *et al.* Neutrophil extracellular trap (NET) formation characterises stable and exacerbated COPD and correlates with airflow limitation. *Respir. Res.* **16**, 59 (2015).
468. Wright, T. K. *et al.* Neutrophil extracellular traps are associated with inflammation in chronic airway disease. *Respirol. Carlton Vic* **21**, 467–475 (2016).
469. Pedersen, F. *et al.* Neutrophil extracellular trap formation is regulated by CXCR2 in COPD neutrophils. *Eur. Respir. J.* **51**, (2018).
470. Dicker, A. J. *et al.* Neutrophil extracellular traps are associated with disease severity and microbiota diversity in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* **141**, 117–127 (2018).
471. Akk, A., Springer, L. E. & Pham, C. T. N. Neutrophil Extracellular Traps Enhance Early Inflammatory Response in Sendai Virus-Induced Asthma Phenotype. *Front. Immunol.* **7**, 325 (2016).
472. Muraro, S. P. *et al.* Respiratory Syncytial Virus induces the classical ROS-dependent NETosis through PAD-4 and necroptosis pathways activation. *Sci. Rep.* **8**, (2018).
473. Rebernick, R. *et al.* DNA Area and NETosis Analysis (DANA): a High-Throughput Method to Quantify Neutrophil Extracellular Traps in Fluorescent Microscope Images. *Biol. Proced. Online* **20**, 7 (2018).
474. Goldmann, O. & Medina, E. The expanding world of extracellular traps: not only neutrophils but much more. *Front. Immunol.* **3**, 420 (2012).
475. Mayadas, T. N., Cullere, X. & Lowell, C. A. The multifaceted functions of neutrophils. *Annu. Rev. Pathol.* **9**, 181–218 (2014).
476. Zhang, Y. *et al.* Interleukin-17–induced neutrophil extracellular traps mediate resistance to checkpoint blockade in pancreatic cancer. *J. Exp. Med.* **217**, (2020).
477. Tamassia, N. *et al.* A Reappraisal on the Potential Ability of Human Neutrophils to Express and Produce IL-17 Family Members In Vitro: Failure to Reproducibly Detect It. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
478. Kramer, J. M. *et al.* Evidence for ligand-independent multimerization of the IL-17 receptor. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **176**, 711–715 (2006).
479. Kramer, J. M. *et al.* Cutting Edge: Identification of a Pre-Ligand Assembly Domain (PLAD) and Ligand Binding Site in the IL-17 Receptor. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **179**, 6379–6383 (2007).
480. Toy, D. *et al.* Cutting edge: interleukin 17 signals through a heteromeric receptor complex. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **177**, 36–39 (2006).
481. Tohme, S. *et al.* Computational Analysis Supports IL-17A as a Central Driver of

Neutrophil Extracellular Trap–Mediated Injury in Liver Ischemia Reperfusion. *J. Immunol.* **202**, 268–277 (2019).
482. Lin, A. M. *et al.* Mast cells and neutrophils release IL-17 through extracellular trap formation in psoriasis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **187**, 490–500 (2011).
483. Reidel, B. *et al.* E-Cigarette Use Causes a Unique Innate Immune Response in the Lung, Involving Increased Neutrophilic Activation and Altered Mucin Secretion. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **197**, 492–501 (2018).
484. Petretto, A. *et al.* Neutrophil extracellular traps (NET) induced by different stimuli: A comparative proteomic analysis. *PloS One* **14**, e0218946 (2019).

NETSBPCO - Rôle de l'IL-17 locale dans l'induction de la NETose et l'obstruction pulmonaire au cours de la Broncho-pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO)

Les neutrophiles sont essentiels à l'immunité innée, notamment à la défense de l'hôte contre les infections d'origines bactériennes et virales. Ils assurent leur rôle de défense en phagocytant les agents pathogènes, en sécrétant leurs enzymes cytotoxiques granulaires ou en expulsant dans l'espace extracellulaire des '' Neutrophil Extracellular Traps'' (NETs), processus appelé NETose. Cette NETose peut être initiée par les produits d'origine microbienne et les inducteurs pro-inflammatoires endogènes tels que l'IL- 8, qui se lient aux récepteurs de surface des neutrophiles. Les NETs peuvent piéger et éliminer les microbes; cependant, la formation abondante de NETs peut contribuer à l'inflammation voir l'occlusion des voies respiratoires dans le cas de maladies chroniques comme la BPCO. Bien que l'IL-17 participe au recrutement des neutrophiles et est trouvée en grande quantité dans la BPCO, son rôle dans l'induction des NETs n'a pas été étudié. Malgré une libération importante des NETs lors de l'exacerbation de la BPCO par le VRS, le mécanisme d'induction de ces NETs n'est pas non plus bien élucidé.

Dans cette étude, l'influence de l'IL-17 et la protéine G sécrétée du VRS (sG) sur la libération des NETs a été déterminée par des expériences de cytométrie en flux, d'imunomarquage et de dosage d'ADN. Nos résultats démontrent que les neutrophiles de sang total expriment les IL- 17RA-D, alors que les neutrophiles purifiés expriment uniquement les IL-17RA et IL-17RC. L'IL-17 et la sG sont capables d'induire la libération des NETs. L'élastase des neutrophiles et la myéloperoxydase étant toutes deux présentes sur les fibres d'ADN. Ces NETs ont été démantelées par un traitement à la DNAse, confirmant que leur ''backbone'' est la chromatine. Ces résultats méritent d'être confirmés par d'autres analyses pour vérifier si la sécrétion de NETs est significative. L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'IL-17 et la sG peuvent conjointement contribuer à la formation des NETs.

BPCO ; Polynucléaire neutrophile ; NETose ; IL-17 ; VRS

NETSBPCO - Role of local IL-17 in the induction of NETosis and pulmonary obstruction in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD)

Neutrophils are critical for innate immunity, including host defense against bacterial and viral infections. They achieve their host defense role by phagocytosing pathogens, secreting their granular cytotoxic enzymes or expelling Neutrophil Extracellular Traps (NETs) into the extracellular space, a process called NETosis. NETosis can be initiated by microbial products and endogenous pro-inflammatory inducers such as IL- 8, that bind to neutrophil surface receptors. NETs can trap and eliminate microbes; however, abundant NET formation can contribute to inflammation and even airway obstruction in chronic diseases such as COPD. Though IL-17 is involved in neutrophil recruitment and is produced in large quantities in COPD, its role in the induction of NETs has not been elucidated. Despite a significant release of NETs during RSV-exacerbation COPD, the mechanism behind the NET induction is not well elucidated.

In this study, the effect of IL-17 and secreted RSV G protein (pG) on NET release was determined using flow cytometry, immunostaining and DNA assays. Our results show that whole blood neutrophils express IL- 17RA-D, while purified neutrophils express only IL-17RA and IL-17RC. IL-17 and pG are both capable of inducing the release of NETs. Neutrophil elastase and myeloperoxidase are both detected on DNA fibers. These NETs were dismantled by DNAse treatment, confirming that their backbone is chromatin. These results deserve to be confirmed by additional analysis to verify if NETs secretion is significant. Together, these results suggest that IL-17 and pG may both contribute to the formation of NETs.

COPD ; polymorphonuclear neutrophil ; NETosis ; IL-17 ; RSV

Discipline : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Spécialité : Immunologie

Université de Reims Champagne-Ardenne

IRMAIC EA7509

51 rue Cognacq-Jay 51100 Reims