



HAL
open science

Effet de l'exposition à la fumée de cigarette sur le profil oxydatif et la sénescence des différentes sous-populations lymphocytaires T CD4+

Indoumady Baskara-Yhuellou

► To cite this version:

Indoumady Baskara-Yhuellou. Effet de l'exposition à la fumée de cigarette sur le profil oxydatif et la sénescence des différentes sous-populations lymphocytaires T CD4+. Santé. Université Paris-Est, 2013. Français. NNT : 2013PEST1064 . tel-01142051

HAL Id: tel-01142051

<https://theses.hal.science/tel-01142051>

Submitted on 14 Apr 2015

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

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



Doctorat ParisTech

THÈSE

pour obtenir le grade de docteur délivré par

**L'Institut des Sciences et Industries
du Vivant et de l'Environnement**

(AgroParisTech)

Spécialité : Sciences du Vivant

présentée et soutenue publiquement par

Indoumady BASKARA-YHUELLOU

20 Décembre 2013

**Effet de l'exposition à la fumée de cigarette sur le profil oxydatif et la
sénescence des différentes sous-populations lymphocytaires T CD4+**

Directeur de thèse : **Sabine LE GOUVELLO**

Co-encadrement de la thèse : **Jorge BOCZKOWSKI**

Jury

M. Bernard MAITRE, Professeur, Université, Paris 12
M. Anh Tuan DINH-XUAN, Professeur, Université, Paris 5
M. Pierre LANGLADE-DEMOYEN, Docteur, Institut Pasteur
Mme. Carole PLANES, Professeur, Université, Paris 13
Mme. Sabine LE GOUVELLO, Docteur, Université, Paris 12
M. Jorge BOCZKOWSKI, Docteur, Université, Paris 12

Président du jury
Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Directrice de thèse
Co-Directeur de thèse

Remerciements

Je remercie le Pr Bernard MAITRE, le Pr Anh Tuan DINH-XUAN, le Dr Pierre LANGLADE-DEMOYEN et le Pr Carole PLANES d'avoir accepté de faire partie de mon jury de Thèse.

Je remercie le Dr Jorge BOCZKOWSKI de m'avoir accueillie au sein de son équipe et d'avoir accepté d'être co-directeur de ma Thèse. Les réunions dans ce bureau qui m'intimidait beaucoup au début m'ont toujours apporté un recul nécessaire sur mes résultats. Merci aussi pour vos précieux conseils durant cette thèse, votre soutien dans les moments difficiles et surtout d'avoir cru en moi même lorsque mon comportement était loin d'être parfait.

Je remercie ma Directrice de thèse le Dr Sabine LE GOUVELLO d'avoir supervisé ce travail, pour son soutien et surtout de m'avoir donné la chance d'effectuer une thèse, j'aurai aimé apporter plus à ce projet. J'ai grâce à vous appris énormément sur le plan scientifique et technique, et développer une autonomie indispensable pour la suite de mes projets. Vos critiques m'ont permis de mieux réfléchir sur mon sujet. Je tiens également à remercier Stéphane KERBRAT pour son aide dans les manip.

Je tiens à remercier le Pr François LEMOINE et son équipe, tout particulièrement Claude Baillou et Mustapha CHERAI, pour leurs conseils dans la mise point des panels pour le phénotypage. Je tiens particulièrement à remercier les membres de mon comité thèse le Pr Nicolas Glaichenhaus et le Dr Benoit Salomon pour avoir apporté leur aide dans ce projet ; leur point de vue et conseils m'ont permis de prendre du recul sur mes résultats.

Je remercie également le Dr Didier Morin pour ses conseils concernant le stress oxydatif et les mises au point de la sonde ainsi qu'au Dr Roberto Motterlini et son étudiante Sarah Kobéissi pour le FCCP.

Un grand merci au Dr Nabila Seddiki de l'équipe 16 de m'avoir aidé avec le phénotypage des Treg. Je remercie également le Dr Flavia CASTELLANO, le Dr Valérie FRENKEL et Céline Cousin pour les manip avec l'IL-4i1.

Je remercie Christine Lacabaratz pour ses précieux conseils en cytométrie et surtout de m'avoir permis de venir sur la plateforme de cytométrie.

Merci beaucoup à tous les membres de l'équipe 4 pour votre gentillesse et votre aide dans les moments difficiles, sans oublier les anciens dont Esther Belade. J'ai passé de bons moments avec toi nos conversations m'ont beaucoup manqué. JM (GAGLILO) merci d'avoir répondu présent à chaque problème et aussi pour les fous rires dans le bureau. Ma petite « mimi » tu as été géniale et ça m'a beaucoup touché que tu sois venue me voir après mon accident alors que tu étais en pleine rédaction. Les cours de zumba avec toi et Sandra vont me manquer. Je remercie également tout le bureau des étudiants Vanessa, Marion, Emmanuel et Ali. Merci à Shamila et à Caroline Chauché pour votre gentillesse et les mots réconfortants dans les situations de crise. Un grand merci à Maeva pour ton aide et tes conseils. Attention je n'oublie pas mon super Arnaud toujours de bonne humeur et à voir le côté positif des choses ! Je remercie également Claire Hotz de l'équipe 16 pour m'avoir aidé avec les Th17 ainsi que Mathieu Surenaud.

Un merci aux collègues du Service IMMUNOLOGIE de l'hôpital Henri Mondor tout particulièrement Catherine Dehault, Nathalie Marion, Valérie Tournier, Nathalie de la cytométrie, Nathalie et Catherine du secrétariat pour votre gentillesse ainsi que Franck DELAFONT pour m'avoir donné des conseils en cytométrie.

Sans oublier Thomas FRANCOIS pour sa gentillesse, sa bonne humeur et sa super musique de métal dans le labo ainsi que son aide avec les ampoules. Merci à Guillaume FORTIER, mon ancien collègue d'IMMUNOCLIN, pour avoir été présent et surtout pour les fous rires ainsi que ma deepoo (Patel) tu es partie trop tôt.

Un très très grand merci à : « SUPER TOTO » (Tony Noel) la personne la plus sympa que je connaisse ; tes performances au karaoké et tes talents culinaires m'ont impressionnée. Merci à Nathalie GODARD pour sa gentillesse et merci de m'avoir aidé pour les problèmes de CMF et Karine Deschodt pour ta bonne humeur (je t'ai battu à just dance !). Je remercie également « super Tiffanie » (Auguste) pour son humour, sa gentillesse et ses conseils.

Je tiens également à remercier Mme Françoise Launay, ancienne Directrice adjointe des Formations Doctorales d'ABIES, pour son écoute et ses conseils. Merci à Elizabeth Maltese,

de l'école Doctorale d'ABIES, pour son aide dans la rédaction de mon manuscrit. Merci de m'avoir encouragée et aidé dans cette étape.

A présent, un merci à ces cinq personnes qui comptent beaucoup et qui m'ont toujours soutenu sans que je n'aurai pas pu y arriver. François Bérrehar et Corinne Duprez, je vous remercie sincèrement pour tout ce que vous avez fait pour moi ; un merci ne suffit pas. Vous avez toujours été présents pour moi ma phrase préférée : « François à l'aide j'ai un problème » et « Corinne aide moi » et vous répondez présents. Je ne trouve pas les mots pour vous exprimer ma gratitude. Et bien sûr je n'oublie pas les fous rires.

Aurélié Guguin et Adeline Henry, mes super copines de cytométrie, je vous remercie pour tout vous êtes « TOP ». Les moments durs ont été vite oubliés grâce à votre présence, votre générosité, votre aide et surtout votre humour. Merci pour votre soutien durant ces 3 dernières années et jusqu'au bout en plus. En un mot vous êtes géniales ! Grâce à vous je me suis perfectionnée en cytométrie, vous êtes les maîtres YODA de la cytométrie! (rigueur, sérieux et implication dans votre travail). J'avais l'impression de faire partie de votre bureau. J'espère que l'on gardera contact vous allez me manquer...

Un énorme merci à Maylis DAGOUASSAT. Je te remercie pour tout ce que tu as fait pour moi en terme de manips, les conseils, les encouragements ; je suis admirative devant ton travail et ta rigueur. Sur le plan personnel, tu es devenue plus qu'une collègue, une superbe amie. En dehors de ta gentillesse et ta générosité, j'ai découvert une personne vraiment « cool et marrante » avec qui je partage beaucoup de points communs. Je remercie également Xavier ton mari pour son soutien et ses conseils. Merci de m'avoir aidé à aller au bout.

Et pour finir merci à mes amis en particulier Marie Léonard et Bachir FOMBA pour votre soutien. Je remercie également mon ancien Chef Marc TROMBE pour ses conseils au cours de ces dernières années ainsi que Sylvie GUYOT pour ton amitié. Merci à mon petit cousin Aaron pour m'avoir soutenue avec tes blagues. Merci à mes parents pour leur soutien indéfectible.

Et à vous deux...

Ma petite sœur SOUDA (l'œil du tigre !! mon mickey) pour m'avoir poussé à aller jusqu'au bout et mon mari tu as été exceptionnel, merci d'avoir tout géré à la maison ; maintenant tu es un spécialiste des Th17 et Treg. Et surtout merci de croire en moi.

Résumé

Les Th17, un sous-type de lymphocytes T (LT) CD4+, sont impliqués dans la pathogenèse de différentes maladies inflammatoires chroniques dont la Bronchopneumopathie Chronique Obstructive (BPCO) qui est associée au tabagisme; les mécanismes responsables ne sont pas connus. Les susceptibilités différentes au stress oxydatif des LT conventionnels (Tconv) et régulateurs (Treg) et l'existence de LT circulants sénescents chez les fumeurs supposent que les Th17 seraient plus sensibles à la sénescence que les autres sous-populations en raison d'une susceptibilité accrue aux agressions oxydatives. Nous avons donc comparé les profils oxydatifs et l'expression des marqueurs de sénescence des sous-populations de LT issus d'individus sains traités par du condensat de fumée de cigarette (CFC). Nos données indiquent un lien entre l'augmentation du taux d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) par le CFC et l'induction de l'expression de p16 dans les Tconv en particulier dans les Th17. Cette susceptibilité particulière des Th17 à la sénescence induite par le tabac pourrait contribuer au caractère inflammatoire des LT dans la BPCO ; une piste importante à explorer serait de déterminer le rôle de l'IL-4i1, une enzyme synthétisant des ERO, surexprimée dans les Th17.

Mots clés : Th17, Tabagisme, BPCO, ERO, sénescence, IL-4i1, inflammation.

Abstract

Th17, a subtype of T Lymphocytes CD4+, are implicated in different chronic inflammatory diseases like Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) which is related disease to smoking; the mechanism is unknown. The different susceptibility to oxidative stress of regulators (Treg) and conventional T lymphocytes (Tconv) and the existence of senescent T Lymphocytes (LT) in smokers may imply that Th17 are more susceptible to senescence compared to Treg because of their more susceptibility to oxidative stress. So we have compared the level of reactive oxygen species (ROS) and the expression of senescence markers of LT sub type treated with cigarette smoke extract (CSE). Our results show that there is a link between the increase of ROS induced by CSE and the induction of p16 in Th17. This susceptibility of Th17 to senescence induced by tobacco could participate in the inflammatory process driven by LT in COPD; a better understanding of IL-4i1, an enzyme implicated in the production of ROS and overexpressed in Th17 will help.

Key words: Th17, Smoking, COPD, ROS, senescence, IL-4i1, inflammation.

Abréviations

$^1\text{O}_2$: oxygène singulet
7-AAD : 7-actinomycin D
BPCO : Broncho Pneumopathie Chronique Obstructive
Carboxy-DCF-DA : 5-(and-6)-carboxy-2',7' -dichlorofluorescein
CFC : condensate de fume de cigarette
CMF : Cytométrie en flux
DHE : Dihydroéthidine
ERO: espèces réactives de l'oxygène
FCCP : carbonylcyanide-p-trifluorométhoxy-phénylhydrazone
FOXP3 : Forkhead box P3
GATA3 : GATA binding protein 3
GPX : Glutathion peroxydase
GR : glutathion réductase
Grx : Glutarédoxine
GSH: glutathion
H₂DCF-DA : 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate
H₂O₂ : peroxide d'hydrogène
IFN- γ : Interféron- γ
IL-17 : Interleukine 17
ITAM : Immuno-receptor Tyrosine activation motif
iTreg : Lymphocyte T régulateur induit en périphérie
JAK : Janus kinase
KO : knock out
LAAO : L-acide aminé oxydase
LT : Lymphocytes T
MAPK : Mitogen-activated protein kinase

MFI : Moyenne de fluorescence
NAC : N-acétyl-cystéine
NADPH oxidase : Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxydase
NFkB : nuclear factor-kappa B
nTreg : Lymphocyte T régulateur provenant du thymus
O₂⁻ : l'anion superoxyde
OH⁻ : radical hydroxyle
ONOO⁻ : peroxydite
PCR : polymerase chain reaction
PMT : photomultiplicateurs
Prx : Peroxyrédoxines
RLO : radicaux libre de l'oxygène
ROR γ T: retinoic acid-related orphan receptor T
STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription
SOD : Superoxyde Dismutase
Tbet : T box expressed in T cells
Tconv naïfs : Lymphocyte T conventionnel naïf
TCR : le récepteur des lymphocytes T spécifique d'antigène
Teff : Lymphocyte T effecteur
TGF- β : Transforming growth factor TGF- β
Th : Lymphocytes T LT auxiliaires ou « helpers »
THBP : tert- butyl hydroperoxide
TLR : Toll like receptor

Sommaire

I.	Synthèse bibliographique	25
1.	Les différentes populations lymphocytaires T CD4.....	26
1.1.	Les lymphocytes T « helper » (Th).....	26
1.1.1.	Activation des LT CD4+naïfs.....	27
1.1.2.	Les lymphocytes Th1.....	29
1.1.3.	Les lymphocytes Th2.....	29
1.1.4.	Les lymphocytes Th17.....	30
1.1.4.1.	Découverte des Th17	31
1.1.4.2.	Différentiation des Th17 chez l'homme et la souris.....	32
1.1.4.3.	Phénotype et caractérisation des Th17	38
1.1.4.4.	Rôle physiologique des Th17	41
1.1.4.5.	Implications des Th 17 dans les maladies	43
1.1.4.6.	La réponse immunitaire des Th17 dans le poumon.....	45
1.2.	Régulation négative des réponses immunes Teffectrices	47
1.2.1.	Découverte des lymphocytes T régulateurs naturels (nTreg).....	47
1.2.2.	Origine et caractérisation des nTreg	48
1.2.3.	Les lymphocytes T régulateurs induits (iTreg).....	50
1.2.4.	Mécanismes de suppression des Treg.....	52
1.2.4.1.	Molécules immunosuppressives	52
1.2.4.2.	Mécanisme de suppression avec contact cellulaire	54
1.2.4.3.	Fonctions physiopathologiques des Treg	56
1.3.	Microenvironnement et plasticité fonctionnelle	57
1.3.1.	Phénotype Th17/Th1 et Th17/Th2	58
1.3.2.	Phénotype Th17/Treg	59
1.3.3.	Balance Treg / Th17 et maladies inflammatoires chroniques	59
2.	Le stress oxydatif	62
2.1.	Les espèces réactives de l'oxygène.....	62
2.1.1.	Les espèces radicalaires de l'oxygène	62
2.1.2.	Les espèces non radicalaires oxygénées	63

2.2.	Les principales ERO et leur mode de production	64
2.2.1.	L'oxygène singulet	64
2.2.2.	L'anion superoxyde (O_2^-)	64
2.2.2.1.	Principales sources de production	65
2.2.2.2.	Autres sources d'anion superoxyde	75
2.2.3.	Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et ses sources de production	76
2.2.3.1.	La superoxyde dismutase (SOD)	77
2.2.3.2.	Le Cytochrome P450 et le peroxysome	77
2.2.3.3.	Les aminoacides oxydases	78
2.2.4.	Le radical hydroxyle $OH\cdot$	80
2.2.5.	Monoxyde d'azote et les peroxy-nitrites	80
2.3.	Sources exogènes d'oxydants	82
2.3.1.	Composants de la fumée de cigarette	83
2.3.2.	Composants du condensat de fumée de cigarette (CFC)	85
2.3.2.1.	L'anion superoxyde (O_2^-)	85
2.3.2.2.	Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l' OH^-	86
2.3.2.3.	Peroxy-nitrite	86
2.4.	Systèmes de détoxification des ERO	87
2.4.1.	Systèmes non enzymatiques	87
2.4.1.1.	Les vitamines A, E et C	87
2.4.1.2.	Le glutathion (GSH)	88
2.4.1.3.	La Thiorédoxine (Trx)	89
2.4.2.	Systèmes enzymatiques	90
2.4.2.1.	Le Nuclear factor erythroid-derived 2-like (Nrf2)	90
2.4.2.2.	Enzymes anti-oxydantes	93
2.5.	Rôles des espèces réactives de l'oxygène	97
2.5.1.	Rôle physiologique des ERO	99
2.5.1.1.	Mécanismes d'action des ERO	100
2.5.1.2.	Rôles de Messagers secondaires	102
2.5.1.3.	Rôles dans les Défenses immunitaires	104
2.5.2.	Effets des ERO	105
2.5.2.1.	Cibles biologiques	105
2.5.2.2.	ERO et maladies	106
2.5.2.3.	Rôle des ERO dans le vieillissement cellulaire	108
2.5.2.4.	Immunosénescence	120
3.	La Bronchopneumopathie Chronique Obstructive (BPCO)	122
3.1.	Définition et évolution	122

3.2.	Etiologie.....	123
3.3.	Mécanismes physiopathologiques	124
3.3.1.	Le stress oxydatif.....	125
3.3.1.1.	Profil oxydatif des individus sains : fumeurs et non-fumeurs	125
3.3.1.2.	Profil oxydatif des patients atteints de BPCO	126
3.3.2.	Les systèmes antioxydants.....	127
3.3.2.1.	Systèmes antioxydants des fumeurs par rapport aux non-fumeurs	127
3.3.2.2.	Systèmes antioxydants des patients atteints de BPCO	128
3.3.3.	Relation entre stress oxydatif et inflammation	129
3.3.4.	Rôle des lymphocytes dans la maladie	130
3.3.4.1.	Lymphocytes T	130
3.3.4.2.	Balance Th17/Treg (§ 1.4. 6).....	131
3.3.5.	Sénescence cellulaire et vieillissement accéléré.....	133
3.3.5.1.	Comparaison entre les fumeurs et non-fumeur sains.....	133
3.3.5.2.	Comparaison des patients aux sujets sains	134
3.3.6.	Les autres mécanismes	135
II.	Matériels et Méthodes	139
1.	Préparation des suspensions cellulaires.....	140
1.1.	Isolement des cellules mononucléées du sang périphérique.....	140
1.2.	Purification des Lymphocytes TCD4+ par tri magnétique	141
1.3.	Evaluation de la viabilité	144
1.3.1.	Coloration au Bleu de Trypan	144
1.3.2.	Evaluation de la viabilité par cytométrie en flux (CMF).....	145
1.3.2.1.	Utilisation des propriétés de diffusion de la lumière	145
1.3.2.2.	Le 7-Aminoactinomycin D (7-AAD)	146
1.4.	Isolation des populations lymphocytaires par CMF	148
1.4.1.	Fonctionnement d'un analyseur et trieur de cellules	148
1.4.2.	Caractérisation des sous-populations lymphocytaires	151
1.4.3.	Principe de l'analyse conditionnée multiparamétrique.....	155
1.4.3.1.	L'analyse conditionnée du projet	157
1.5.	Vérification du tri cellulaire.....	159
1.5.1.	CMF.....	159
1.5.2.	Marquage intracellulaire de Foxp3.....	159
1.6.	Analyse de l'expression du marqueur d'activation CD27	160
2.	Modèles <i>in vitro</i> d'agression oxydatif aigue	160
2.1.	Traitement par des inducteurs de stress oxydatif.....	160
2.2.	Exposition <i>in vitro</i> au condensat de fumée de cigarette	161

2.3.	Exposition prolongée aux inducteurs de stress oxydatif.....	163
2.3.1.	Condensat de fumée de cigarette	163
2.3.2.	Stimulation du complexe antigénique TcR/CD3.....	163
3.	Analyse qualitative du métabolisme oxydatif par CMF.....	163
3.1.	Les sondes métaboliques : H ₂ DCF-DA et DHE	163
3.2.	Mesure d'ERO des populations de TCD4+ par CMF.....	166
4.	Traitements par des inhibiteurs d'ERO	168
5.	Détection des marqueurs de sénescence par microscopie.....	169
6.	Analyse de l'expression des gènes impliqués dans le système oxydant/antioxydant	171
6.1.	PCR quantitative : principe	171
6.2.	Extraction d'ARN totaux et synthèse d'ADNc.....	175
6.2.1.	Mode opératoire.....	175
6.2.2.	Contrôle qualité et dosage des ARN totaux.....	175
6.2.3.	Transcription inverse (Reverse transcription - RT).....	176
6.3.	Déroulement de la réaction de qPCR.....	177
6.4.	Analyse d'une PCR quantitative relative.....	178
III.	Mise au point de la mesure d'ERO des sous-populations lymphocytaires par CMF.	183
1.	Marquage par les sondes métaboliques	184
2.	Caractérisation des sous-populations	185
3.	Caractérisation des ERO des sous-populations.....	185
IV.	Production normale d'ERO dans les sous-populations lymphocytaires	187
1.	Dosage des ERO en condition basale.....	189
1.1.	Analyse au sein des PBMC totaux.....	189
1.2.	Analyse au sein des TCD4+ triés magnétiquement	190
V.	Mécanismes à l'origine de la production d'ERO en condition basale	193
1.	Analyse de l'expression des systèmes synthétisant des ERO	195
1.1.	Les NADPH oxydases (NOX).....	195
1.2.	La mitochondrie	196
1.2.1.	Le p-trifluoromethoxy-carbonyl-cyanide-phenyl hydrazone (FCCP).....	196
1.2.2.	L-phénylalanine oxydase : IL-4I1 ou Fig1	197
1.2.2.1.	Expression en ARNm	197
1.2.2.2.	Mesure de l'activité enzymatique de l'IL-4I1	197
1.3.	Analyse de l'expression des systèmes de détoxification non enzymatiques	198
1.3.1.	Le métabolisme du Glutathion	198
1.3.2.	Le métabolisme de la thiorédoxine.....	198
1.4.	Analyse de l'expression des Systèmes de détoxification enzymatiques.....	199
1.4.1.	Le système Nrf2.....	199

1.4.2. Les enzymes anti-oxydantes dépendantes de Nrf2.....	199
VI. Caractérisation de la réponse des sous-populations de TCD4+ à une agression oxydative	201
1. Caractérisation des ERO intracellulaires de sous-populations lymphocytaires T.....	203
1.1. Exposition aigue au CFC, THBP	203
1.2. Agression oxydative aigue et traitement anti-oxydant.....	204
1.3. Agression oxydative aigue et traitement au FCCP	205
VII. Corrélacion entre une agression oxydative et la sénescence lymphocytaire	207
1. Condition basale	209
2. Sénescence et exposition aigue au CFC	209
3. Exposition prolongée au CFC et sénescence.....	210
4. Exposition prolongée au CFC en condition mitogénique et sénescence.....	210
5. Exposition prolongée au CFC et sénescence : expression de p16.....	212
VIII. Discussion	215

Table des figures

Figure 1. Processus d'activation et différenciation des lymphocytes T CD4+ naïfs vers les lignées Th1, Th2, Th17, par les cellules dendritiques.....	28
Figure 2. Modélisation de la différenciation des sous-populations de <i>Th</i>	30
Figure 3. Conditions de polarisation des Th17 <i>in vitro</i> chez la souris (<i>Korn T, 2009</i>).....	33
Figure 4. Conditions de polarisation des Th17 <i>in vitro</i> chez l'homme (<i>Korn T, 2009</i>).....	34
Figure 5. Modélisation de la différenciation des précurseurs naïfs de Th17 vers les phénotypes effecteurs mémoires Th17/Th1.	36
Figure 6. Phénotype des T effecteurs mémoires CD45RO+ Th17.	38
Figure 7. Production de cytokines et chimiokines par les Th17.	42
Figure 8. IL-17 et son implication dans diverses pathologies auto-immunes et inflammatoires chroniques (<i>Miossec P, 2009</i>).....	45
Figure 9. Les réponses immunitaires Th dans le poumon. A : Infections dépendant d'un pathogène ; B : Affections non pathogéniques (<i>adapté de Nembrini C and al, 2009</i>) ...	46
Figure 10. Différenciation des sous-populations de Treg (<i>LANE N and al, 2010</i>).....	51
Figure 11. Mécanismes de suppression par les Treg.....	55
Figure 12. Différenciation des sous-populations de Th et iTreg à partir des Tconv naïfs.....	57
Figure 13. La chaîne respiratoire mitochondriale.	67
Figure 14. Régulation de la phosphorylation oxydative mitochondriale.	71
Figure 15. Structure de la NADPH oxydase.	73
Figure 16. Voie métabolique de l'oxygène et des ERO (sans le système antioxydant).....	81
Figure 17. La composition de la fumée de cigarette totale	83
Figure 18. Régulation de la translocation nucléaire de Nrf2.....	91
Figure 19. Voie métabolique de l'oxygène et ERO incluant les antioxydants.....	94
Figure 20. Réduction des ponts disulfures par les Glutaredoxines avec l'aide du GSH.....	96
Figure 21. Schéma récapitulatif des systèmes antioxydants dépendant des thiols.....	97
Figure 22. Nature ambivalente des ERO.....	98
Figure 23. Modèle hiérarchique des voies de signalisations induites par les taux d'ERO.	99
Figure 24. Mécanisme d'action des ERO au niveau des groupements thiols	100

Figure 25. Mécanisme d'actions ERO et des antioxydants.....	101
Figure 26. Régulation du cycle cellulaire.....	111
Figure 27. Voies moléculaires d'induction de la sénescence.	119
Figure 28. Physiopathologie de la Bronchopneumopathie Chronique obstructive (BPCO)..	123
Figure 29. Cellules immunes impliquées dans la physiopathologie de la BPCO.	124
Figure 30. Modélisation hypothétique de la dérégulation Treg / Th17 dans la BPCO	132
Figure 31. Séparation des cellules mononucléées sur gradient de Ficoll.....	140
Figure 32. Purification des Lymphocytes TCD4+ par tri magnétique (sélection négative) ..	143
Figure 33. Identification des cellules mortes par le marquage 7-AAD et les paramètres FSC/SSC.....	147
Figure 34. Principe de la cytométrie en Flux	149
Figure 35. Identification de types cellulaires en fonction des paramètres FSC et SSC	150
Figure 36. Données recueillies au niveau des PMT à partir de cellules marquées	151
Figure 37. Type d'histogrammes en CMF monoparamétrique (gauche) et bi-paramétrique (à droite)	156
Figure 38. Stratégie de tri adoptée pour l'isolation des 3 sous-populations d'intérêts à partir de LTCD4+ triés.....	157
Figure 39. Schéma décrivant la préparation du condensat de fumée de cigarette.	162
Figure 40. Principe de la sonde H ₂ DCF-DA	164
Figure 41. Caractérisation des ERO de chaque sous-population lymphocytaire	167
Figure 42. Principe de l'immunocytochimie	170
Figure 43. Déroulement d'une réaction de PCR classique.....	172
Figure 44. Déroulement d'une réaction de PCR quantitative	174
Figure 45 : Une réaction de reverse transcription de l'ARNm en ADNc	176
Figure 46 : Profil d'amplification d'une réaction de PCR et Ct.....	179

Table des tableaux

Tableau 1 : Récapitulatif de la caractérisation des Th et Treg	58
Tableau 2 : Tableau récapitulatif des espèces radicalaires de l'oxygène	63
Tableau 3 : Tableau récapitulatif des espèces non radicalaires oxygénées	63
Tableau 4 . Les principaux constituants de la fumée de cigarette	84
Tableau 5. Enzymes anti-oxydantes régulées par Nrf2	92
Tableau 6 . Complexes cycline/CDK régulant le cycle cellulaire.....	112
Tableau 7 . Descriptif des témoins de marquage utilisés pour un marquage 5 couleurs.....	153
Tableau 8. Informations relatif aux anticorps utilisés pour l'identification des populations lymphocytaires	155

Avant-propos

Il y a bien longtemps que les risques pour la santé liés au tabagisme sont connus. En effet, la feuille de tabac contient de nombreuses substances toxiques dont la nicotine, le goudron et les différents additifs. De plus, sa combustion génère de nombreuses autres substances chimiques, des gaz (monoxyde de carbone et d'azote...), des métaux lourds mais également des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et des oxydants... Le tabagisme est un facteur de risque pour différents cancers, et pour de nombreuses maladies inflammatoires chroniques. En particulier, le tabagisme est responsable de 85 % des cancers du poumon, et de 80% des décès par maladies pulmonaires, provoquant 60 000 décès par an en France. Malgré les différentes mesures gouvernementales en faveur de la lutte anti-tabac, la loi Veil de 1976, la loi Evin de 1991 et le décret de 2006 ; la prévalence du tabagisme ne fait qu'augmenter en France, ainsi que dans les autres pays industrialisés.

La Broncho Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO) est l'une des maladies pulmonaires dont le tabagisme chronique est le principal facteur étiologique. Elle est en constante progression dans les pays développés, et les prévisions de l'OMS la placent au 3^{ème} rang des causes de mortalité mondiale en 2020. La BPCO est caractérisée par l'emphysème pulmonaire, l'obstruction bronchique, et une inflammation chronique. Sa physiopathologie est complexe, faisant intervenir plusieurs mécanismes pathologiques dont un stress oxydatif déclenché par l'exposition à la fumée de cigarette, une réaction inflammatoire et une sénescence cellulaire exagérées. Des anomalies des populations lymphocytaires T jouent un rôle majeur dans la réaction inflammatoire dans la BPCO. Notamment, une augmentation systémique et pulmonaire importantes de lymphocytes inflammatoires cytotoxiques T CD8+ activés, et de lymphocytes T CD4+ Th1 et Th17 sont observées chez les patients porteurs de BPCO post-tabagique. L'accumulation de ces cellules dans le poumon corrèle négativement

avec la fonction pulmonaire. Cependant les mécanismes à l'origine de ce phénomène sont peu connus.

Des données de la littérature montrent l'induction de marqueurs de sénescence au niveau des lymphocytes circulants, chez des sujets fumeurs par rapport aux non-fumeurs. Ce phénomène est très probablement en rapport avec le stress oxydatif induit par le tabagisme chronique. Les cellules sénescents sont caractérisées par un arrêt irréversible de la prolifération, l'induction de différentes voies moléculaires impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire, l'induction d'un sécrétome contenant des cytokines et des chimiokines pro-inflammatoires.

L'existence d'une sensibilité accrue à la sénescence induite par la fumée de cigarette au niveau des lymphocytes T CD4+ activés, Th1 et Th17 par rapport aux autres sous-populations de lymphocytes T, et notamment aux lymphocytes T CD4+ T (Treg), pourrait être un mécanisme expliquant, au moins en partie, leur augmentation périphérique et/ou leur recrutement accru dans le poumon chez les patients avec BPCO post-tabagique. Cependant, la réponse des différentes sous populations de lymphocytes T à l'agression oxydative, et particulièrement à la fumée de cigarette, et la relation de ce processus avec la sénescence cellulaire n'ont pas encore été examinées. Néanmoins, il est intéressant de noter que certaines données de la littérature appuient l'existence d'une réponse différente. En effet, la résistance au stress oxydant a été décrite comme moindre dans les lymphocytes T CD4+ auxiliaires (« helper ») que dans les lymphocytes CD4+ Treg chez le sujet sain (*Mougiakakos, 2009 ; 2011*). Ainsi, l'hypothèse qui sous-tend mon travail de thèse, est qu'il existe une sensibilité accrue au stress oxydatif et à la sénescence cellulaire induits par la fumée de cigarette au niveau des T CD4+ de type Th17 par rapport aux autres T CD4+, notamment les Treg. Ce processus pourrait avoir comme conséquence l'existence d'un phénotype inflammatoire exacerbé au niveau des lymphocytes le plus sensibles (lymphocytes T CD8+ activés, Th1, et Th17), induisant par exemple l'augmentation du potentiel cytotoxique des T CD8+ par les cytokines inflammatoires sécrétées par les Th17 comme décrit dans un modèle murin d'emphysème (*Duan M-C, Mediators of Inflammation, 2012*), et/ou expliquant leur recrutement accru dans le poumon de patients avec BPCO.

L'objectif de mon travail de thèse a été ainsi de caractériser en condition basale et après exposition à la fumée de cigarette, la relation entre réponse oxydative et apparition de marqueurs de sénescence au niveau de différentes sous-populations lymphocytaires T du sang périphérique et d'identifier les sources productrices d'oxydants, chez des sujets volontaires sains.

Dans le présent document est présenté en première partie, un état actuel de la littérature décrivant les différentes sous-populations lymphocytaires étudiées, le stress oxydatif et sa relation avec la sénescence cellulaire, ainsi qu'une description de la physiopathologie de la BPCO. La deuxième partie présente les différentes techniques utilisées dans cette étude, ainsi que les modèles cellulaires mis en œuvre dans ce travail. Les résultats de cette étude font l'objet de la troisième partie, et la quatrième comprend une discussion, suivie d'une conclusion générale et de perspectives. Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'équipe 4 de l'unité Inserm 955 à la Faculté de Médecine de l'Université Paris Est Créteil, sous la direction du Dr Sabine Le-Gouvello (MCU-PH) et du Dr Jorge Boczkowski (DR1 Inserm). Les deux premières années de cette thèse ont été financées sur les fonds propres à l'équipe. La dernière année a bénéficié d'une bourse du Fonds de Dotation "Recherche en Santé Respiratoire" (FRSR).

Les résultats obtenus font l'objet d'un article en cours d'écriture :

Baskara-Yhuellou I., Ke S., Guguin A., Dagouassat M., Berréhar F., Duprez C., Cherai M., Lemoine F., Boczkowski J., & Le Gouvello S. Th17 lymphocytes are more susceptible than regulatory T lymphocytes to cigarette smoke induced-oxidative stress and senescence.

Il est également prévu d'envoyer un abstract au congrès 2014 de l'European Respiratory Society.

Par ailleurs, compte tenu de mon expertise dans le domaine de la sénescence, j'ai contribué pendant mon stage doctoral à un autre travail portant sur le rôle de la protéine p53 dans la physiopathologie de l'emphysème pulmonaire expérimental. Ce travail a donné lieu à 2 communications au congrès annuel de l'American Thoracic Society (2011 et 2014) et à un article en cours d'écriture (titre similaire au 2^e abstract).

Transcription factor p53 plays a pivotal role in protection against elastase-induced pulmonary inflammation and emphysema. Boyer, L Chrusciel S, Baskara I, Caramelle C, Kerbrat S, Belade E, Lanone S, Gary-Bobo G, Dagouassat M, Lanone S, Giraudier S, Le Gouvello S, Boczkowski J. Am J Respir Crit Care Med. 2011, pp 5801

p53 modulates emphysema development through a MMP12/TNF-alpha pathway in alveolar macrophages. Chrusciel S, Zysman M, Baskara I, Caramelle P, Clayette V, Bregant S, Le Gouvello S, Dive V, Boczkowski J, Boyer L.

CHAPITRE I

Synthèse bibliographique

1. Les différentes populations lymphocytaires T CD4

Le corps possède une protection naturelle contre les agressions venant de l'extérieur, la première physique est constituée par la peau, la deuxième chimique est représenté par les fluides corporels (sueur, larmes, mucus). Une fois ces barrières contournées, l'intrus ou la molécule du non-soi se retrouve face à un système plus complexe. Ce système est formé d'un ensemble de cellules et molécules, largement disséminé dans l'ensemble du corps, qui protège à la fois des agressions extérieures (agents infectieux, bactéries, toxines ...) et intérieures qu'ils génèrent (VIH par infection, ou cancer ...), c'est le système immunitaire. Les acteurs du système immunitaire sont constamment en mouvement, que ce soit dans les circulations lymphatique et sanguine mais aussi dans les tissus. Le système immunitaire apparaît donc comme un réseau dynamique. Ce réseau immunitaire est composé de l'immunité innée, la première ligne de défense contre les microbes, et de l'immunité acquise ou adaptative, hautement spécifique et douée de mémoire. L'immunité innée est l'événement initial de la réponse adaptative. L'immunité adaptative permet de reconnaître et d'éliminer sélectivement des micro-organismes étrangers spécifiques ou des antigènes étrangers. Cette réponse immune met en jeu deux types de populations cellulaires : les lymphocytes et les cellules présentatrices de l'antigène. Concernant la population lymphocytaire, il existe deux types de lymphocytes : les lymphocytes B et les lymphocytes T. Dans cette dernière population qui exprime l'antigène membranaire CD3, on distingue les lymphocytes T CD8 et les CD4.

1.1. Les lymphocytes T « helper » (Th)

Les lymphocytes T (LT) CD3⁺ exprimant la molécule membranaire CD4 se divisent en 2 groupes : Les lymphocytes T (LT) auxiliaires ou « helpers » (Th), et les lymphocytes T régulateurs (Treg). Les Th ont un rôle central dans la régulation des réponses immunitaires par leur capacité à « aider » les cellules de l'immunité adaptative (lymphocytes T CD8 et lymphocytes B) (*Allison JP, 1987*) et de l'immunité innée. D'autres LT CD4 ont comme fonction d'inhiber les réponses immunes, ce sont les Treg. Le concept de différentes lignées de Th spécifique est introduit pour la première fois, en 1986, par Mosmann et Coffman (*Mosmann TR, 1989*). Il repose sur le fait que les lymphocytes T CD4⁺ peuvent être différenciés sur la base de leur profil de sécrétion cytokinique en 5 sous-populations. Suite à la

reconnaissance d'un antigène, les LT naïfs provenant du thymus s'activent et se différencient dans les organes lymphoïdes secondaires principalement en trois sous-classes ayant des fonctions différentes et sécrétant des cytokines caractéristiques (*Gabert J, 1987 ; Garcia KC, 1999*).

La première, les Th1, permet d'amplifier l'activation des macrophages et initie l'immunité à médiation cellulaire, la seconde, les Th2, participe à la commutation de classes des immunoglobulines par les lymphocytes B et déclenche l'immunité humorale, la troisième, les Th17, est impliquée dans certaines infections bactériennes et fongiques, ainsi que dans des maladies autoimmunes, inflammatoires chroniques et les tumeurs chez l'homme. Ces Th expriment des récepteurs spécifiques de cytokines qui sont à l'origine de leur différenciation en cellules effectrices.

1.1.1. Activation des LT CD4+naïfs

Les LT matures à la sortie du thymus n'ont pas rencontré d'antigène (LT naïfs), sont non activés ou quiescents. Ce phénotype est caractérisé par l'expression membranaire de la molécule CD45RA (CD45RA+) ou l'absence de CD45RO (CD45RO-) (*Reiner SL, 2001*) et de CD25, la chaîne α du récepteur de l'IL-2 (CD25-). Les LT naïfs conventionnels CD4+CD45RO-CD25- (Tconv naïfs), communément appelés Th0, reconnaissent les peptides antigéniques présentés par des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité II (CMH II) de la surface des CPA et se différencient en une sous-population effectrice de Th au niveau des organes lymphoïdes secondaires (OLII). L'activation et la différenciation des Th0 sont contrôlée par 3 signaux distincts.

Le 1^{er} consiste dans la reconnaissance du complexe antigène-CMH II par le récepteur T spécifique d'antigène (TCR) en présence du corécepteur CD4, et la transmission du signal d'activation par le complexe CD3 ; le 2nd est la transmission d'un signal de co-stimulation généré par la liaison de la molécule CD28 présente à la surface des LT aux molécules B7.1/2 (CD80/86) présentes à la surface des CPA. A l'issue de cette étape, les cellules entrent en phase G1 du cycle cellulaire (*Reiner SL, 2001*). La liaison des molécules co-stimulatrices stimule la synthèse de l'interleukine 2 (IL-2), facteur de croissance important pour la survie et la prolifération des TCD4+, et induit l'expression de la chaîne α du récepteur à l'IL-2 (CD25+). Les cellules naïves n'ayant pas été activées sont CD25-. Enfin, le 3^{ème} signal, à

l'origine de la différenciation fonctionnelle des Th0 en Th1, Th2 ou Th17, dépend du microenvironnement conditionné par les cytokines sécrétées par les cellules dendritiques du système immunitaire inné (DC) activées en réponse aux antigènes (Boyton RJ, 2002). Les voies de différenciation des Th peuvent être influencées par de nombreux facteurs tels que la dose et la nature de l'antigène, l'affinité du TCR pour le peptide antigénique, et les interactions avec les molécules de costimulation qui interviennent dans la durée de la stimulation du TCR. Deux systèmes sont couramment utilisés pour l'étude des facteurs conduisant à la différenciation fonctionnelle des Th : i) l'activation polyclonale des lymphocytes T avec, par exemple, un anticorps anti-CD3 associé à un anticorps dirigé contre la molécule de costimulation CD28, ou la stimulation des lymphocytes T dérivés de souris transgéniques pour un TCR particulier, avec un antigène spécifique et des cellules présentatrices d'antigène (Figure 1).

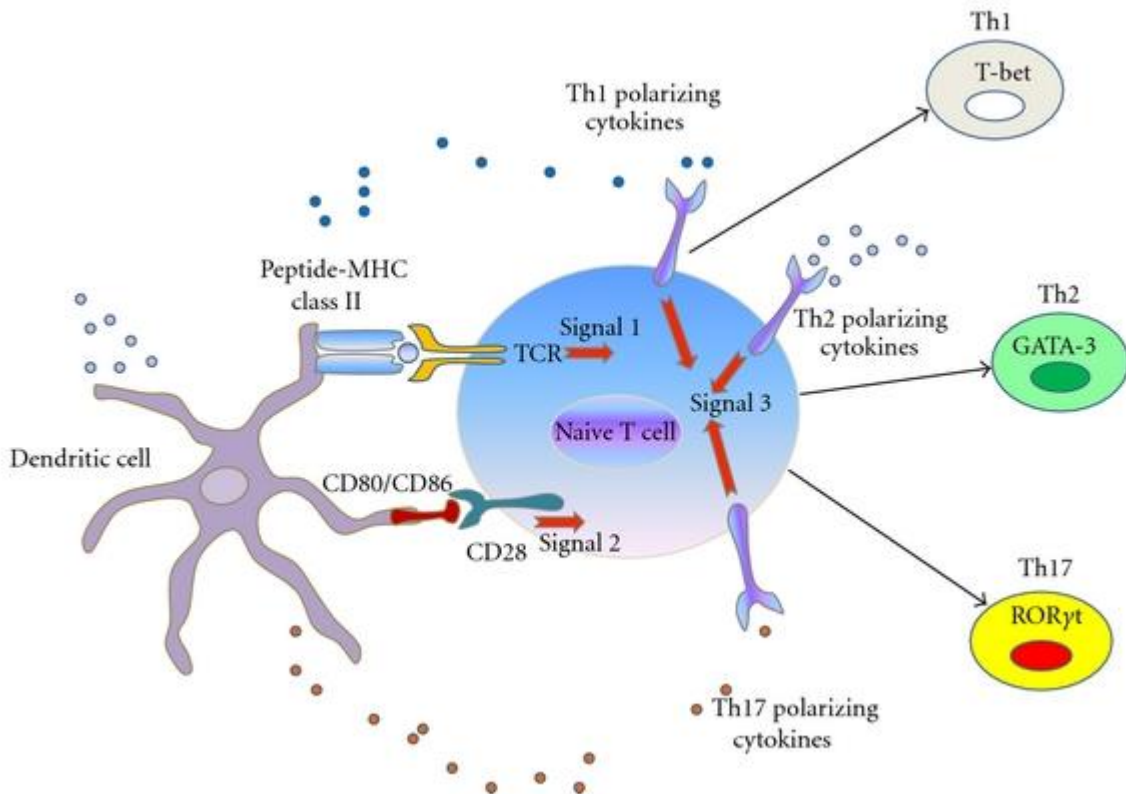


Figure 1. Processus d'activation et différenciation des lymphocytes T CD4+ naïfs vers les lignées Th1, Th2, Th17, par les cellules dendritiques. La différenciation des Th est initiée par l'interaction entre une cellule dendritique (DC) présentant l'antigène (complexe antigène /CMHII) et le TCR des Tconv naïfs (signal 1), puis la reconnaissance des molécules de co-stimulation (CD80/86 et CD28) (signal 2) et les Th s'orientent vers un type particulier en fonction des cytokines (signal 3) produites par les DC induits (Liaskou E 2012).

1.1.2. Les lymphocytes Th1

Les lymphocytes Th1 ont été définis comme des cellules productrices d'interféron- γ (IFN- γ). L'IFN- γ en association avec l'IL-12, sécrétée par les macrophages et les cellules dendritiques, permet la différenciation des Th1 (*Del Prete GF, 1991; Rogge L, 1997*). La différenciation Th1 est dépendante de la voie de signalisation JAK/STAT, par l'activation de STAT1 par l'IFN- γ et STAT4 par l'IL-12, qui favorise la transcription du facteur de transcription T-bet qui permet l'expression de l'IFN- γ et augmente l'expression de la chaîne IL-12R β 2 sur la cellule T. L'activation du récepteur de l'IL-12 potentialise la production d'IFN- γ et induit l'expression de la chaîne IL-18R α . Les lymphocytes Th1 matures peuvent alors répondre à l'IL-18 (*Lighvani AA, 2001; Szabo SJ, 2000; Afkarian M, 2002*). Les cellules dendritiques plasmacytoïdes, les cellules NK (Natural Killer) et les cellules NKT (Natural Killer T cell) semblent être impliquées dans la production précoce des interférons nécessaires pour le développement des Th1. La réponse Th1 est souvent accompagnée par la production par les lymphocytes B d'anticorps d'isotype IgG2a fixés au complément, en parallèle de l'activation des cellules NK et des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques, également producteurs d'IFN- γ . (*Romagnani S, 1997; Mosmann TR, 1996*) (Figure 2). Les Th1 coordonnent la réponse immune aux microorganismes intracellulaires, bactéries, parasites, levures et virus. Ils sont aussi associés aux réactions d'hypersensibilité retardée.

1.1.3. Les lymphocytes Th2

Les Th2 produisent de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13 (*Zheng W, 1997; Agarwal S, 1998*). Les lymphocytes Th2 permettent la commutation de classe des IgG1 et IgE, et le recrutement des éosinophiles, notamment pour l'élimination des helminthes et de différents pathogènes extracellulaires. Les cellules Th2 sont également impliquées dans des pathologies allergiques comme l'asthme (*Romagnani S, 1997; Mosmann TR, 1996*). La différenciation des Th2 initiée par les voies de signalisation activées par le TCR et le récepteur à l'IL-4 implique le facteur de transcription STAT6. Ces signaux conduisent à l'activation du facteur de transcription GATA-3, régulateur majeur de la différenciation des Th2 (*Zhu J, 2010*) ; ce facteur de transcription est capable d'induire sa propre expression, et permet la synthèse des cytokines IL-4, IL-5 et IL-13 ; c'est la démonstration d'une boucle d'amplification autocrine (Figure 2). Les cellules produisant initialement l'IL-4 ne sont pas clairement identifiées, cependant les

basophiles, éosinophiles, mastocytes et les cellules NKT sont des sources d'IL-4 (Min B, 2004). Récemment un autre facteur, le TSLP (Thymic Stromal Lymphopoietin) a également été impliqué dans la différenciation des Th2 (Zhang Y, 2012).

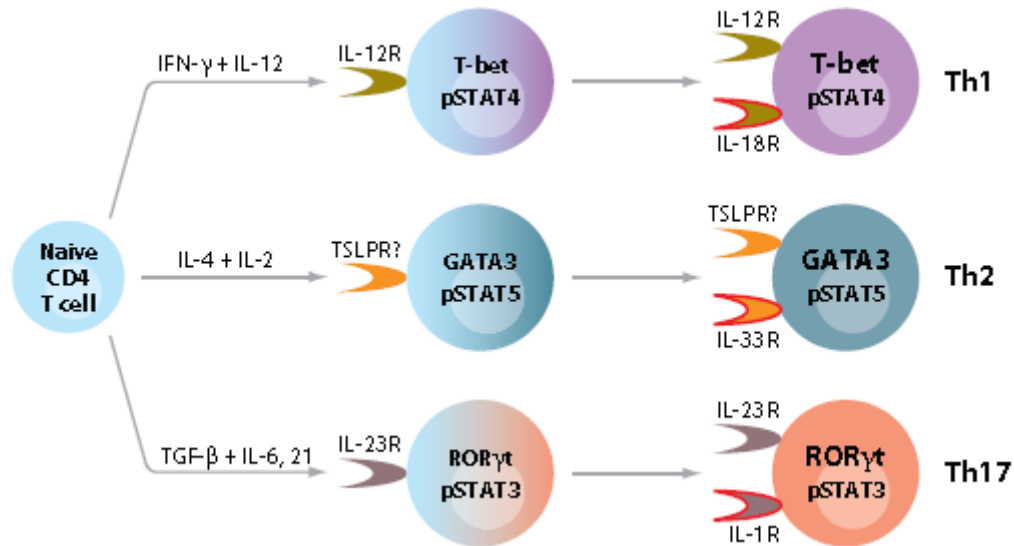


Figure 2. Modélisation de la différenciation des sous-populations de Th. Les Tconv naïfs s'activent et se différencient en plusieurs sous-types de Th ayant des fonctions différentes et sécrétant des cytokines caractéristiques. Les Th1 sont induits en présence d'IFN γ +IL-12, lesTh2 en présence IL-4 et les Th17 en présence de TGF β +IL-6,21 (dépendant du contexte, voir plus loin) (Jinfang Z *et al*, 2010).

1.1.4. Les lymphocytes Th17

De nombreuses études suggéraient que le développement de pathologies autoimmunes telles que la sclérose en plaques (SEP), le diabète auto-immun ou l'arthrite rhumatoïde résultait d'une activation incontrôlée d'effecteurs Th1 spécifiques d'antigènes du « soi ». Le rôle critique attribué aux effecteurs Th1 reposait sur l'observation d'un recrutement de cellules Th1 et non pas Th2, dans les organes cibles de la pathologie. De plus, dans les modèles murins de ces maladies, la pathologie était induite après transfert dans les souris de clones autoréactifs Th1, mais pas Th2. Par ailleurs, l'administration d'IL-12 augmente la sévérité et l'incidence de maladies comme le diabète ou l'encéphalomyélite autoimmune expérimentale (EAE ; modèle murin de SEP). A l'inverse, des souris génétiquement modifiées et rendues déficientes pour la chaîne IL-12p40 de l'IL-12, sont résistantes à ces pathologies autoimmunes. Cependant, des souris déficientes pour la chaîne IL-12p35, ayant ainsi une

perte d'expression de l'IL-12 et un défaut de différenciation des Th1, continuent de pouvoir développer une EAE (*Gran B, 2002*). De même, des souris déficientes pour l'IFN- γ , le récepteur à l'IFN- γ ou le facteur de transcription STAT1 activé par l'IFN- γ , restent sensibles à l'induction de l'EAE (*Betelli E, 2004 ; Ferber IA, 1996*). En revanche, des souris déficientes pour T-bet, le facteur de transcription initiateur de la différenciation Th1, ou pour STAT4, le facteur de transcription intervenant en aval du récepteur à l'IL-12, sont résistantes à l'EAE (*Chitnis T, 2001*). Il était difficile de concilier les conclusions de ces résultats contradictoires avec un rôle direct des lymphocytes Th1 dans ces pathologies autoimmunes. La découverte de l'IL-23 a permis de mieux comprendre certains de ces paradoxes.

1.1.4.1. Découverte des Th17

En 2000, Oppman et collaborateurs découvrent une nouvelle cytokine, l'IL-23, apparentée à la famille de l'IL-12. C'est une cytokine hétérodimérique composée d'une chaîne transductrice p19, et d'une chaîne réceptrice p40, chaîne commune au récepteur de l'IL-12 (*Oppmann B, 2000*). Il est donc apparu que les études de blocage de l'IL-12 par des anticorps dirigés contre la chaîne p40 ciblaient le récepteur à l'IL-12 mais également le récepteur à l'IL-23, d'où les résultats discordants des études sus-citées. L'étude comparative de l'induction de l'EAE sur des souris déficientes pour le gène codant pour la chaîne IL-23p19 ou pour l'IL-12p35, a permis de distinguer l'action des deux cytokines, et de démontrer que l'IL-23 est impliquée dans le développement de l'EAE (*Cua DJ, 2003 ; Murphy CA, 2003*). Par la suite, il a été montré que l'IL-23 était capable de générer des lymphocytes T producteurs d'IL-17A (*Aggarwal S, 2003*). De plus, des cellules CD4⁺ Th17 induisent l'EAE quand elles sont injectées dans des souris sauvages naïves (*Langrish CL, 2005*). Par ailleurs, le nombre de cellules productrices d'IL-17A diminue significativement dans le système nerveux central des souris déficientes pour l'IL-23p19. Deux études « princeps » proposent alors la définition d'une nouvelle population de lymphocytes effecteurs CD4⁺ producteurs d'IL-17A, les Th17, distincts des Th1 et Th2 (Figure 2) (*Harrington LE, 2005 ; Park H, 2005*). L'IL-23 permet l'expansion *in vitro* d'une population Th17 rendue préalablement déficiente pour les gènes des facteurs de transcription majeurs des Th1 et Th2 (T-bet et GATA-3) ; ceci confirme que les Th17 sont une population distincte des Th1 et Th2. Cependant, le récepteur de l'IL-23 n'étant pas exprimé sur les lymphocytes T CD4⁺ naïfs, cette cytokine n'est donc pas impliquée dans la différenciation des Th17 chez la souris (*Langrish CL, 2005*).

1.1.4.2. Différenciation des Th17 chez l'homme et la souris

La première différenciation des lymphocytes TCD4⁺ vers la lignée Th17 qui a été caractérisée est celle qui s'effectue à partir de lymphocytes T CD4⁺ naïfs en réponse à une stimulation par l'antigène et des cytokines dans les organes lymphoïdes secondaires ; ces Th17 sont des Th17 inductibles (iTh17), et leurs conditions de différenciation sont différentes entre l'humain et la souris. C'est à cette catégorie d'iTh17 que nous nous sommes intéressés, et à laquelle se réfère le terme « Th17 » dans ce manuscrit. Cependant, il convient de mentionner que très récemment, une autre sous-population de lymphocytes T CD4⁺, les nTh17, a été décrite chez la souris, qui acquiert la capacité à sécréter de l'IL-17 dans le thymus. Les nTh17 partagent de nombreuses caractéristiques avec les iTh17, en particulier l'expression du facteur de transcription ROR γ t, du marqueur d'activation et de mémoire CD44, du récepteur de chimiokine CCR6, et la capacité à sécréter de l'IL-17A et -F, et de l'IL-22 (Marks BR, 2009). On sait encore peu de choses sur les nTh17, si ce n'est que ce ne sont pas les mêmes isoformes de la kinase Akt et des complexes mTOR qui interviennent dans la différenciation des nTh17 et des iTh17 (Kim JS, 2013).

Chez la souris, la différenciation des Th17 requiert le Transforming growth factor (TGF- β) ainsi que des cytokines produites par les cellules myélo-monocytaires telles que l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF- α (Figure 3)(Bettelli E, 2008). Le TGF- β est produit par les lymphocytes T, les macrophages et les cellules dendritiques. Dans les souris déficientes pour le récepteur du TGF- β , les cellules Th17 ne sont pas générées et les souris sont résistantes à l'encéphalomyélite expérimentale autoimmune (l'équivalent murin de la sclérose en plaques) (Veldhoen M, 2006). L'IL-6 est produite par les lymphocytes B et T, les macrophages, les cellules stromales de la moelle osseuse, les fibroblastes, les kératinocytes, les cellules mésenchymateuses, ainsi que les astrocytes et les cellules endothéliales. La combinaison incluant IL-6 / TGF- β serait la plus efficace pour induire des lymphocytes Th17, car ces deux cytokines permettent l'activation des facteurs de transcription ROR γ t et ROR α (« Retinoid-Related Orphan Receptor »), principaux marqueurs des cellules Th17 murines (Ivanov II, 2006 ; Zhou L, 2007 ; Kimura A, 2007).

L'IL-1 β est synthétisée majoritairement par les monocytes activés et en plus faible quantité par les cellules dendritiques activées, dérivées de monocytes.

Le Tumor necrosis factor ($TNF-\alpha$) est exprimé par un grand nombre de cellules telles que les macrophages, les lymphocytes B et T, les mastocytes et les cellules NK. L'IL-1 β et le $TNF-\alpha$ agissent de manière synergique avec l'IL-6 et le TGF- β pour augmenter la différenciation des Th17 mais ne sont pas essentielles. Il y a une autre alternative décrite qui est la combinaison IL-21 /TGF- β (Korn T, 2007). En effet, des modèles murins KO pour l'IL-6 présentent une population de LT majoritairement constituée de LT Foxp3+ potentiellement de type régulateur (cf. plus loin) ; la mise en culture de ces cellules dans un environnement riche en IL-21 /TGF- β , induit des Th17 ; l'IL-21 étant elle-même sécrétée par les Th17, jouerait un rôle autocrine (Korn T, 2007 ; Hirota K, 2007).

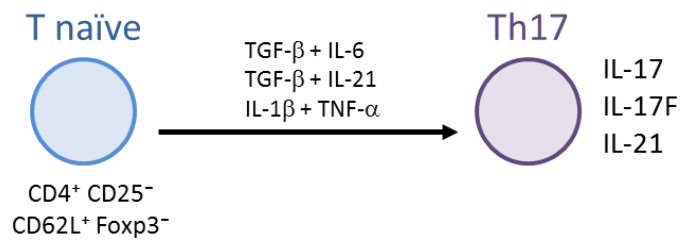


Figure 3. Conditions de polarisation des Th17 *in vitro* chez la souris (Korn T, 2009)

Chez l'homme les données concernant la différenciation des Th17 ont été controversées dans un premier temps. De fait, les premières études montrent qu'un microenvironnement pro-inflammatoire constitué de l'IL-1 β induit des Th17 avec une potentialisation en présence d'IL-6 et que contrairement à la souris, le TGF- β aurait une action négative (Acosta-Rodriguez EV, 2007 ; Wilson NJ, 2007). Ces résultats ont été contestés en raison de l'absence dans ces études, de véritables précurseurs naïfs et de la présence de TGF- β dans le sérum utilisé dans les milieux de culture. De nouvelles expériences ayant corrigé les biais précédents (utilisation de sang de cordon pour l'isolement de précurseurs naïfs, et de milieu de culture sans sérum), montrent que la combinaison du TGF- β avec une cytokine pro-inflammatoire l'IL-21 (Yang L, 2008), ou avec IL-1 β et IL23 ou IL-6 (Manel N, 2008 ; Volpe E, 2008) ou IL-21 (Manel N, 2008), promeut une polarisation Th17. Enfin, il est établi que l'IL-23 est essentielle pour la survie des lymphocytes Th17 et le maintien du phénotype Th17 (Figure 4) (Wilson NJ, 2007).

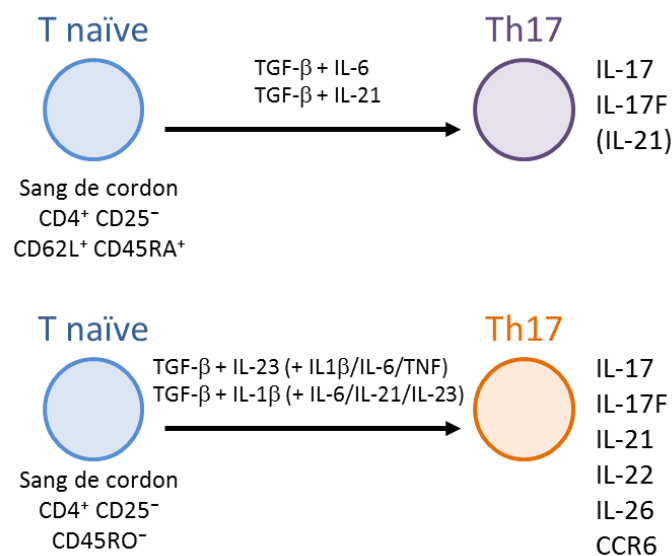


Figure 4. Conditions de polarisation des Th17 *in vitro* chez l'homme (Korn T, 2009)

Par ailleurs, les travaux de Cosmi et collègues suggèrent que les Th17 humains sont différenciés à partir de précurseurs naïfs CD4+CD161+, issus du sang de cordon ombilical ou du thymus, en absence de TGF- β exogène, mais en présence d'IL-1 β et d'IL-23 (Cosmi L, 2008), et montrent un profil d'expression de gènes (RORC2, CCR6, IL-1R1 et IL-23R) caractéristique du phénotype Th17 en comparaison de la population CD4+CD161-. Les cellules CD4+CD161+CCR6+ issus d'adulte sains produisent plus d'IL-17A (Figure 5). Ce même groupe propose que le TGF- β n'est pas impliqué directement dans le développement des Th17 mais favorise leur expansion relative en inhibant les cellules Th1 (Santarlaschi V, 2009). Enfin, d'autres études montrent que différents facteurs du microenvironnement cellulaire peuvent favoriser la différenciation des Th17. Des études montrent que la prostaglandine E2 (PGE2) favorise l'expansion des Th17 humains en augmentant l'expression des récepteurs de l'IL-23 et de l'IL-1 β sur les cellules T naïves. De plus PGE2 agirait en synergie avec l'IL-23 *via* une phosphorylation accrue du facteur de transcription STAT3 (Chizzolini C, 2008 ; Boniface K, 2009 ; Napolitani G, 2009).

Différents facteurs de transcription contrôlent la différenciation des Th17. Une première étude montre que le facteur de transcription ROR γ t, un récepteur nucléaire orphelin, est exprimé par une population productrice d'IL-17A, chez la souris. De plus, des LT naïfs issus de souris déficientes pour ce facteur de transcription, et mis en culture en présence de TGF- β /IL-6, présentent une diminution significative des LT produisant de l'IL-17, alors que dans les cas de surexpression du gène ROR γ t, la réponse Th17 est améliorée (Ivanov II, 2006 ; Yang XO, 2008). Cependant, une étude plus récente a montré que dans les souris déficientes en ROR γ t, il n'y a pas une inhibition complète d'expression des cytokines associées aux Th17, ce qui a amené à l'identification d'un autre facteur de transcription ROR α (Yang XO, 2008).

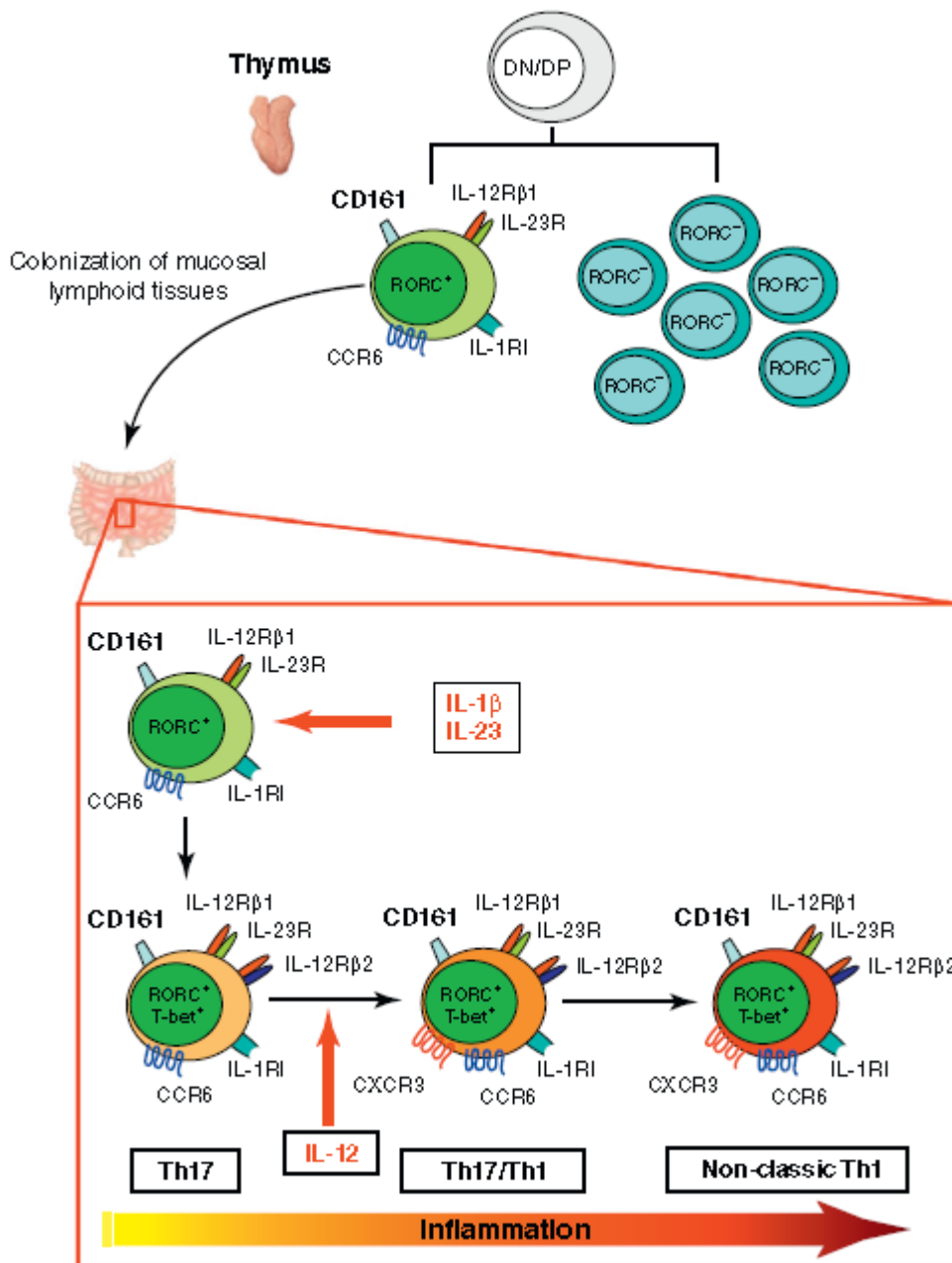


Figure 5. Modélisation de la différenciation des précurseurs naïfs de Th17 vers les phénotypes effecteurs mémoires Th17/Th1. Les précurseurs des Th17 proviennent d'une sous-population originaire du thymus ; ces cellules sont CD161+ et expriment le facteur de transcription RORC, CCR6, le récepteur à IL-1 (IL-1R) et le récepteur à l'IL-23 (IL-23R) mais pas l'IL-17A. Pendant l'ontogenèse, ces cellules migrent en périphérie pour atteindre les tissus lymphoïdes de la muqueuse, notamment l'intestin. En présence d'inflammation (IL-1β et IL-23), les cellules CD161+CCR6+ acquièrent la capacité d'exprimer et sécréter l'IL-17A. Cependant, en présence d'IL-12 ces Th17 peuvent produire de l'IFNγ en plus de l'IL-17A ; ce qu'on appelle les Th1 non classique (Annunziato, 2012).

Chez l'homme, l'analogue de ROR γ t, RORC2 est impliqué dans la différenciation des Th17 par des expériences de surexpression de ce gène inséré dans un vecteur lentiviral, dans des cellules TCD4⁺ naïves humaines, mises ensuite en culture avec de IL-1 β /IL-6/IL-23, à la suite de quoi ces cellules montrent une expression stimulée de l'IL-26, CCR6, IL-17A/F associées au phénotype Th17, et une régulation négative des cytokines Th1 (*Manel N, 2008 ; Crome SQ, 2009*). Il a été montré que le TGF- β est nécessaire à l'expression du facteur de transcription RORC2 (*Burgler S, 2009*). De plus, les cellules CD4⁺CCR6⁺CD161⁻ transfectées par RORC2 surexpriment CD161 et produisent de l'IL-17A. (*Maggi L, 2010*). L'expression des facteurs de transcription RORC2 et ROR α , est activée par le facteur de transcription STAT3, qui n'est pas spécifique des Th17 mais qui joue un rôle important dans la différenciation des Th17 (*Yang XO, 2007 ; Mathur AN, 2007 ; Durant L, 2010*). En effet, le syndrome d'hyper-immunoglobuline E (IgE) associé à une mutation dans le gène codant pour STAT3, est associé à une différenciation altérée de la sous-population Th17, et à une production diminuée d'IL-17A et d'IL-22 (*Ma CS, 2008 ; Milner JD, 2008*). Enfin, les facteurs de transcription IRF4 (interferon-regulatory factor), BATF et Runx1 sont également requis pour la différenciation des Th17 (*Brüstle A, 2007 ; Hirahara K, 2010 ; Ciofani M, 2012*).

Différentes cytokines empêchent le développement des Th17. L'IFN- γ et l'IL-4 préviennent la différenciation des Th17, mais n'ont pas d'effet sur les Th17 différenciées (*Harrington LE, 2005 ; Park H, 2005*). L'IL-27, initialement décrite comme une cytokine « pro-Th1 », a été décrite comme cytokine suppressive de la différenciation Th17 via l'activation de STAT1 et/ou l'inhibition de l'expression de ROR γ t (*Batten M, 2006 ; Stumhofer JS, 2006*). L'IL-2, facteur de croissance des lymphocytes T activés et des Treg, contrarie la différenciation Th17 via l'activation de STAT5 (*Laurence A, 2007*), et il a été montré que la déficience en IL-2 induit l'augmentation de l'infiltration de la peau par des cellules produisant de l'IL-17 dans un modèle murin d'autoimmunité (*Lohr J, 2006*). L'IL-10 et l'IL-25 sont aussi capables d'inhiber les réponses immunitaires associées aux Th17, via un effet indirect mettant en jeu les cellules myélo-monocytaires, cellules dendritiques et macrophages. Par exemple, il a été montré que la déficience en IL-10 chez la souris conduit à une augmentation de la production d'IL-12 et d'IL-23 par les cellules myélo-monocytaires, et favorise les maladies chroniques inflammatoires du tube digestif dépendantes des Th17 (*Yen D, 2006*) ; de même, la déficience en IL-25 chez la souris résulte dans un niveau systémique important d'IL-23 associé à une augmentation de l'infiltration tissulaire par des lymphocytes T producteurs d'IL-17, TNF- α et IFN- γ dans le CNS, et l'aggravation de l'encéphalomyélite expérimentale autoimmune

(Kleinschek MA, 2007). Par ailleurs, il a été montré que l'oxyde nitrique (NO) inhibe la différenciation des Th17 murins (Niedbala W, 2011).

1.1.4.3. Phénotype et caractérisation des Th17

Les lymphocytes Th17 expriment différents récepteurs pouvant être utilisés comme marqueurs de surface pour caractériser ces cellules qui peuvent être hétérogènes sur le plan fonctionnel. Acosta-Rodriguez et collègues montrent qu'une population de lymphocytes T mémoires producteurs d'IL-17A et exprimant RORC2, exprime à sa surface les récepteurs de chimiokines CCR6 et CCR4 (Acosta-Rodriguez EV, 2007 ; Singh SP, 2008). Le marqueur CCR6 est également exprimé par les lymphocytes B et certaines cellules dendritiques. Les lymphocytes Th17 CCR6+ CCR4+ humains mais pas les CCR6+ CCR4-, suppriment les réponses immunitaires des lymphocytes T CD8+ (Figure 6) (Zhao F, 2012). De plus, l'expression de CCR6 associé au CXCR3 permet de discriminer les Th17 mémoires humains (CCR6+CXCR3-) des Th1 (CCR6-CXCR3+) (Hirota K, 2007 ; Annunziato F, 2007 ; Acosta-Rodriguez EV, 2007). L'expression de CCR2 en l'absence de CCR5 (Yang D, 1999 ; Sato W, 2007) est également représentative des Th17.

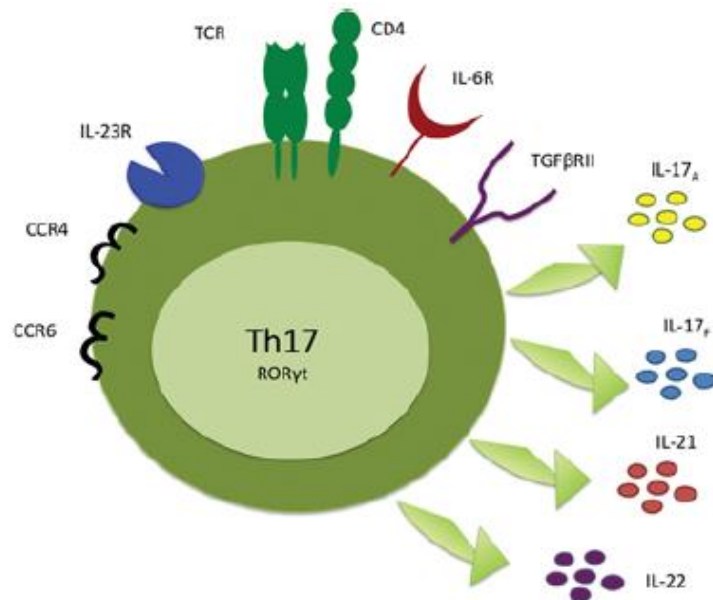


Figure 6. Phénotype des T effecteurs mémoires CD45RO+ Th17. Les Th17 se caractérisent par le facteur de transcription ROR γ t, au niveau membranaire par l'expression de CCR6, CCR4, IL-23R, IL-6R et par la sécrétion d'IL-17A/F, IL-21, IL22 (d'après Sallusto F and al, 2009).

Par la suite, un autre récepteur exprimé par les Th17 a été identifié, le CD161 initialement observé sur une population de cellules NK (Cosmi L, 2008). Comme nous l'avons exposé

précédemment les effecteurs mémoires Th17 CD4⁺CD45RO⁺CCR6⁺CD161⁺ circulants sont issus de précurseurs naïfs CD4⁺ CD161⁺, et la culture *in vitro* des CD4⁺CD161⁺ naïves en présence d'IL-1 β / IL23 stimulent la sécrétion d'IL-17A. Cette étude est corroborée par celle de Kleinschek et collègues, qui montre de surcroît que des cellules Th17 CD4⁺CD161⁺CCR6⁺ sont retrouvées de façon physiologique dans la circulation sanguine et au sein du parenchyme intestinal chez les individus sains et les patients atteints de la maladie de Crohn. Par ailleurs, il a été montré que cette population de Th17 est principalement CD45RO⁺CCR6⁺. L'exposition à des cytokines inflammatoires comme l'IL-23, active ces cellules qui deviennent des Th17 agressives pro-inflammatoires participant à l'inflammation locale et systémique à l'origine de la destruction tissulaire (Kleinschek MA, 2009).

Plus récemment, notre équipe a contribué à la description d'une nouvelle sous-classe de Th17 qui expriment le marqueur CD90, et sont contenues dans les cellules CD4⁺CD45RO⁺CCR6⁺CD161⁺. Ces cellules expriment les mêmes cytokines que la lignée Th17 : IL-17A, IL-6, CCL20, TNF- α et GM-CSF, et l'IL-22 à un niveau plus important, et présentent le même profil moléculaire (RORC2⁺) (Guillot-Delost M, 2012).

Un autre récepteur, intracellulaire, semble être impliqué dans la différenciation des Th17, l'AHR (« aryl-hydrocarbon receptor »), le récepteur pour la dioxine. La présence d'acides aminés aromatiques, agonistes naturels de l'AHR dans le milieu de culture, augmente la différenciation des Th17. Les souris déficientes pour ce récepteur montrent un développement restreint de la population Th17 et une absence de production d'IL-22 (Veldhoen M, 2008 ; Veldhoen M, 2009). Une autre étude a montré que l'activation du récepteur AHR en fonction du ligand, contrôle soit la différenciation des Th17, soit celle des lymphocytes Treg (Quintana FJ, 2008).

Les lymphocytes Th17 humains et murins produisent différentes cytokines et chimiokines, parmi lesquelles deux cytokines de la famille de l'IL-17, l'IL17A et l'IL-17F qui ont une forte homologie protéique (50%) ; l'analyse en cytométrie en flux (CMF) du marquage intracellulaire de la production d'IL-17A/F peut être utilisée en combinaison des marquages membranaires décrits dans le paragraphe précédent, pour identifier les Th17 au sein d'une population cellulaire hétérogène. L'IL-17A est une cytokine clonée sous le nom de CTLA-8 à partir d'une banque d'ADNc de lymphocytes T (Rouvier E, 1993 ; Yao Z, 1995). L'IL-17F humaine a été clonée en 2001 (Starnes T, 2001). Des études montrent l'existence

d'hétérodimères formés de l'IL-17A et l'IL-17F, qui ont une activité intermédiaire comparée à celle des homodimères respectifs (*Chang SH, 2007*). Des cellules CD4⁺ humaines activées de manière polyclonale par des anticorps dirigés contre le CD3 et le CD28, et dans des conditions de cultures favorisant la sécrétion d'IL-17A, produisent de l'IL-17A et de l'IL-17F sous forme d'homodimères ou d'hétérodimères. Le complexe IL-17A/F est donc bien une forme naturelle de la cytokine (*Wright JF, 2007*). L'IL-17A se fixe sur un récepteur homodimère de l'IL-17RA, exprimé sur les cellules épithéliales, endothéliales et les fibroblastes. Récemment, il a été rapporté que les deux cytokines partagent le même récepteur composé des chaînes IL-17RA et IL-17RC (*Toy D, 2006*). L'IL-17A et l'IL-17F induisent l'expression de diverses cytokines pro-inflammatoires et chimiokines par les cellules exprimant leur récepteur. Initialement, L'IL-17A a été montrée comme inductrice de l'expression de l'IL-6 et de l'IL-8 par les fibroblastes (*Yao Z, 1995*). D'autres études ont montré son implication dans la production de facteurs de croissance, de chimiokines et de métalloprotéases, ainsi que sa capacité à mobiliser, recruter et activer les polynucléaires neutrophiles. D'autres cellules sont également capables de sécréter de l'IL-17, parmi lesquelles des lymphocytes T $\gamma\delta$, des lymphocytes T CD8⁺, des cellules NKT, des cellules NK, des polynucléaires neutrophiles et éosinophiles.

Les Th17 peuvent également sécréter un large répertoire d'autres cytokines telles que l'IL-21 (*Nurieva R, 2007 ; Harrington LE, 2005 ; Durant L, 2010*) (effet autocrine sur la génération des lymphocytes Th17 en présence de TGF- β), l'IL-22 (*Chung Y, 2006*), l'IL-26 (pas d'homologue murin), l'IL-6 (*Eyerich S, 2009 ; Zheng Y, 2007 ; Geri G, 2011*), le TNF- α et le GM-CSF (*Lubberts E, 2008 ; Pelletier M, 2010 ; Codarri L, 2011 ; El-Behi M, 2011*). Les Th17 sécrètent également la chimiokine CCL20 (MIP-3 α), ligand du récepteur CCR6. CCL20 est exprimée par les tissus épithéliaux, y compris pulmonaires, et facilite la migration des cellules immunes dans ces tissus (*Williams IR, 2006 ; Demoor T, 2011 ; Botelho FM, 2012*). L'expression par les Th17 du ligand CCL20 et de son récepteur peut indiquer que les Th17 régulent leur propre recrutement dans les tissus enflammés par un mécanisme paracrine. De plus, CCL20 est aussi induite par l'IL-17A au niveau tissulaire, ce qui indique que l'IL-17A pourrait avoir un rôle important dans le maintien de l'inflammation tissulaire provoquée par les Th17 (*Dong C, 2008*).

1.1.4.4. Rôle physiologique des Th17

D'une manière générale, la réponse immune protectrice est de type Th1 lors d'une infection provoquée par des agents pathogènes intracellulaires, et de type Th2 quand il s'agit d'organismes extracellulaires. Cependant les lymphocytes Th17 jouent également un rôle dans la défense de l'hôte contre certaines infections fongiques et bactériennes extracellulaires (Peck A, 2010), principalement via la mobilisation et l'activation de phagocytes parmi lesquels les polynucléaires neutrophiles, mais aussi par la stimulation de la production de peptides antimicrobiens par les cellules épithéliales (Matsuzaki G, 2007). La réponse immunitaire est particulièrement importante au niveau de l'épithélium et de la surface des muqueuses, en raison des récepteurs aux chimiokines et de cytokines effectrices qu'ils expriment (Ouyang W, 2008). En effet, des cellules épithéliales issus du poumon, de la peau ou encore de l'intestin et d'autres types cellulaires (cellules endothéliales, fibroblastes...) possèdent des récepteurs (IL-17RA, RC) sensibles aux cytokines de la lignée Th17 (IL-17, IL-22, IL-26) qui les stimulent pour produire la chimiokine CXCL8 conduisant au recrutement des neutrophiles dans ces tissus (Figure 7).

Un certain nombre de pathogènes sont recensés comme inducteurs de réponses de type Th17 chez la souris, notamment des bactéries gram positive (*Propionibacterium acnes*), des bactéries gram négative (*Citrobacter rodentium* et *Klebsiella pneumoniae*) des mycobactéries (*Mycobacterium tuberculosis*) et certains champignons dont *Candida albicans* (Infante-Duarte C, 2000 ; Chung DR, 2003 ; Huang W, 2004 ; Khader SA, 2007 ; Aujla SJ, 2008). En effet, des modèles murins déficients pour des gènes essentiels à la fonction des lymphocytes Th17, montrent une susceptibilité élevée à un type d'infection bactérienne. Les souris déficientes pour le gène de l'IL-23p19, ou de l'IL-17A sont très sensibles à une infection à bactérie gram négatif : *K. pneumoniae* (Happel KI, 2005 ; Aujla SJ, 2008) et les souris déficientes pour le gène de l'IL-17RA sont susceptibles à des infections par des champignons type *C. Albicans* (Huang W, 2004). Chez des patients atteints de Syndrome d'hyper IgGE, chez lesquels le gène STAT3 est muté ce qui empêche une différenciation des Th17, l'incidence des infections aux pathogènes *C. Albicans* ou *S aureus* est élevée (Mangan PR, 2006 ; Milner JD, 2008 ; Ma CS, 2008).

A côté de leur action bénéfique contre les microbes, la réponse effectrice des sous-populations Th17, en association avec les Th1, contribue aux dommages tissulaires associés à l'inflammation via le recrutement et l'activation des macrophages et des neutrophiles.

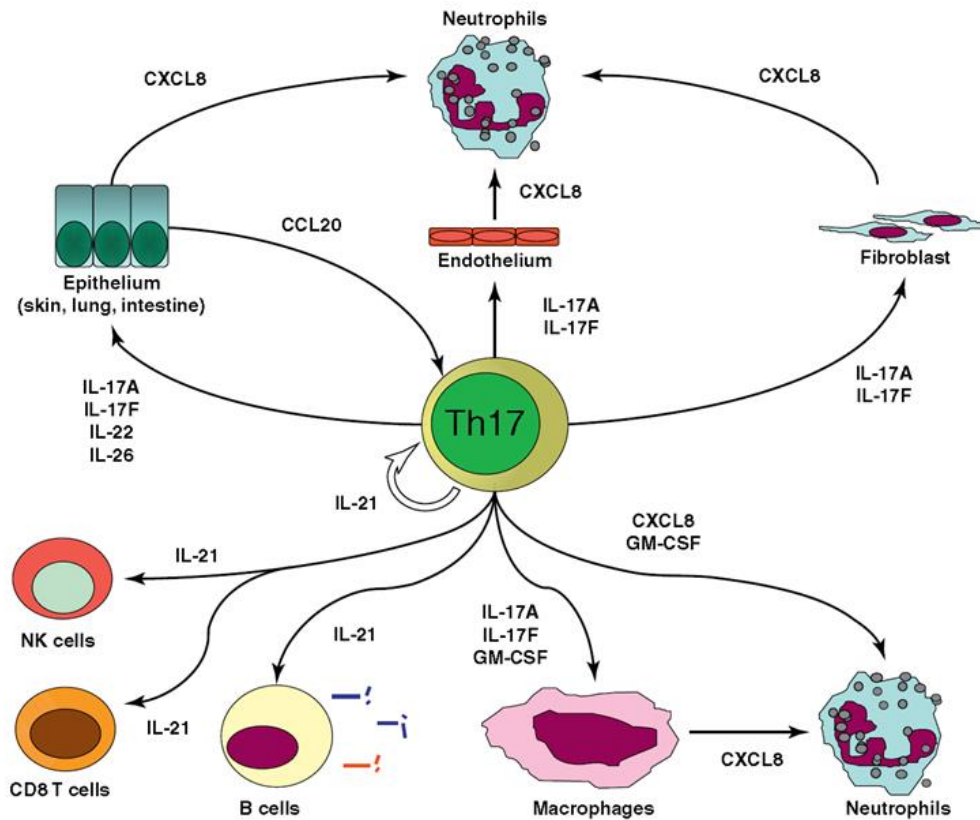


Figure 7. Production de cytokines et chimiokines par les Th17. Les Th17 produisent des cytokines et chimiokines qui agissent sur des cellules immunes et non-immunes. L'IL-17A/F induit la production de CXCL8 par les cellules épithéliales, cellules endothéliales et les fibroblastes. Or, CXCL8 est crucial pour le recrutement des neutrophiles au niveau des sites inflammatoires. En outre, l'IL-22 et 26 ont le même effet que l'IL-17 ; ces cytokines peuvent induire la production de CCL20 par les cellules épithéliales. CCL20 à son tour recrute les Th17. L'IL-21 active les NK, TCD8+ et cellules B mais a également un effet autocrine sur les Th17 (Annunziato F, 2012).

1.1.4.5. Implications des Th 17 dans les maladies

Sur la base d'études de pathologies expérimentales dans des modèles animaux, de nombreux travaux ont permis de montrer l'implication des lymphocytes Th17 et des cytokines associées dans diverses maladies auto-immunes ou inflammatoires chroniques dont les principales sont le psoriasis, l'arthrite rhumatoïde, la sclérose en plaques, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et l'asthme ; de plus les Th17 jouent un rôle bénéfique ou délétère selon les tumeurs (Figure 8) (*Kikly K, 2006 ; Zhang Z, 2006 ; Hirota K, 2007 ; Zheng Y, 2007*).

Comme il a été indiqué précédemment, les récepteurs (IL-17RA, RC) sont aussi bien exprimés par les cellules hématopoïétiques que des cellules non immunes (Figure 7). Au niveau du site inflammatoire, les lymphocytes Th17 vont induire la production de diverses chimiokines dont CXCL8. CXCL8 est responsable de l'arrivée de nombreux LT effecteurs et des polynucléaires neutrophiles au niveau du tissu d'intérêt. La combinaison de l'IL-1 β , le TNF- α et IL-17 est génératrice de CCL20, un puissant chimio-attractant pour les Th17, par le récepteur CCR6 (*Annunziato F, 2007*). Une boucle d'amplification est mis en place et le système est perturbé, c'est l'inflammation chronique (Figure 7).

Dans le modèle murin de sclérose en plaques, les souris déficientes pour le gène de l'IL-17 (*Yang XO, 2008*) présentent un moindre recrutement des neutrophiles dans les sites inflammatoires alors que les souris déficientes pour le gène codant l'IL-23 sont protégées des atteintes du système nerveux central (*Cua DJ, 2003*). De même les souris déficientes pour l'IL-17 sont résistantes au développement de l'arthrite induite par injection de collagène (*Nakae S, 2003*).

De façon identique, chez les patients développant une maladie auto-immune (psoriasis, sclérose en plaques), il est constaté un accroissement des réponses de type Th17 avec une augmentation de la production d'IL-17 qui est directement corrélée à la sévérité de la maladie (*Ishizu T, 2005 ; Kirkham BW, 2006 ; Wolk K, 2006*). La réponse Th17 induit la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules de structure. En effet, la signalisation initiée par le récepteur à l'IL-17 induit des facteurs pro-inflammatoires comme l'IL-6, l'IL-1 β , le TNF- α , IL-8 et des métalloprotéinases (MMP) qui détruisent la matrice extracellulaire (Figure 8) (*Park H, 2005*).

Dans le cas de la polyarthrite rhumatoïde, les fibroblastes et les synoviocytes issus de patients produisent de l'IL-6 *in vitro* (Chabaud M, 1998). Dans des modèles murins d'arthrite rhumatoïde, les cellules du liquide synovial produisent du CCL20 et les Th17/IL17-A+ expriment majoritairement le marqueur CCR6 qui est le récepteur de cette chimiokine. Les expériences de migration transmembranaire *in vitro* révèlent que seules les cellules CD4+CCR6+IL-17A+ issus des synoviocytes articulaires peuvent migrer en présence de CCL20. Dans la même étude il a été établi une forte corrélation entre la production de CCL20 et les taux d'IL-17 dans les synoviocytes issus des articulations des souris et patients atteints de la maladie. De plus, le traitement des souris par des anticorps bloquant CCR6 inhibe le développement de l'arthrite. Ces données nous démontrent que le recrutement des cellules Th17/IL-17A+/CCR6+ au niveau du site inflammatoire (articulations) se fait par l'intermédiaire de la chimiokine CCL20 produite dans le microenvironnement pathologique (cellules synoviales) (Hirota K, 2007). Au final, le récepteur CCR6 est primordiale à la fonction des cellules Th17, et il peut être utilisé comme marqueur membranaire dans l'identification des Th17 lorsqu'il est associé à d'autres molécules.

Les maladies inflammatoires de l'intestin sont aussi associées aux cellules Th17. De nombreuses études ont montré l'implication de ces cellules dans la maladie de Crohn. Cette pathologie était initialement associée aux cellules Th1. En effet de nombreuses observations indiquaient la présence d'IL-12 et d'IFN- γ au niveau de la muqueuse gastrique ou des cellules de la paroi intestinale des patients (Parronchi P, 1997 ; Berrebi D, 1998). Ces pathologies sont caractérisées par un emballement de la réponse immunitaire chez des sujets ayant une prédisposition génétique (Barrett JC, 2008). Une étude montre une association entre le gène de l'IL-23R, principalement exprimé sur les Th17, et les gènes de susceptibilité de la maladie de Crohn (Duerr RH, 2006). Dans un modèle murin de colite inflammatoire, les souris déficientes pour l'IL-23p19 ou l'IL-12/IL-23p40, sont protégées contre le développement de la maladie alors que les souris déficientes pour l'IL-12p35 ne le sont pas, montrant ainsi le rôle important de l'IL-23 dans cette pathologie (Kullberg MC, 2006). Cependant, des cellules Th17 productrices d'IFN-g ont été identifiées au niveau du site inflammatoire, ce qui suggère que l'IFN-g ne permet pas toujours d'inhiber la production d'IL-17 mais peut au contraire contribuer aux fonctions inflammatoires et pathogènes des cellules Th17 (Annunziato F, 2007 ; Brand S, 2009).

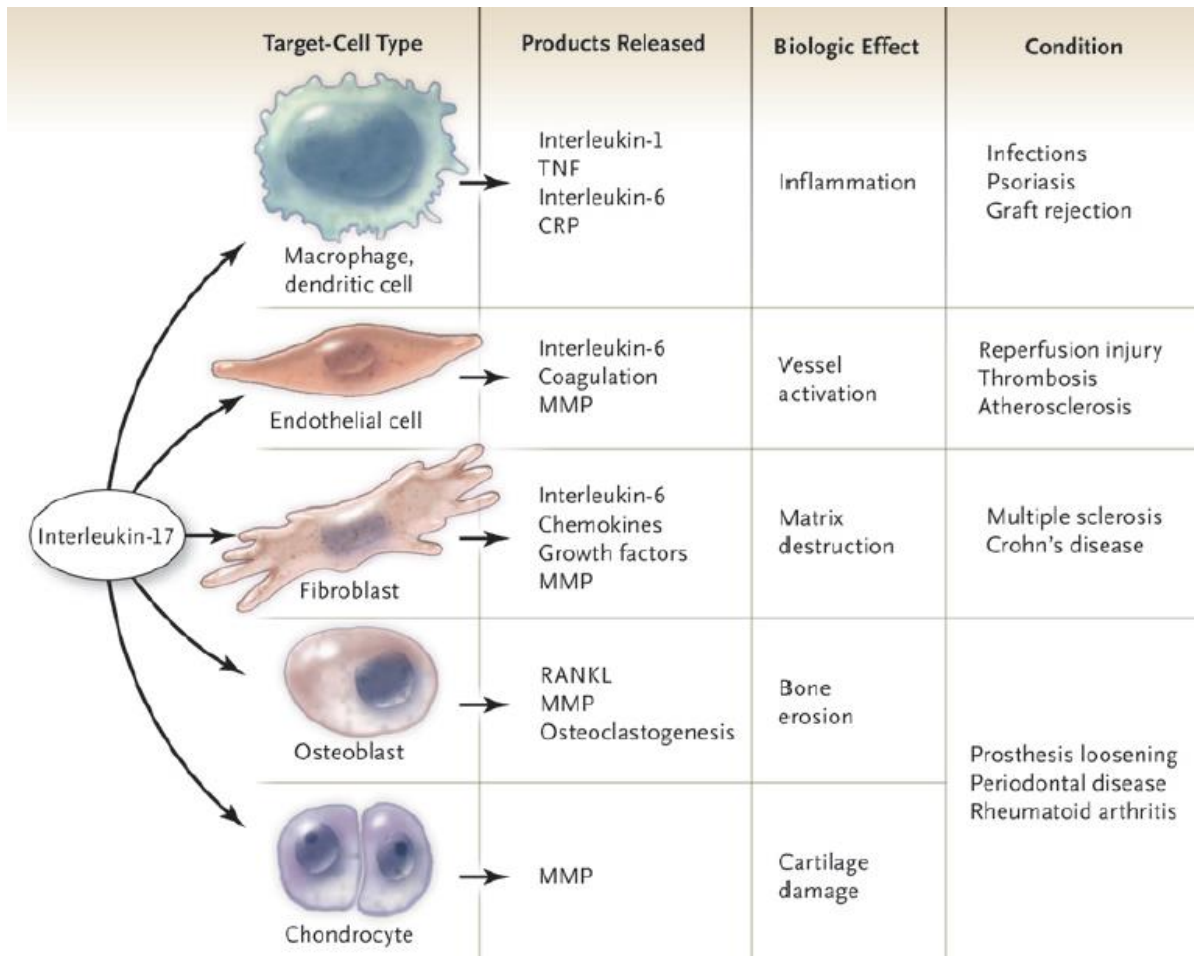


Figure 8. IL-17 et son implication dans diverses pathologies auto-immunes et inflammatoires chroniques
(Miossec P, 2009)

1.1.4.6. La réponse immunitaire des Th17 dans le poumon

L'IL-17A/F et 22 stimulent la production de CXCL8, CXCL1, CXCL5, IL-6, GM-CSF et GM-CSF par les cellules épithéliales du poumon. Ces facteurs sont responsables de l'expansion des neutrophiles à partir de la moelle osseuse mais aussi de leur survie et en particulier leur recrutement au sein des voies respiratoires. Ceci souligne l'importance de la réponse adaptative médiée par les lymphocytes Th17 dans la régulation de l'inflammation et l'immunité pulmonaire (Aujla SJ, 2007 ; Aujla SJ, 2008 ; Nembrini C, 2009). Une étude sur des souris exposées à un pathogène *Mycobacterium tuberculosis*, démontre un rôle protecteur des Th17 dans les infections pulmonaires, suite à la vaccination par le BCG. Des chimiokines sont produites et recrutent rapidement des neutrophiles au niveau du poumon pour l'éradication du pathogène (Khader SA, 2007). Les Th17 privilégient et renforcent la réponse des cellules de l'immunité innée. En dehors de leur rôle protecteur anti-infectieux au niveau des voies

respiratoires, les Th17 sont également associés au développement de maladies inflammatoires pulmonaires, l'asthme, la BPCO et la fibrose kystique. Ces maladies sont caractérisées par un recrutement massif de polynucléaires neutrophiles dans les voies aériennes pulmonaires (Linden A, 2005). Les neutrophiles sécrètent des protéases (MMP) dans le poumon impliquées dans le remodelage tissulaire qui est à l'origine de l'insuffisance respiratoire. Les études *in vitro* à partir de cellules épithéliales pulmonaires humaines ou murines, ont en commun la mise en évidence de la production de chimiokines (cités précédemment) recrutant les neutrophiles par les Th17 et la formation de molécules favorisant la polarisation Th17 dans le poumon (Figure 9). Une boucle d'amplification se met en place avec l'auto-entretien du processus d'inflammation liée au recrutement continu des neutrophiles et des Th17 dans le poumon, l'inflammation chronique est établie (Dragon S, 2007 ; McKinley L, 2008).

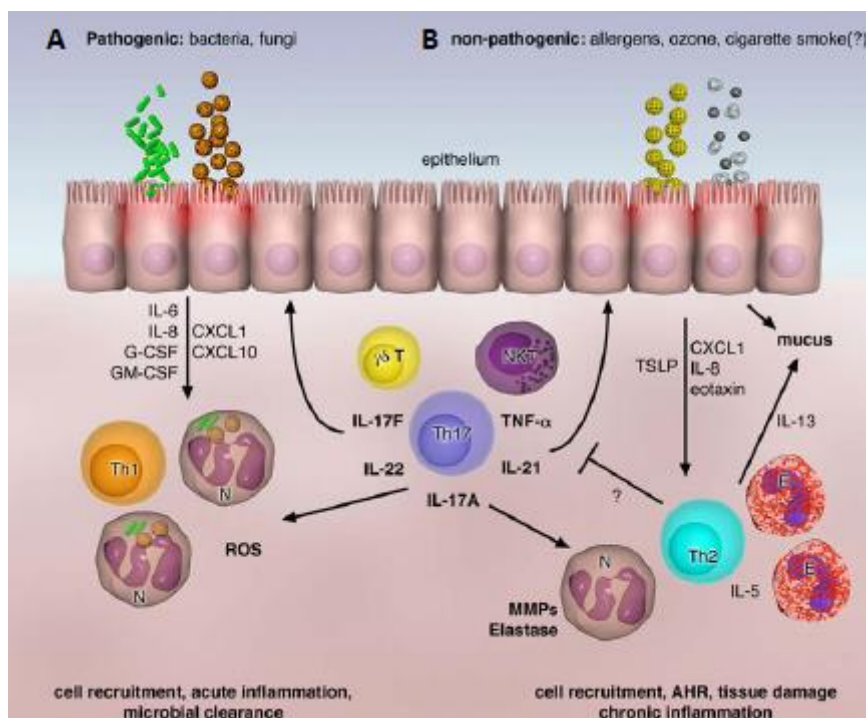


Figure 9. Les réponses immunitaires Th dans le poumon. A : Infections dépendant d'un pathogène ; B : Affections non pathogéniques (adapté de Nembrini C and al, 2009)

1.2. Régulation négative des réponses immunes Teffectrices

Le contrôle de l'auto réactivité des lymphocytes Teffecteurs (Teff) vis-à-vis de l'organisme commence au cours de la sélection thymique, par induction de l'apoptose des thymocytes autoréactifs les plus affins, c'est l'induction de la tolérance centrale. D'autres mécanismes de sélection génèrent des lymphocytes T dits « régulateurs » et ce dès la vie fœtale, comme il a été démontré chez l'homme (*Darrasse-Jèze G, 2005*). Initialement, il a été décrit 3 catégories de lymphocytes Treg (Treg) : les Treg naturels (nTreg), et les Treg issus de la différenciation des T CD4+ naïfs conventionnels (iTreg) qui se subdivisent en Treg induits (Th3) et lymphocytes régulateurs de type1(Tr1). Ces Treg assurent la tolérance aux antigènes du soi en périphérie par suppression des Teff spécifiques.

1.2.1. Découverte des lymphocytes T régulateurs naturels (nTreg)

Le concept d'immunosuppression a été proposé pour la première fois dans les années 1970, par RK Gershon qui avait proposé que des « lymphocytes T supresseurs » pourraient inhiber les fonctions médiatrices d'autres Teff, et par conséquent, induire la tolérance immunitaire notamment lors de la discrimination entre le soi et le non-soi. L'existence d'une telle population a été sujet à controverse et a été abandonnée en raison du manque de caractéristique et d'un postulat erroné sur le mode d'action de ces cellules dans leur description par RK Gershon (*Gershon RK, 1972*). Puis le concept est réapparu dans les années 1990, grâce aux travaux de Sakaguchi et al qui démontrent que le transfert adoptif d'une population de LTCD4+ déplétée en cellules LTCD4+CD25+ (CD25= Récepteur à l'IL-2) à des souris immunodéprimées (nude) induit diverses pathologies auto-immunes (gastritis, insulitis, polyarthritides...) (*Sakaguchi S, 1995*). En revanche, l'injection simultanée de la population LTCD4+ avec les cellules déplétées LTCD4+CD25+ prévient le développement des maladies. Les divers travaux qui ont suivi sur la caractérisation phénotypique et fonctionnelle de ces cellules, ont confirmé leur rôle dans la prévention de l'auto-immunité, et le maintien de l'homéostasie immunitaire par suppression des Teff autoréactifs vis-à-vis des antigènes du soi, et ont amené à les rebaptiser « Lymphocytes T régulateurs ».

1.2.2. Origine et caractérisation des nTreg

Les Treg originaires du thymus sont sélectionnés via la présentation des antigènes du soi, sont appelés Treg naturels (nTreg), et se distinguent de ceux induits en périphérie ou iTreg. Chez l'homme, les nTreg représentent 5 à 10 % des LTCD4⁺ dans le sang périphérique, dont environ 2% sont constitués par les populations nTreg naïves (*Seddiki N, 2006*). De même que les populations décrites précédemment, les nTreg ne peuvent pas être identifiés au moyen de marqueurs de surface spécifiques. Cependant, les nTreg expriment de façon constitutive à l'état basal CD25, la sous-unité α du récepteur de haute affinité à l'IL-2 laquelle est critique pour leur survie et leur différenciation dans le thymus (*Sakaguchi S, 1995*). En effet, les nTreg présentent une incapacité à proliférer et à produire de l'IL-2 suite à une stimulation du TCR (*Malek TR, 2002*). De plus, l'IL-2 joue un rôle crucial dans l'homéostasie périphérique des lymphocytes T régulateurs, les souris en étant dépourvues succombant rapidement, probablement par atteintes auto-immunes. En outre, les souris déficientes en IL-2 ou pour le récepteur à l'IL-2 ont un défaut d'apoptose Fas-dépendante des lymphocytes T CD4⁺, ce qui induit un syndrome lymphoprolifératif (*Sadlack B, 1993 ; Setoguchi R, 2005*).

Un autre grand pas dans l'identification des Treg a été franchi avec la découverte de Foxp3, le facteur de transcription clé dans le développement et la fonction des Treg (*Zheng Y, 2007*). Des études menées chez la souris et chez l'homme ont prouvé que c'est un régulateur du développement et de la fonction des Treg. En effet, une mutation du gène est associée à un dysfonctionnement des nTreg, à l'origine du syndrome dysimmunitaire IPEX associant, polyendocrinopathies, entéropathies auto-immunes, et lié au chromosome X, provoquant chez ces patients diverses maladies auto-immunes telles que des entéropathies ou du diabète de type 1 (*Gambineri E, 2003 ; Zheng Y, 2007*). De façon identique, des modèles murins (*scurfy*) portant des mutations avec une perte de fonction du gène codant Foxp3 au niveau du chromosome X, montrent un syndrome lymphoprolifératif apparenté sur le plan clinique à l'IPEX. Les souris femelles hétérozygotes ne développent pas de manifestations auto-immunes. Ces observations associent ces mutations de Foxp3 à une absence de Treg fonctionnels aussi bien chez les patients IPEX que chez les souris *scurfy* (*Zheng Y, 2007*). Des tests fonctionnels in vitro montrent que les Treg CD4⁺ CD25^{high} de ces patients IPEX ont une altération importante de leur potentiel suppresseur des Teff autologues (*Bacchetta R, 2007*). Ces résultats attestent du rôle de Foxp3 dans les fonctions effectrices des Treg. Foxp3 agit en

collaboration avec d'autres facteurs de transcription. Le maintien de l'expression de Foxp3 est dépendant de l'IL-2 via la signalisation médiée par le facteur de transcription STAT5 (Zorn E, 2006 ; Laurence A, 2007). Le facteur de transcription Foxp3 est donc le marqueur intracellulaire qui a permis d'identifier les Treg de manière spécifique (Figure 10). Mais la détection de ce marqueur requière des étapes de fixation/perméabilisation qui fragilisent les cellules, et il ne peut être utilisé pour l'isolement de cellules viables ainsi que pour les tests fonctionnels de co-culture. Pour ce faire, de nombreux marqueurs de surface ont donc été proposés par différents groupes afin de mieux discriminer les Treg des T conv tels que GITR, CTLA-4, CD62L, CD27 (Godfrey WR, 2004 ; Ruprecht CR, 2005 ; Setoguchi R, 2005), mais leur utilisation est limitée par le fait qu'après activation les Tconv ont des niveaux d'expression de ces marqueurs similaires aux Treg.

En 2006, Seddiki N et collaborateurs, et l'équipe de Liu et collaborateurs, font une découverte majeure dans l'identification spécifique des Treg. En effet, ils montrent que les Treg CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ sont CD127^{-/low} alors que les T conv activés (CD25⁺) ou non activés (CD25⁻) sont CD127^{high}. CD127 est la chaîne α du récepteur à l'IL-7, qui est une cytokine produite localement sur le site de l'inflammation qui assure une survie ainsi qu'une prolifération accrue des Teff. Le faible niveau d'expression de CD127 sur les Treg apparaît donc comme logique. Chez l'homme, la proportion de lymphocytes CD4⁺CD25^{high}CD127^{-/low} est de 5 à 10% des lymphocytes T CD4⁺ périphériques totaux chez un donneur sain dont environ 2% sont constitués par les populations nTreg naïves CD45RA⁺ (Seddiki N, 2006 ; Liu W, 2006). De plus, il y a une très forte corrélation entre le niveau d'expression de Foxp3 et la faible expression de CD127 (CD127^{-/low}) dans les TCD4⁺CD25^{high}. Par ailleurs, le modèle de souris transgéniques surexprimant Foxp3 présente une population de cellules exprimant faiblement CD127, et dotée de propriétés suppressives (Liu W, 2006). En conclusion, CD127 est un très bon marqueur de surface permettant, par son absence relative sur les Treg, d'identifier et d'isoler en combinaison avec CD25/CD4 des populations pures de Treg chez des individus sains pour une utilisation ultérieure pour des tests fonctionnels ou autres...

Dernièrement Miyara et collaborateurs ont défini plusieurs sous-populations de nTreg sur la base de l'expression des marqueurs CD25, CD45RA et Foxp3. En effet, les nTreg se définissent en 3 sous classes : Treg naïfs comme CD25^{high} CD45RA⁺ FOXP3^{high}, les Treg effecteurs CD25^{high} CD45RA⁻ Foxp3^{high} ainsi qu'une population de cellules non régulatrices CD25^{high} CD45RA⁻ Foxp3^{low} (Miyara M, 2009).

D'autre part, il a été décrit que la déméthylation complète d'une région d'ADN, Treg-specific demethylated region (TSDR), est associée à la stabilité d'expression de Foxp3 chez les nTreg (Polansky JK, 2008).

Au final les nTreg représentent une population minoritaire au sein des TCD4+, caractérisée par leur incapacité à proliférer en l'absence d'IL-2, et à produire de l'IL-2. Leur fonction physiologique principale est le maintien de l'homéostasie immunitaire en périphérie par inhibition de la prolifération des Teff et des cellules de l'immunité innée (DC, NK). D'autres cellules régulatrices sont générées de novo en périphérie, les Treg induits.

1.2.3. Les lymphocytes T régulateurs induits (iTreg)

Les iTreg (ou Th3) sont plus souvent retrouvés au niveau des sites inflammatoires où ils sont convertis en cellules suppressives à partir des lymphocytes Tconventionnels naïfs Th0. La différenciation a lieu en périphérie sous l'influence d'une stimulation antigénique, en présence de signaux dépendant de la voie Signal Transducer and Activator of Transcription 5 (STAT-5), d'un milieu cytokinique favorable (TGF- β , acide rétinoïque et IL-2) et en l'absence de l'intervention des signaux de co-stimulation (CD80/86 et CD28). Ces cellules ont les mêmes caractéristiques que les nTreg sur le plan de l'expression de marqueurs membranaires et intracellulaires, et de l'inhibition des réponses immunes Teffectrices. Ils se distinguent des nTreg par la méthylation incomplète du gène Foxp3 et leur manque d'expression de la protéine Helios (Figure 10) (Chen W, 2003 ; Ohkura N, 2010).

Un autre type de Treg, les Tr1, sont générés suite à l'engagement du TCR en présence d'IL-10 (Groux H, 1997) ou d'IL-27 (Awasthi A, 2007). Ils ont été découverts lors d'expériences de culture cellulaire *in vitro* suite à une stimulation antigénique chronique en présence de fortes doses d'IL-10 (Figure 10). Ces iTreg de type 1, ne possèdent pas de marqueur spécifique dont FOXP3, et sont identifiés au moyen d'un profil cytokinique particulier (IL-10 +, IL-4-, TGF- β +, IL-5+, IL-2 low /- et IFN γ low/-). L'IL-10 et le TGF- β ne constituent pas à elles-seules le mécanisme de suppression des Teff par les Treg (Bettini ML, 2010). Dans le paragraphe suivant, nous allons décrire les différents mécanismes d'inhibition de l'activité des Teff.

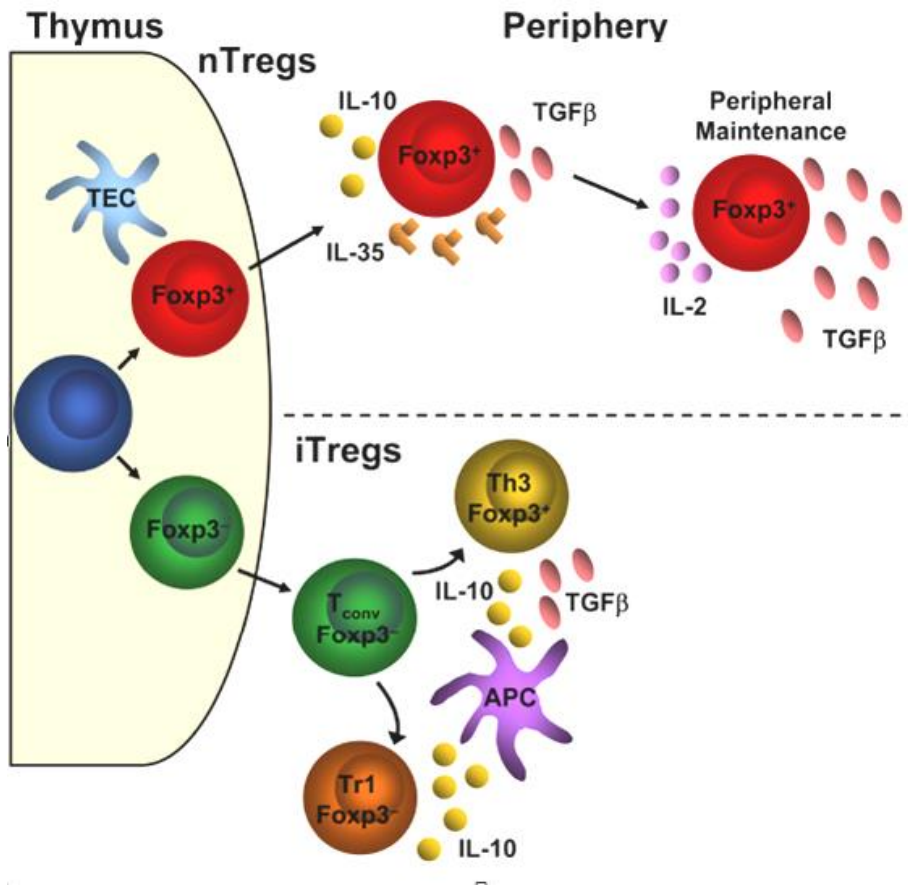


Figure 10. Différentiation des sous-populations de Treg (LANE N and al, 2010) . Les Treg sont classés en fonction de leur origine et de leur mécanisme d'action. Les nTreg dérivent directement du thymus tandis que les iTreg (Tr1 et Th3) sont induits en périphérie. Ils se caractérisent par une expression constitutive du CD25. De plus, leur marqueur le plus spécifique est le facteur de transcription Foxp3 qui est absent chez les Tr1

1.2.4. Mécanismes de suppression des Treg

Plusieurs systèmes expérimentaux *in vitro* et *in vivo* ont mis en évidence que les nTreg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ préviennent le développement de pathologies auto-immunes. Dans un second temps, différentes stratégies expérimentales *in vitro* ont visé à la compréhension du mécanisme utilisé par les nTreg pour l'induction de la tolérance périphérique. Les résultats de ces études indiquent très clairement l'implication des nTreg dans la suppression de l'activation, de la prolifération et/ou des fonctions effectrices des LT (production des cytokines, cytotoxicité) de la lignée CD4⁺ et CD8⁺, après une stimulation antigénique par un système utilisant des CPA ou par un système polyclonal mimant les mêmes effets (anticorps CD3/CD28) (Thornton AM, 1998 ; Godfrey WR, 2004 ; Game DS, 2005). L'action des Treg affecte aussi bien les cellules T naïves, effectrices que les LT mémoires. La tolérance périphérique médiée par les nTreg ne se limite pas aux LT, elle s'exerce sur les LB (Lim HW, 2005), les cellules NK (Azuma T, 2003), et les CPA (DC) (Misra N, 2004). Dans un troisième temps, les recherches expérimentales se sont tournées vers le rôle du facteur de transcription Foxp3 dans la régulation du mécanisme de suppression. Hori S, et Sakaguchi S et collaborateurs, démontrent qu'une induction de l'expression de Foxp3 rend les Tconv naïfs immunosuppresseurs vis-à-vis des Teff (Hori S, 2003). Ceci démontre que Foxp3 pourrait contrôler l'expression des molécules clés régulatrices de la fonction de suppression.

1.2.4.1. Molécules immunosuppresseurs

Les nTreg sécrètent des molécules immunosuppresseurs impliqués dans la fonction de suppression envers les LT autoréactifs. Les plus connues et largement décrites sont l'IL-10 et le TGF- β qui sont des cytokines aux propriétés anti-inflammatoires et immunosuppresseurs. Comme nous l'avons évoqué précédemment, l'IL-10 est également sécrétée par un sous-type de Treg, les Tr1, dont elle induit la différenciation. Elle est primordiale dans le contrôle de l'inflammation. Des études sur des modèles murins de pathologie *in vivo* avec une composante inflammatoire élevée confirment ces conclusions ; notamment des nTreg isolés de souris KO IL-10 dans un modèle de colite, sont dans l'incapacité de contrôler le développement de la maladie (Annacker O, 2001). Dans des modèles de rejet de greffe, l'utilisation d'anticorps bloquants IL-10 prouve également son rôle dans la suppression des autres lymphocytes (Figure 11) (Kingsley CI, 2002).

Quant au TGF- β , il contrôle de façon générale la différenciation des Treg en induisant l'expression de Foxp3. Cette cytokine est connue pour inhiber la prolifération des Th1 et Th2, et pour induire des iTreg en périphérie afin de maintenir la stabilité des nTreg. Des arguments en faveur du maintien de l'homéostasie des nTreg par le TGF- β sont fournis par des études *in vitro*, montrant que l'addition de la molécule associée à une stimulation du TCR, permet chez l'homme et la souris la conversion de lymphocytes naïfs T CD4⁺ CD25⁻ Foxp3⁻ en lymphocytes T CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ régulateurs (Rao PE, 2005).

Certaines études mettent en avant l'influence du microenvironnement sur la signature cytokinique des nTreg et sur les fonctions suppressives mises en place. En effet, des modèles murins de colite montrent que les nTreg empêchant le développement de la maladie via la production d'IL-10 (anticorps bloquant) sont localisés au niveau de la lamina propria de l'intestin uniquement (Uhlir HH, 2006). Un autre argument en faveur de cette hypothèse, est que le traitement par un anticorps bloquant TGF- β n'inhibe pas les fonctions Treg lors de tests *in vitro* de suppression (Piccirillo CA, 2002). D'autre part, le TGF β peut être sécrété par des types cellulaires différents et favoriser un environnement immunosuppresseur.

Par ailleurs, il a été montré que d'autres molécules sécrétées sont impliquées dans le mécanisme immunosuppresseur des lymphocytes Treg, l'IL-35 et la galectine-1 (Collison LW, 2007 ; Garín MI, 2007). Elles causent l'arrêt du cycle cellulaire et inhibition de la production des cytokines pro inflammatoires.

De surcroît, les Treg utilisent l'adénosine, dont les propriétés immunosuppresseuses sont établies (Sitkovsky MV, 2004). Le CD39 dégrade l'adénosine-5'-triphosphate (ATP) en Adénosine Mono-Phosphate (AMP) dans le milieu extracellulaire et le CD73 dégrade l'AMP en adénosine. Ces 2 ectoenzymes CD39 et CD73 ont récemment été mises en évidence à la surface des Treg chez la souris (Deaglio S, 2007) et chez l'homme (Borsellino G, 2007). La liaison de l'adénosine au récepteur A2A des Tconv supprime leur prolifération *in vitro* et *in vivo* (Figure 11).

1.2.4.2. Mécanisme de suppression avec contact cellulaire

La nécessité d'un contact cellulaire pour le potentiel suppresseur des Treg a été mise en évidence par le test de suppression de la prolifération des Teff *in vitro*, qui est devenu le test de routine dans l'évaluation du potentiel suppresseur des cellules. Différentes molécules intervenant dans un contact entre les Treg et les Teff ont été impliquées dans le potentiel suppresseur des Treg.

Des travaux ont montré que CTLA-4 exprimé à la surface des Treg pouvait interagir avec les molécules CD80 et CD86 des DC afin d'induire l'expression deIDO, enzyme responsable du catabolisme du tryptophane. Le catabolisme du tryptophane va conduire à la synthèse de métabolites toxiques comme les kynurénines, de plus la déplétion locale du milieu extracellulaire en tryptophane va pénaliser la prolifération cellulaire (Grohmann U, 2002 ; Fallarino F, 2003). (Shevach EM, 2009). Les Souris CTLA4^{-/-} souffrent d'un syndrome lymphoprolifératif.

LAG3 est une protéine de surface homologue de CD4, qui interagit avec le CMH II avec une forte affinité (Figure 11). Leur interaction avec une cellule comme DC empêche leur maturation et supprime leur capacité stimulatrice. Les nTreg isolés de modèle murins LAG3^{-/-} et l'utilisation d'anticorps bloquants montrent une activité altérée des cellules régulatrices lors de tests fonctionnels (Liang B, 2008).

Un autre mécanisme de suppression serait médié par la génération de molécules associées à la cytotoxicité cellulaire, perforine et granzymes A et B (Grossman WJ, 2004).

Des publications ont également suggéré que suite à une expression constitutive du CD25, les Treg détournent à leur profit l'IL-2 présent dans le milieu extracellulaire ; cette capture empêche la prolifération des Teff (Figure 11) (Oberle N, 2007).

Depuis peu, de nouveaux mécanismes de suppression des Treg ont été identifiés. En effet, des études *in vitro* ont mis en avant l'intervention des nTreg dans la synthèse de glutathion (GSH), un antioxydant intracellulaire important pour la prolifération des Teff. L'inhibition de la synthèse de GSH passe par la consommation par les Treg de la cystéine nécessaire à la synthèse de GSH et la rendant ainsi indisponible aux Teff (Yan Z, 2010 ; Yan Z, 2009). Une autre équipe a montré l'induction par les Treg de la sénescence des Teff stimulés par de l'anti-CD3 dans des tests classiques de suppression *in vitro*. La sénescence consiste en un état

d'arrêt permanent de la prolifération (Ye J, 2012). Ce point sera plus détaillé dans le chapitre sur le stress oxydatif.

Au total, il ne semble pas qu'il y ait un mécanisme d'action principal des Treg, mais plusieurs selon le contexte expérimental physiopathologique et la fonction effectrice régulée.

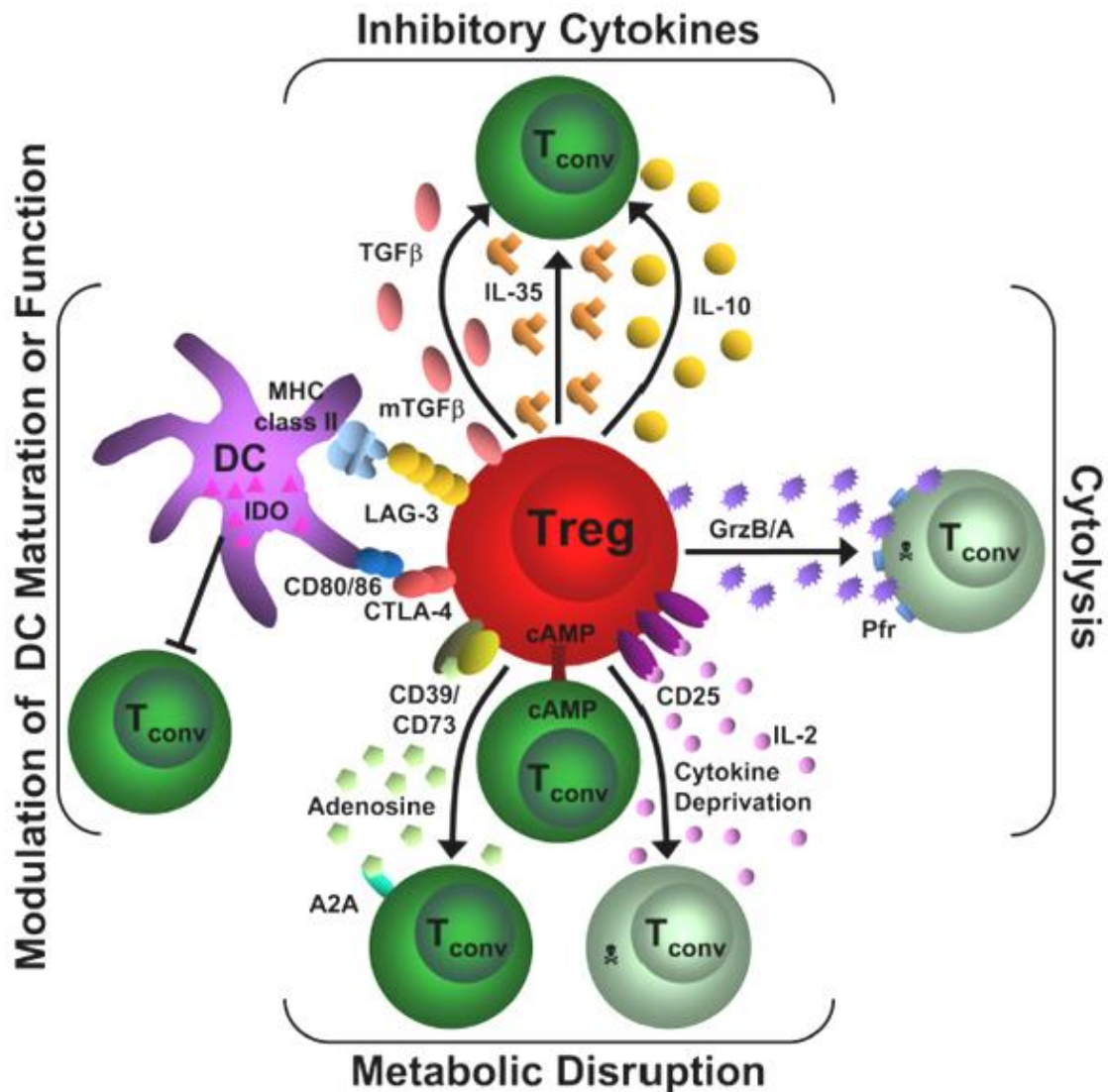


Figure 11. Mécanismes de suppression par les Treg. De multiples mécanismes moléculaires et cellulaires ont été décrits à ce jour : Influence du contact cellulaire avec l'interaction CTLA-4 et des molécules de co-stimulation CD80/CD86 sur la CPA et l'induction d'IDO via CTLA-4 dans les DC ; interaction entre LAG3 et les molécules de CMH de classe II ; sécrétion de cytokines immunosuppressives : IL-10, TGF-β, IL-35 ; Cytotoxicité des Treg sur les cellules T effectrices et sur les CPA via granzyme A/B ou CD39/79 avec la production d'adénosine ou privation en IL-2 (LANE N, 2010).

1.2.4.3. Fonctions physiopathologiques des Treg

De nombreux modèles expérimentaux murins, et études *in vitro/ex vivo* réalisés chez l'homme présentant une délétion ou une altération des marqueurs CD25 ou Foxp3 des Treg, les ont montrés comme responsables du développement de pathologies auto-immunes.

Mais ces populations Treg dont le rôle est primordial dans l'immunosurveillance périphérique, sont aussi impliquées dans le développement de cancers et d'infections chroniques (*Chatila TA, 2005*) car elles inhibent les réponses immunitaires à médiation cellulaire des CTL nécessaire à l'éradication des cellules tumorales (*Nishikawa H, 2010*). En effet, une augmentation de la fréquence des lymphocytes Treg a été décrite dans de très nombreux types de cancers (notamment pulmonaire, ovarien, colorectal, du sein et mélanome). Cette augmentation de la fréquence est souvent en corrélation avec un mauvais pronostic (à l'exception des cancers hématopoïétiques), notamment pour les carcinomes ovariens (*Curiel TJ, 2004*). De nouvelles stratégies thérapeutiques sont donc développées dans le but de réguler leurs prolifération et fonctions.

Les infections chroniques (virus, bactéries et parasites) ont également été associées à une augmentation du nombre de lymphocytes Treg Foxp3+. L'induction ou l'expansion de lymphocytes Treg durant l'infection, afin de limiter les dommages tissulaires, serait responsable de l'échec de l'élimination complète de l'infection, avec pour conséquence l'établissement d'une phase chronique (*Wohlfert E, 2008*).

En conclusion, le moindre déséquilibre dans la fonction ou la fréquence des lymphocytes Treg conduit au développement de graves pathologies, un excès dans leur nombre ou leur fonction favorisant le développement de cancers tandis qu'un défaut semble impliqué dans la physiopathologie de nombreuses maladies auto-immunes et dans les maladies allergiques.

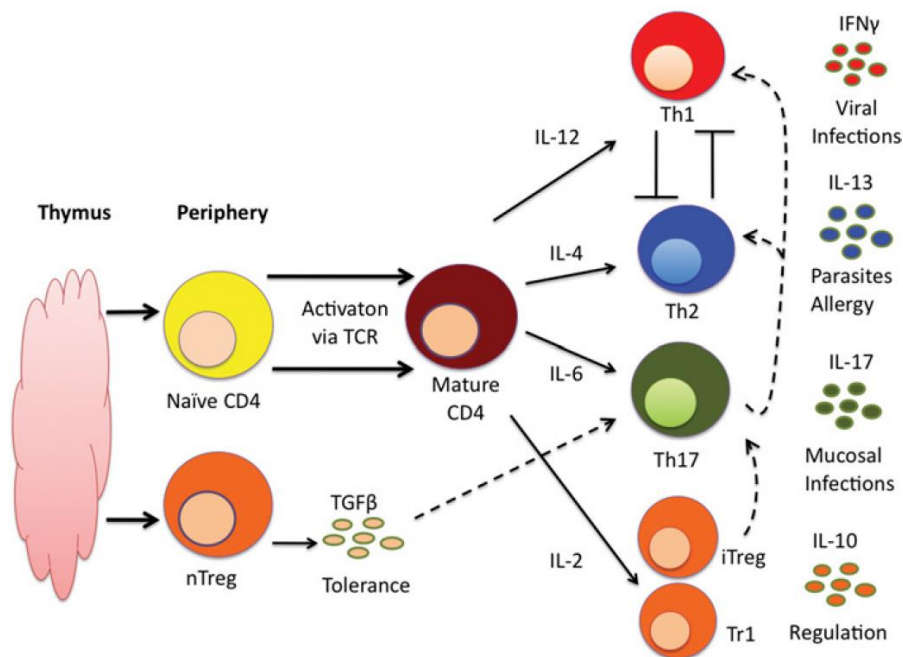


Figure 12. Différentiation des sous-populations de Th et iTreg à partir des Tconv naïfs. Les Tconv naïfs provenant du thymus s'activent et se différencient en plusieurs sous-types de Th ayant des fonctions différentes et sécrétant des cytokines caractéristiques. Les Th1 médient les réponses anti-infectieuses contre les pathogènes intracellulaires et les Th2 contre les pathogènes extracellulaires ; la réponse anti-infectieuse des Th17 est restreinte aux muqueuses ; les nTreg ou induits (iTreg et Tr1) contrôlent le développement des Th1/2/17 (*John J and al, 2010*).

1.3. Microenvironnement et plasticité fonctionnelle

Le microenvironnement a été mis en avant dans la régulation des fonctions effectrices des populations régulatrices et donc dans la plasticité fonctionnelle. Précédemment nous avons détaillé le choix initial de lignages effecteurs Th (Th1, Th2 et Th17) pour une cellule T CD4+ naïve en fonction de la nature du pathogène (Figure 12, Tableau 1). En effet, la plasticité des Tconv naïfs permet de moduler la nature et l'intensité de la réponse immunitaire en fonction de la nature de l'agression et du microenvironnement. Cette description suit un schéma très précis, mais de nouvelles données nous montrent que ce lignage peut encore gagner en complexité et en plasticité avec l'intervention du microenvironnement dans des situations pathologiques.

Module	Cytokines de polarisation	Facteur de transcription	Récepteurs membranaires	Cytokines effectrices	Cellules cibles	Fonction immunitaire
Th1	IL-12, IFN	T-bet	CXCR3	IFN γ	Macrophages	Bactéries
Th2	IL-4	GATA-3	CCR4 / CRTh2	IL-4, IL-5, IL-13	Eosinophiles	Parasites
Th17	IL-6, IL-1 β , TGF- β	ROR- γ t	CCR6 / CCR4	IL-17, IL-22	Neutrophiles	Fungi
Treg	?	FOXP3	CCR7 / CCR6	TGF- β	DC / LT	Régulation
Tr1	IL-10	?	CCR7 / CCR6	IL-10	LT	Régulation

Tableau 1 : Récapitulatif de la caractérisation des Th et Treg (Sallusto F and al, 2009)

1.3.1. Phénotype Th17/Th1 et Th17/Th2

La différenciation *in vitro* de TCD4⁺ naïfs dans un environnement IL-4⁺ ou IFN- γ , en l'absence de TGF- β génère des Th17 produisant de l'IFN γ et de l'IL-12 en supprimant la sécrétion d'IL-17 dans un contexte dépendant des voies de signalisation Tbet/STAT3 (Lee YK, 2009). Chez des patients atteints de la maladie de Crohn, 50 % des populations Th produisant de l'IL-17A sécrètent également de l'IFN- γ au niveau de l'intestin (Annunziato F, 2007). De même des clones cellulaires de T générés à partir de Th17 (CD4⁺CCR6⁺CD161⁺) circulants de patients atteints d'asthme chronique, contiennent des cellules avec un phénotype bivalent Th17/Th1, et des Th17/Th2 produisant de l'IL-4 et de l'IL-17 en faible proportion. Il s'est avéré que l'expansion *in vitro* des CD4⁺CD161⁺ naïfs (provenant de sang cordon ombilical) se différencie en cellules avec une signature cytokinique et moléculaire (GATA3 /RORC2) de type Th17/Th2, en présence de l'IL-4 (Cosmi L, 2010).

1.3.2. Phénotype Th17/Treg

Chez la souris, il a été montré que les Treg se différencient en Teff, dans un environnement inflammatoire dépendant de l'IL-6. De plus, ces Treg produisent de l'IL-17 A en l'absence de TGF- β (Radhakrishnan S, 2008 ; Lee YK, 2009) ; et l'IL-6 supprime l'effet suppresseur des nTreg (Korn T, 2007 ; Xu L, 2007). Des études *in vitro* chez l'homme, révèlent qu'en plus d'une sécrétion d'IL-17A les Treg activés dans des conditions inflammatoires perdent leur fonction immunosuppressive de manière réversible (Beriou G, 2009) . Ces résultats complètent les données précédentes obtenues chez la souris et prouvent l'existence d'un phénotype bivalent Th17/Treg lorsque que les Treg activés sont cultivés dans un environnement pro-inflammatoire. Cette redirection de la différenciation Th17/ Treg s'effectue grâce à la plasticité de la régulation transcriptionnelle via l'environnement. Aujourd'hui un intérêt particulier est accordé à l'étude de la balance Th17/Treg, et à leur relation dans différentes maladies inflammatoires et auto-immunes. Ces cellules sont liées par leur origine commune avant différenciation (pour les iTreg), par les phénomènes de plasticité qui peuvent provoquer un changement de phénotype et aussi par l'ambivalence de leur rôle. Les Th17 sont pro-inflammatoires alors que les Treg sont immuno-régulateurs.

1.3.3. Balance Treg / Th17 et maladies inflammatoires chroniques

Les nTreg et les différentes sous-populations de iTreg contrôlent les réponses effectrices des Teff auto-réactifs et préviennent le développement de maladies auto-immunes et limitent les dommages tissulaires. Précédemment, nous avons décrit les conditions de génération des sous-populations Treg et Th17 qui sont très liées par le TGF- β , alors que l'addition de cytokines pro-inflammatoires IL-6 et/ou IL-1 β et/ou TNF- α , favorise la différenciation vers un phénotype Th17. Cette différence très fine suggère l'existence d'une balance critique, gouvernée par l'IL-6 (et autres cytokines pro-inflammatoires), dans la différenciation entre les Treg et Th17. D'autant plus que l'IL-6 seule stimule la différenciation Th17 (sous certaines conditions cf. §1.1.4.1) et le TGF β celle des Treg. Des études *in vitro* chez la souris mettent en évidence la différenciation des Tconv naïfs vers la lignée Th17 dans un environnement inflammatoire IL-6 dépendant en présence de Treg stimulés dans des conditions mitogéniques (CD3/CD28). De plus, pour la première fois des tests de co-culture montrent une génération d'IL-17A par ces Treg murins (Lee YK, 2009). Cette observation met en garde

contre les stratégies d'immunothérapies basées sur le transfert adoptif de Treg afin de réguler les réactions inflammatoires. Les Tr1 avec leur production de cytokine anti-inflammatoire l'Il-10 capable de neutraliser les réponses de type Th1 serait une alternative. La balance Th17/Treg peut expliquer les dysfonctionnements des Treg inflammatoires et le recrutement excessif de Th17 au niveau des sites inflammatoires, à l'origine des maladies auto-immunes inflammatoires.

Synthèse : Les sous-populations de TCD4+

Les lymphocytes Th se distinguent grâce à une signature moléculaire spécifique :

(i) les Th1 expriment les facteurs de transcription T-BET/STAT4 et sécrètent de l'IFN γ et IL-12. Ils régulent les réponses immunes contre les pathogènes intracellulaires et sont également responsables des dommages tissulaires observés pendant les maladies inflammatoires ;
(ii) les Th2 sont identifiés grâce aux facteurs GATA3/STAT6 et la production d'IL-4 et protègent des pathogènes extracellulaires (helminthes) ; (iii) les Th17 (CCR6+CCR4+CXCR3-) sont des cellules mémoires issus de précurseurs naïfs (CCR6+CD161+) ou pas produisant de l'IL-17A/F, IL-21 ; IL-22, IL-23 dépendant des facteurs de transcription RORC/STAT3. Ils assurent le maintien de la barrière homéostatique au niveau des muqueuses et protègent des infections bactériennes. Ils sont souvent impliqués dans le développement des maladies inflammatoires chroniques et auto-immunes ; (iv) les Treg se détachent en 3 sous-populations : les n Treg originaire du thymus (FOXP3+ CD25^{high}CD127^{low}) et les iTreg induits en périphérie (Tr1 et Th3). Ils maintiennent la tolérance immunitaire aux antigènes du soi en périphérie et sont peu recrutés au niveau des sites inflammatoires.

L'existence d'une balance Treg/Th17, en faveur d'une augmentation des Th17 et une diminution des Treg est souvent associée au développement de maladies auto-immunes et inflammatoires. Ces dysfonctionnements lymphocytaires sont observés dans la Bronchopneumopathie Chronique Obstructive (BPCO) mais le mécanisme à l'origine n'est pas connu. Cependant, l'équipe de Mougiakakos et collaborateurs ont démontré une résistance des Treg à un stress oxydatif induit par l'H₂O₂, par rapport aux lymphocytes T conventionnels. Cette résistance des Treg est directement liée à une expression plus importante des systèmes antioxydants (Thiorédoxine) en comparaison des Tconv ; ceci suggère que le stress oxydatif secondaire au tabagisme chronique pourrait expliquer les anomalies Treg/Th17 observées durant la BPCO.

Dans le chapitre suivant nous allons d'abord définir le stress oxydatif puis décrire les systèmes de synthèse et de réduction des oxydants ainsi que les effets physiologiques et néfastes sur les cellules dont les lymphocytes.

2. Le stress oxydatif

Le stress oxydant se définit comme un déséquilibre entre les systèmes producteurs d'oxydants et les capacités anti-oxydantes d'une cellule ou d'un compartiment cellulaire, en faveur des entités oxydantes (*Sies H, 1991*). C'est avant tout une réponse à un changement par rapport aux conditions physiologiques d'une cellule. Au départ, la synthèse d'oxydants ne modifie pas ses propriétés biologiques. Si les oxydants s'accumulent, la cellule va s'adapter par la mise en place d'une détoxification via des molécules et enzymes participant à l'élimination des oxydants associés à une répression des systèmes libérant les oxydants, c'est le maintien du statut redox (*Morel Y, 1999 ; Barouki R, 2001*). Lorsque le taux d'oxydants devient trop important par rapport aux défenses, un stress oxydatif cellulaire s'installe. La mise en place du stress oxydatif cellulaire sera décrite, à travers des données de la littérature, en faisant le lien entre le niveau d'oxydants et d'antioxydants et leur conséquence réversible ou non sur des cibles biologiques impliquées dans des fonctions cellulaires primordiales. Au préalable, les différentes espèces oxydantes et systèmes antioxydants seront détaillés.

2.1. Les espèces réactives de l'oxygène

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) regroupent l'ensemble des dérivés radicalaires de l'oxygène mais également les composés non radicalaires.

2.1.1. Les espèces radicalaires de l'oxygène

Les espèces radicalaires ou radicaux libres de l'oxygène (RLO) possèdent un électron non apparié. Du fait de leur très grande réactivité, leur durée de vie est très courte. Il existe aussi des espèces radicalaires dérivant de l'azote mais appartenant à la classe des espèces réactives oxygénées. On peut distinguer les radicaux primaires des radicaux secondaires comme les

radicaux peroxy (ROO°) et les radicaux alkoxy (RO°) issus de la réaction des radicaux primaires avec d'autres entités (lipides, protéines, glucides) (Tableau 2).

Dénomination	Formule chimique
Anion superoxyde	$\text{O}_2^{\circ-}$
Radical hydroxyle	OH°
radical perhydroxyle	HO_2°
Radical peroxy	ROO°
Radical alkoxy	RO°

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des espèces radicalaires de l'oxygène

2.1.2. Les espèces non radicalaires oxygénées

Les dérivés non radicalaires ne possèdent pas d'électron célibataire, ce sont des espèces activées dérivant de l'oxygène ou de l'azote ou chlore. Ils réagissent avec des métaux (Tableau 3).

Dénomination	Formule chimique
Oxygène singulet	$^1\text{O}_2$
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Nitreperoxyde	ONOOH
Peroxynitrite	ONOO^-
ion hypochlorite	HOCl

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des espèces non radicalaires oxygénées

2.2. Les principales ERO et leur mode de production

L'essentielle de la production (physiologique ou pathologique) d'ERO est associée aux réactions d'oxydo-réduction et au métabolisme cellulaire de l'oxygène. Les principales ERO comme l' $^1\text{O}_2$, l' O_2^- , l' H_2O_2 , OH° , le peroxy-nitrite sont sous la dépendance de différentes réactions que nous décrivons en insistant sur le mode de production, la source et le type cellulaire de chacun d'entre eux.

2.2.1. L'oxygène singulet

Sous l'influence de rayonnements à ultraviolets (sources extérieurs), la liaison entre les molécules d'oxygène est fragilisée et une inversion des électrons peut s'effectuer donnant naissance à une forme plus réactive, l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) dont la durée de vie est extrêmement courte. Il réagit avec les bases nucléiques, lipides non saturés et amino-acides. Au niveau de l'ADN, son interaction avec la guanine génère le 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodGuo), le marqueur de stress oxydatif (*Ravanat JL, 2000*).

2.2.2. L'anion superoxyde (O_2^-)

L' O_2^- est un radical libre de l'oxygène chargé négativement, qui résulte d'une réduction monovalente de l'oxygène. Cette réaction s'effectue entre l'oxygène (O_2) et un électron, en présence de métaux, de molécules organiques ou d'enzymes (oxydases ou complexes de la chaîne respiratoire). Il est relativement peu réactif, il peut agir en solution aqueuse comme base en devenant un accepteur d' H^+ . Il peut provenir de plusieurs sources présentes dans toutes les cellules vivant en aérobie.

2.2.2.1. Principales sources de production

Les deux principales sources responsables de la production d' O_2^- sont la mitochondrie et la Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate oxydase (NADPH oxydase). Elles seront exposées de manière exhaustive, en mettant l'accent sur leur rôle dans les lymphocytes.

A. La chaîne respiratoire mitochondriale

En aérobiose, pour son fonctionnement une cellule produit de l'énergie par des réactions d'oxydo-réduction. Ces réactions font intervenir des oxydants ou accepteurs d'électrons, et des réducteurs ou donneurs d'électrons. Elles ont lieu au niveau de la chaîne respiratoire de la mitochondrie, un organelle cellulaire qui fournit environ 90% de l'énergie nécessaire sous forme d'ATP (*Rolfe DF, 1997*). Son rôle est crucial pour le fonctionnement de la cellule et représente une des sources principales d'ERO d'une cellule. Chez l'homme, la plupart des cellules contiennent un nombre variable de mitochondries en fonction du type cellulaire et des besoins énergétiques (*Jakobs, 2006*).

i. Structure et production d'ERO par la mitochondrie

La mitochondrie possède deux compartiments : l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale délimités par deux membranes, la membrane interne et externe.

L'espace intermembranaire a une composition très proche de celle du cytosol. De plus, ce dernier a une charge positive en raison du gradient de protons (H^+). La matrice mitochondriale est le siège de nombreuses réactions métaboliques, telles que le cycle de Krebs, la β -oxydation des acides gras. La dégradation des nutriments (glucides, acides gras et acides aminés) va donc fournir à la chaîne respiratoire des équivalents réduits, sous forme de la Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NADH) et de la Flavine adénine dinucléotide (FADH₂), nécessaires à la synthèse d'ATP.

La membrane externe est perméable aux molécules et permet le transport des protéines de taille importante via des translocases.

La membrane interne possède de nombreux replis qui forment les crêtes mitochondriales où sont enchâssés les 4 complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale et l'ATP synthase, responsable de la production d'ATP. Chaque complexe contient plusieurs transporteurs d'électrons agissant séquentiellement :

- Le complexe I ou NADH-ubiquinone oxydoreductase catalyse le transfert de deux électrons du co-facteur NADH à l'ubiquinone (ou Co-enzymeQ), couplé à la translocation de quatre protons au travers de la membrane interne vers l'espace intermembranaire. Ceci contribue à la force protonmotrice (*Sazanov LA, 2007*).
- Le Complexe II ou Succinate-ubiquinone oxydoréductase qui oxyde la succinate en fumarate. Il permet le transfert de deux électrons au 3^{ème} complexe, par l'intermédiaire de l'oxydation du FADH₂ et d'un pool d'ubiquinone (*Brière JJ, 2005*).
- Le Complexe III ou Complexe b-c1 (ubiquinol-cytochrome C réductase) catalyse le transfert de deux électrons de l'ubiquinol au cytochrome c, directement associée à l'expulsion de 4 protons.
- Le Complexe IV ou Cytochrome c oxydase catalyse la dernière réaction d'oxydoréduction qui réduit l'O₂ en H₂O par 4 électrons et 4 protons qui sont transloqués de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire (*Wikström M, 2007*).

Les cofacteurs (NADH, FADH₂) issus de la dégradation des nutriments vont être réoxydés par transfert de leurs électrons sur un accepteur final : l'O₂, au niveau de la chaîne respiratoire. Le transfert des électrons sur les différents complexes s'accompagne d'un pompage de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire qui est ensuite utilisé par l'ATP synthase pour la phosphorylation de l'ADP en ATP (Figure 13).

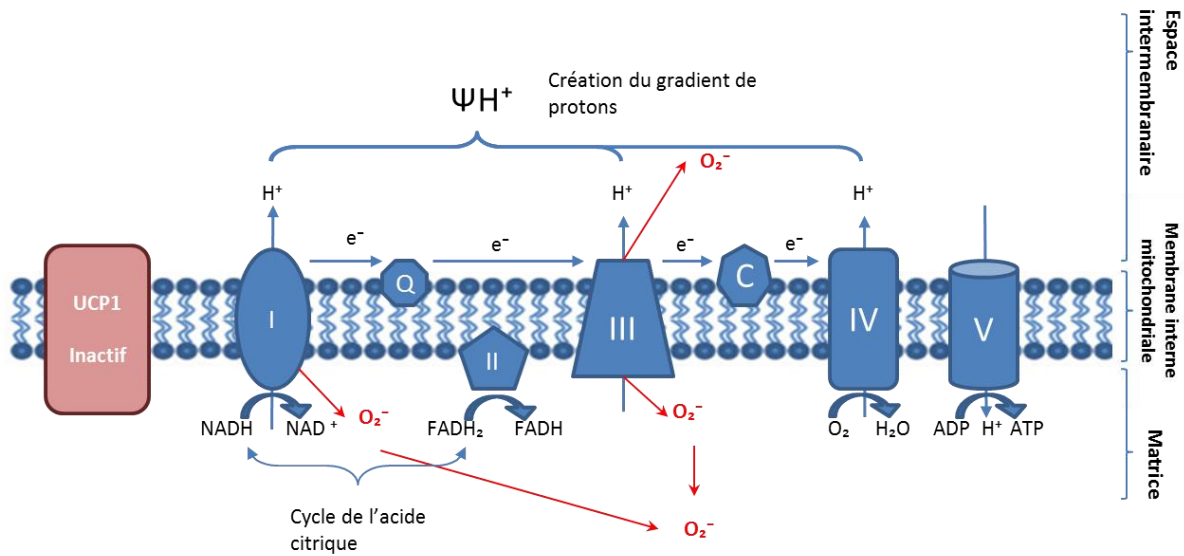
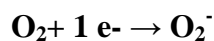


Figure 13. La chaîne respiratoire mitochondriale. La chaîne respiratoire, au niveau de la membrane interne, est constituée de 4 complexes (I-IV) contenant les transporteurs d'électrons et permettant la réduction de l'O₂ en H₂O. Lors de la réduction il se crée un gradient de protons au niveau de l'espace intermembranaire ainsi qu'une production d'ERO dans la matrice au niveau des complexes I et III. La force du pompage des protons vers la matrice permet la synthèse d'ATP via le complexe V (ATP synthase).

Au final, l'oxygène est transformé en molécule d'eau :



Cependant, les imperfections de la chaîne respiratoire peuvent générer des ERO en condition physiologique. En effet, le système peut laisser échapper quelques électrons qui vont réduire partiellement l'oxygène. Environ 2 à 3% de l'oxygène subisse une réduction mono électronique (addition d'un seul électron) conduisant à la formation du radical O₂⁻ (Figure 13) (Boveris A, 1972 ; Koppenol WH, 2001 ; Chapman KE, 2005) :



Cette production radicalaire se perçoit donc comme un phénomène physiologique naturel, strictement lié au métabolisme aérobie, qui est permanent et ubiquitaire, excepté dans les cellules dépourvues de mitochondries. Le débit de la synthèse d'ERO est dépendant du flux d'électrons de la chaîne respiratoire et du degré de réduction des transporteurs d'électrons. Ainsi, une réduction accrue des transporteurs d'électrons du côté du substrat par rapport au reste de la chaîne respiratoire (coté oxygène) est très oxydé, et favorise une importante

production de radicaux. Dans la situation inverse, une oxydation accrue des transporteurs d'électrons (ajout de l'ADP) réduit de manière drastique la production d'ERO (*Herrero A, 1997 ; Servais S, 2003*). En effet, l'ajout d'ADP mime les mêmes effets obtenus qu'avec un agent découplant, tel que le carbonylcyanide-p-trifluorométhoxy-phénylhydrazone (FCCP) (décrits plus loin).

En outre, les sites de production de l' O_2^- , au sein de la chaîne respiratoire, sont identifiés grâce à des inhibiteurs spécifiques : la roténone (complexe I), l'antimycine A ou le myxothiazol (complexe III), dans des cellules du muscle cardiaque (*Barja G, 1999 ; Liu X, 2002 ; Chen Q, 2003*). Chacun des traitements ont montré une surproduction d'ERO, ils ont en commun des quinones qui sont des sources d'ERO. De plus, l'identification de dysfonctions au niveau des complexes I-III a clairement établi un lien entre l'augmentation de la production d'ERO, par la mitochondrie et les dommages spécifiques d'un stress oxydatif, dans de nombreuses maladies neurodégénératives (*Schapira AH, 1998*).

Ces traitements pharmacologiques sur des lymphocytes périphériques stimulent également une production d'ERO qui reste plus élevée au niveau du complexe III (*Kamiński MM, 2012*). Le rôle du complexe III dans la genèse d'ERO mitochondriaux par les lymphocytes T a été démontré chez des souris déficientes pour un gène codant pour le complexe III (*Uqcrl1*) (*Sena LA, 2013*). Par ailleurs, ces études mettent en évidence un rôle essentiel des ERO physiologiques dans l'activation des lymphocytes T (décrits plus loin). De même, la surexpression de la protéine BCLx1 (B-cell lymphoma x1), impliquée dans la régulation des ERO produits par la mitochondrie, diminue de façon significative la synthèse d' O_2^- par les LT activés (*Esposti MD, 1999 ; Devadas S, 2002*).

ii. Régulation de la phosphorylation oxydative mitochondriale

Le système de phosphorylation oxydative est composé de la chaîne respiratoire mitochondriale (les 4 complexes) et de l'ATP synthase ou complexe IV (Figure 13). En fonction des besoins en ATP, la cellule s'adapte en modifiant le fonctionnement global de la chaîne respiratoire ou en modifiant un des éléments (phosphorylation) qui contrôle le fonctionnement de la chaîne ou encore en jouant sur la quantité d'enzymes (*Devin A, 2007*). La phosphorylation oxydative peut être régulée à deux niveaux : le taux de synthèse d'ATP et

l'efficacité de cette synthèse (*Kadenbach, 2003*). L'efficacité de la synthèse d'ATP varie soit par modification de la force du gradient de protons (découplage extrinsèque) soit par modification de l'efficacité de pompage des protons (découplage intrinsèque). Nous limiterons la description à la régulation de la phosphorylation oxydative, via le découplage extrinsèque, impliqué dans la régulation des niveaux d'ERO de la mitochondrie (en rapport avec mon projet).

L'énergie libérée par la chaîne de transporteurs d'électrons (ETC) va permettre de pomper les ions H⁺ à partir de la matrice mitochondriale au travers de la membrane interne vers l'espace intermembranaire. Le gradient de protons va représenter une force poussant les protons à retourner dans la matrice mitochondriale pour la synthèse d'ATP (Figure 13). Cependant, la force du gradient de protons peut être modifiée par un découplage extrinsèque grâce à une augmentation de la perméabilité membranaire interne aux protons et aux cations, et donc entraîner une diminution du gradient de protons à travers cette membrane. La fuite de protons à l'origine de ce découplage peut être basale, c'est-à-dire influencée par les propriétés physicochimiques de la membrane (teneur en acides gras) ou inductible (*Bobyleva V, 1997 ; Brand MD, 1992*).

La fuite inductible est réalisée par une famille de protéines les « Uncoupling proteins »(UCP). Il existe plusieurs isoformes dont la première UCP1 a été découverte en 1980 (*Lin CS, 1980*), sa fonction découplante liée à sa capacité à transporter les protons est dépendante des acides gras. Les autres isoformes UCP2 à UCP5 ont ensuite été identifiées sur la base de leur homologie avec la séquence d'UCP1 (UCP2 : *Fleury C, 1997*, UCP3 : *Boss O, 1997*, UCP4 : *Mao W, 1999*, UCP5 : *Yu XX, 2000*). Une activité de transport de protons a également été attribuée pour les isoformes UCP2 et UCP3 (*Jabůrek M, 1999*) et leur expression dans des cellules de mammifères permet un découplage du gradient (Figure 14).

Ces protéines (UCP2, UCP3) auraient un rôle dans la limitation de production d'ERO mitochondriale. Cette hypothèse s'appuie sur différentes expériences de modulation de l'expression des UCP. En 1996, *Skulachev V* et collaborateurs ont proposé le concept de découplage modéré basé sur une augmentation assez faible de la perméabilité aux protons qui a pour effet une diminution des ERO. En effet, une élévation de la force du gradient de protons induit une augmentation de la synthèse d'O₂⁻ (*Turrens JF, 1997*). De plus, la

production d' H_2O_2 est réduite dans des macrophages surexprimant UCP2 (*Nègre-Salvayre A, 1997*). De la même façon, des souris dont les gènes codant UCP2 ou UCP3 sont inactivés présentent une production d'ERO plus importante que les souris contrôles (*Arsenijevic D, 2000 ; Vidal-Puig AJ, 2000*). D'autre part, une équipe montre que l' O_2^- est capable d'activer les protéines UCP1, 2 et 3 par un mécanisme dépendant des acides gras. Donc les UCP régulent les ERO mais sont également leurs cibles (*Echtay KS, 2002*).

D'autre part, le découplage peut être produit artificiellement par l'utilisation de molécules chimiques produisant les mêmes effets que les UCPs, comme le 2,4 dinitrophénol (DNP) et ses dérivés CCCP (carbonylcyanide-m-chlorophénylhydrazone) ou le FCCP (§2.2.2.1. A.i). Le FCCP est un puissant découplant du gradient de protons. Il peut agir à des concentrations beaucoup plus faibles que le DNP. Ces 2 agents sont les plus utilisés dans la dissipation expérimentale du gradient de protons. Le FCCP et le DNP sont des acides organiques avec une charge négative délocalisée qui les rend plus hydrophobe. Ainsi cette charge leur permet de traverser plus facilement dans un milieu non polaire, tel que la bicouche lipidique de la membrane pour atteindre l'espace intermembranaire où elle capte un proton. La molécule retourne ensuite dans la matrice mitochondriale où l'ion H^+ est relargué. Au final, le gradient de protons est dissipé et la synthèse d'ATP n'a pas lieu (Figure 14) (Kadenbach, 2003).

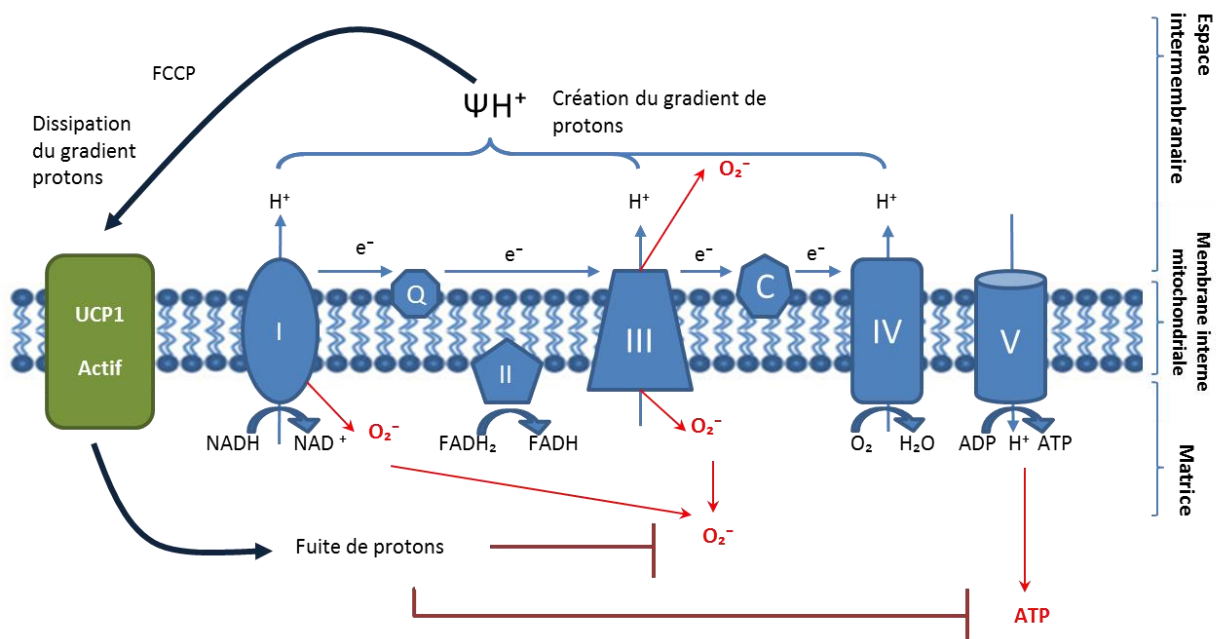


Figure 14. Régulation de la phosphorylation oxydative mitochondriale. Le découplage physiologique du gradient de protons via les UCP ou artificiel via le FCCP entraîne une fuite de protons dans la matrice empêchant la synthèse d'ATP et inhibant la production d'ERO.

Le traitement de TCD4+ murins par du FCCP, dans des conditions mitogéniques, voit leur production d'ERO mitochondriaux diminuée (*sena l, 2013*). De même des lignées de Jurkat T (Lignée cellulaire immortalisée de T) traitées par le FCCP présentent une diminution d'ERO mitochondriaux (*Josse C, 1998 ; Tirosh O, 2003*). Cependant, dans d'autres types cellulaires comme les fibroblastes, il a été montré que le FCCP inhibe la prolifération cellulaire et induit une sénescence cellulaire prématurée (*Hutter E, 2004*). Ce vieillissement précoce serait lié à une augmentation de la production d'ERO. Ces résultats montrent que l'effet de la fuite de protons est dépendant du type cellulaire considéré ainsi que de l'intensité de cette fuite. En effet, une fuite de protons trop importante et l'augmentation du transfert d'électrons ne peuvent plus compenser le retour des ions H⁺ dans la matrice mitochondriale, le potentiel membranaire mitochondrial s'effondre et le niveau d'ERO est élevé.

La mitochondrie ne constitue pas la seule source productrice d'O₂⁻. la NADPH oxydase est une autre source importante.

B. La NADPH OXYDASE

La nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase (NADPH oxydase) ou « Neutrophil oxydase » (NOX) est un complexe enzymatique multi protéique, associé à la membrane plasmique, initialement décrit dans les phagocytes (polynucléaires neutrophiles et éosinophiles, monocytes et macrophages) et dans certaines cellules non phagocytaires (lymphocytes). La plus connue est Nox2 identifiée dans les cellules phagocytaires comme le neutrophile, le macrophage et l'éosinophile ; elle joue un rôle fondamental dans les réactions de défense immunitaire.

La NADPH oxydase est formée d'un coeur membranaire, le cytochrome b₅₅₈, constitué des protéines p22^{phox} et gp91^{phox} (NOX2), et de facteurs cytosoliques p47^{phox}, p67^{phox} et p40^{phox} ainsi que de la protéine G monomérique Rac. Au repos, le complexe multimérique est dissocié, il s'agit d'un stade de pré-activation de la NADPH oxydase (*Lapouge K, 2002*). L'activation de la NADPH oxydase met en jeu la translocation des protéines p47^{phox}(NCF1), p67^{phox} et p40^{phox} associées dans le cytosol au cytochrome b₅₅₈ membranaire (Figure 15) (*Groemping Y, 2005*).

Récemment, la famille des Nox (sous-unités gp91 phox) compte 7 isoformes dans les cellules non-phagocytaires : Nox1, Nox2, Nox3, Nox4 et Nox5, ainsi que deux Duox : Duox1 et 2 (Krause KH, 2004). L'activité des NOX requière également la présence de la GTPase Rac, dans le cytoplasme des cellules. Cependant, l'implication de Rac1 dans l'activité des NOX dépend des isoformes (décrits plus loin).

Au final, cette enzyme catalyse le transfert d'électrons de son substrat le NADPH à l'accepteur final l'oxygène (réduction) entraînant la production d'O₂⁻ :

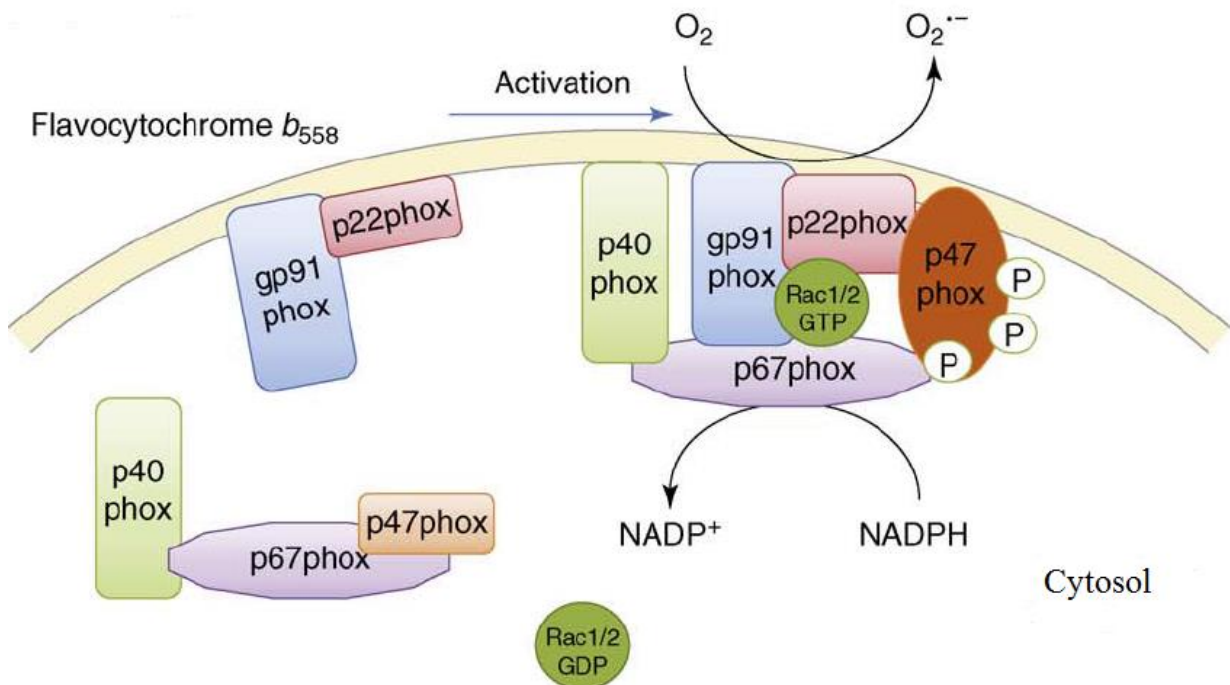


Figure 15. Structure de la NADPH oxydase. La NADPH oxydase est constituée d'un cœur membranaire le cytochrome b₅₅₈ (gp91phox et p22 phox) et de facteurs cytosoliques (p40/47/67phox) et rac qui sont transloqués au niveau de la membrane après activation.

Des données de la littérature ont clairement établi un lien entre la genèse d'ERO et la NOX2 (Griendling KK, 2000 ; Suh YA, 1999) ; ainsi la stimulation de récepteur spécifique aux phagocytes amène à une formation d'O₂⁻ via l'oxydase, qui donnera naissance à l' H₂O₂ après dismutation.

NOX1 quant à lui partage 56% d'homologie avec NOX2. L'expression de NOX1 se concentre au niveau de tissus tels que le colon, l'estomac, l'utérus et pourrait être induite dans d'autres types cellulaires tels que les cellules musculaires lisses aortiques par le Platelet derived growth factor (PDGF), la prostaglandine E2 α et l'angiotensine II (Bánfi B, 2004). De plus, des études *in vitro* indiquent que la délétion génétique de p22phox abolit totalement la production d'O₂⁻ par les NOX, à l'exception des NOX1. En effet, son activité est diminuée de manière drastique mais une production résiduelle subsiste ; l'expression de p22Phox est essentielle à l'activation complète des NOX1 (Cheng G, 2004 ; Takeya R, 2003 ; Martyn KD, 2006). En outre, des données de la littérature témoignent d'un lien entre l'expression de Rac1 et la régulation de l'activité de Nox1 (Park HS, 2004).

L'expression de NOX3 est quasiment réduite à l'oreille interne dans les otoconies ; sa structure générale est assimilée à celle de Nox1 et Nox2. L'activation de NOX3 dépend entièrement de p22phox mais pas de Rac1 (Takeya R, 2003 ; Ueno N, 2005).

Le rôle des NOX4 dans la production d'ERO est attesté par plusieurs études expérimentales. Par exemple, la transfection d'une lignée humaine de pneumocytes de type 2 avec un ARN d'interférence (siRNA) spécifique de NOX4 diminue la production d'ERO, en réponse à l'exposition aux particules de diesel (Amara N, 2007). NOX4 est exprimée de façon ubiquitaire et est impliquée dans la prolifération, différenciation cellulaire et les défenses immunitaires.

NOX5 est une enzyme sensible au calcium et son expression est limitée aux cellules de la rate et des spermatozoïdes dont elle assure la maturation. Elle est également présente dans les lymphocytes tissulaires mais absente dans les lymphocytes circulants (Bánfi B, 2001) .

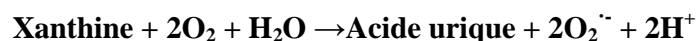
Les DUOX 1 et 2 sont respectivement isolées dans l'épithélium respiratoire / thyroïde et dans les glandes du tractus gastro intestinal / glande thyroïde. Elles possèdent 83% d'homologie avec les NOX2 et sont impliquées dans la synthèse des hormones thyroïdiennes mais aussi dans la défense des épithéliums (Geiszt M, 2004).

L'interaction des isoformes Nox-1 et Nox-4 avec TLR4 après traitement par le LPS (ligand de TLR4) dans différents types cellulaires, comme les cellules embryonnaires rénales HEK293, suggère un rôle de ces isoformes dans les défenses immunitaires (*Park HS, 2004*). En revanche, d'autres données indiquent que la surexpression ou la dérégulation des Nox1, 4 et 5 pourrait avoir un rôle dans la croissance importante des cancers (angiogénèse) ; les Nox pourraient ainsi constituer de nouvelles cibles thérapeutiques en oncologie (*Lambeth JD, 2004*).

Au niveau des lymphocytes T, les expériences sur des modèles murins déficients pour les gènes codant les sous-unités p47^{phox} ou gp91^{phox} ont révélé une diminution de la production d'H₂O₂ issue de la dismutation d'O₂⁻, en réponse à une activation du TCR (*Jackson SH, 2004*). De même, des expériences avec Rac1 muté (N17) montrent une diminution significative d'O₂⁻ par des LT activés (*Devadas S, 2002*). Ces données suggèrent que la production d'O₂⁻ par les NOX est essentielle à l'activation des lymphocytes T. D'autre part, cette production d'oxydants par les NOX, à l'issue d'une stimulation du TCR, est essentielle à la fonction immunosuppressive des Treg. En effet, des Treg issus d'un modèle murin délétère pour le gène codant Ncf1 (p47^{phox}) ne peuvent plus inhiber la prolifération des T effecteurs. Le traitement par des antioxydants (comme la N-acétyl-cystéine (NAC)) reproduit les mêmes résultats (*Efimova O, 2011*).

2.2.2.2. Autres sources d'anion superoxyde

Les autres enzymes synthétisant des ERO sont la xanthine oxydase, les cyclo-oxygénases (COX), les lipo-oxygénases, et les enzymes du réticulum endoplasmique lisse (cytochrome P450) (*Cai H, 2000*). La xanthine oxydase catalyse l'oxydation de la xanthine en acide urique, nécessitant pour cela la réduction de l'O₂ et la production d'O₂⁻ (*Harrison, 2002*). La xanthine oxydase est essentiellement exprimée par les cellules endothéliales vasculaires dans le foie et l'intestin. L'administration d'un inhibiteur de l'enzyme diminue la genèse d'ERO dans le poumon de rat et indique leur importance dans ce tissu (*Saito S, 2005*).



L'acide arachidonique (AA) ou acide eicosatétranénoïque peut être libéré par des lipides membranaires sous l'action de lipases. Elle peut subir l'action d'oxygénases telles que les lipoxygénases (LOX) et les cyclooxygénases (COX) (*Kuehl FA Jr, 1980 ; Cai H, 2000 ; Kim C, 2008*) qui la convertissent en prostaglandine E2 (PGE2) et leucotriènes, des médiateurs lipidiques.

Cette réaction libère de l'O₂⁻. L'isoforme COX-1 est présente dans une majorité de cellules. La COX-2 est essentiellement présente dans les cellules endothéliales, où elle participe au processus inflammatoire et elle est également retrouvée dans les fibroblastes pulmonaires. En outre, notre équipe a montré que l'exposition des fibroblastes à la PGE2 accentue la production d'ERO, chez des patients atteints de BPCO (*Dagouassat M, 2013*).

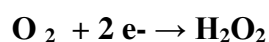
L'apparition d'O₂⁻ peut aussi résulter de l'oxydation spontanée de composés tels que des catécholamines (dopamine). Ces composés sont facilement oxydables en présence d'ions métalliques (Fe²⁺ ou Cu²⁺), au niveau de leur structure dihydroquinone (*Klegeris A, 1995 ; Stokes AH, 1999*). L'H₂O₂ constitue une autre ERO qui est très impliquée dans les fonctions physiologiques et également délétères d'une cellule (voir plus loin).

2.2.3. Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et ses sources de production

L'H₂O₂ se forme par dismutation de l'O₂⁻ sous l'action d'enzymes :



Ou par la réduction bivalente de l'oxygène :



Contrairement à l'O₂⁻, il est relativement stable et peut diffuser à travers la membrane plasmique et reste plus stable en dehors de la cellule qu'à l'intérieur en raison d'un environnement plus réducteur (*Rutault K, 1999*). Il existe ainsi un effet paracrine de cette ERO qui peut diffuser d'une cellule à l'autre (*van Reyk DM, 2001 ; Matsue H, 2003*). De plus, il réagit généralement avec des protéines avec une préférence particulière pour les résidus cystéines (SH) (décrit plus loin). Dans ce paragraphe sera exposé l'ensemble des systèmes enzymatiques impliqués dans la formation du peroxyde d'hydrogène : les superoxydes

dismutase 1 à 3 (SOD), le cytochrome p450, les peroxysomes et la famille des amino-acides oxydases (Figure 16).

2.2.3.1. La superoxyde dismutase (SOD)

Il existe trois isoformes chez l'homme : la SOD à cuivre ou zinc (SOD1 ou Cu Zn -SOD) se trouvant dans le cytoplasme, la SOD à manganèse (SOD2 ou Mn-SOD), dans les mitochondries et la SOD extracellulaire (SOD3 ou EC-SOD) (*Shull S, 1991 ; Fridovich I, 1995 ; Okado-Matsumoto A, 2002*).

L'élaboration d'une molécule de synthèse (Mitovitamine E), mimant les effets de la SOD-2 (*Dhanasekaran A, 2005 ; Covey MV, 2006*), a montré une diminution drastique de la formation d' H_2O_2 dans les TCD4+ de souris sauvages (*Sena LA, 2013*). De même, des LT périphériques activés ou des lignées de Jurkat T, traités directement par du MnSOD, montrent également une diminution significative du niveau d' H_2O_2 (*Kaminski M, 2007 ; Kaminski MM, 2010 ; Kamiński MM, 2012 ; Gill T, 2013*). Comme nous l'avons décrit précédemment cette production d'ERO par la mitochondrie est essentielle à l'activation antigène spécifique des lymphocytes (*Sena LA, 2013*). De plus, une surexpression de MnSOD prévient une activation exacerbée des LT et démontre un effet paracrine de l'ERO (*Kamiński MM, 2012*) (Figure 16).

Mises à part les SOD, d'autres enzymes comme les mono-oxygénases sont capables de produire l' H_2O_2 . Nous décrirons brièvement ces enzymes.

2.2.3.2. Le Cytochrome P450 et le peroxysome

Les enzymes de la famille cytochrome P-450 (CYP) sont des hémoprotéines du réticulum endoplasmique qui catalysent une mono oxygénation à partir de l' O_2 , un atome d'oxygène étant transféré au substrat (RH) et l'autre étant réduit. Au cours de la réaction de synthèse de l' O_2^- et de l' H_2O_2 peuvent être produites.

Le peroxysome est un organite possédant une membrane unique et contient des enzymes dégradant les acides gras et des acides aminés qui conduisent à former un dérivé secondaire

l' H_2O_2 . Les ERO étant toxiques une importante quantité de l'enzyme anti-oxydante la catalase (cf. plus loin) est également localisée dans l'organite.

2.2.3.3. Les aminoacides oxydases.

La voie principale de la dégradation des acides aminés met en jeu une étape de transamination (transfert du groupement amine à un α -cétoacide) suivie d'une étape de désamination oxydante par la glutamate déshydrogénase. Néanmoins, il existe une voie mineure qui implique l'oxydation directe de l'acide aminé par une L-acide aminé oxydase (LAAO) ou amine oxydase qui utilise des coenzymes la Flavine Mono Nucléotide (FMN) ou la Flavine Adénine Dinucléotide (FAD). La forme réduite des cofacteurs à l'issue de la désamination $FMNH_2$ ou $FADH_2$ est réoxydée par l' O_2 pour former l' H_2O_2 (Mondovi B, 1984 ; Gaweska H, 2011) (Figure 16).

Elles sont classées selon trois groupes :

- FAD-amine oxydases (monoamines, les polyamines) (MOA)
- les amines oxydases carbonylés dépendantes (di-amine oxydases (DAOs))
- les amine-oxydases sensibles au semicarbazide (SSAO))

Elles sont impliquées dans des mécanismes cellulaires comme la prolifération, la différenciation cellulaire et l'apoptose (Vindis C, 2000 ; Toninello A, 2004 ; Polgár E, 2007). Ces enzymes catalysent la désamination oxydative des amines primaires aliphatiques et aromatiques issus des acides-aminés, ainsi que des amines secondaires et tertiaires. Elles sont généralement localisées au niveau de la membrane externe des mitochondries (Gaweska H, 2011 ; Upadhyay AK, 2008). Des expériences de mutagenèse dirigée et la construction de protéines chimériques ont permis d'identifier les séquences de l'enzyme responsable de la liaison avec des substrats et de leur activité catalytique. Plusieurs acides aminés ont été identifiés, nous porterons l'attention sur la phénylalanine qui correspond à une partie de l'étude de mon projet. En effet, un rôle pour la spécificité au substrat correspondant à la phénylalanine 208 de la MAO-A a été montré (Tsugeno Y, 1997).

A. L'enzyme IL-4i1

Une première étude a identifié une séquence d'ADNc issus de cellules B murines activées par l'IL-4, apparentée aux MAO et résistante à un antifongique, la cycloheximide (*Chu CC, 1997*) ; elle est nommée mFig1 ou mL-4i1. De plus, elle partage 37% d'homologie avec la structure primaire du venin de serpent ayant une activité MAO (*Raibekas AA, 1998*). Chez l'homme, hFig1 partage 43% d'homologie avec mFig1 au niveau de la région codant l'activité LAAO alors que les séquences carboxy-terminal ne montrent que 11% de similarité ; elle est également exprimée par les LB (*Chavan SS, 2002*). D'autre part, il est démontré que l'expression de mFig1 est restreinte aux tissus lymphoïdes spécifique des cellules B activés, mais qu'elle est également induite dans les lymphomes médiastinaux à grandes cellules b (*Copie-Bergman C, 2003*).

L'équipe de Boulland ML et collaborateurs montre pour la première fois une spécificité pour l'acide aminé L-phénylalanine. Dans cette étude, une activité anti-proliférative de l'IL-4i1 sur les TCD8⁺ et TCD4⁺ est mis en évidence par les DC et suggèrent une fonction immunorégulatrice (*Boulland ML, 2007*). Par la suite, l'enzyme est identifiée dans les lysosomes (*Mason JM, 2004*) et dans les tumeurs associées aux macrophages (*Carbonnelle-Puscian A, 2009*). Il est montré *in vitro* que son expression est induite en réponse à des stimuli inflammatoires, l'activation de NFκB et/ou STAT1 (*Marquet J, 2010*). En raison de son implication dans les tumeurs associées aux macrophages et sa capacité à inhiber la prolifération des LT, Lasoudris.F et collaborateurs ont mis en place un modèle de mélanome murin coexprimant IL-4i1 de manière constitutive et GP33 (épitope de la tumeur). Les résultats indiquent que les cellules exprimant IL-4i1 développent plus la tumeur ; l'IL-4i1 supprime la réponse anti-tumorale des TCD8⁺ (*Lasoudris F, 2011*).

Depuis peu, Santarlaschi et collaborateurs ont montré que l'IL-4i1 diminue l'expression de la chaîne zeta du CD3 via l'H₂O₂ responsable des anomalies de prolifération des Th17, après une stimulation CD3/CD28. De plus, cette surexpression de l'IL-4i1 explique leur faible proportion dans les sites inflammatoires ; il pourrait être utilisé comme un marqueur caractéristique des Th17 (*Santarlaschi V, 2012*). Récemment, il a été mis en évidence que l'H₂O₂ issu de la dégradation de la L-phénylalanine participe aux propriétés antibactériennes des cellules dendritiques et macrophages (*Puiffe ML, 2013*).

2.2.4. Le radical hydroxyle OH·

L'OH· est la plus réactive des ERO. Il est particulièrement délétère et se forme par :

- la réaction de Fenton en présence du Fe²⁺
- la réaction de l'H₂O₂ avec l'O₂⁻ (réaction de Haber-Weiss)
- Sous l'effet de radiations ionisantes (rayons X ou gamma).

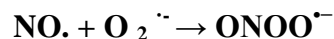
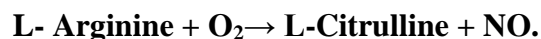
De par sa demi-vie courte, il diffuse peu et agit directement sur le site de production. La réaction de Fenton implique des métaux de transition ion ferreux Fe²⁺. L'oxydation de Fe²⁺, en ion ferrique Fe³⁺ en présence de peroxyde d'oxygène H₂O₂, génère le radical hydroxyle.

Réaction de Fenton (Figure 16):



2.2.5. Monoxyde d'azote et les peroxynitrites

En dehors des ERO, il existe les espèces réactives de l'azote (ERN) dont le représentant principal est le monoxyde d'azote (NO) qui est synthétisé par les NO synthases (NOS) selon la réaction :



Le NO est peu réactif mais peut réagir avec l'O₂⁻ pour former des molécules plus toxiques comme le peroxynitrite (ONOO^{•-}) (Figure 16). Ce dernier est capable d'oxyder des cibles, (*Lefter AM, 1999*) telles que les thiols, certaines protéines, les bases de l'ADN, et d'affecter l'intégrité mitochondriale (*Beckman JS, 1996*).

Les dommages à l'ADN se font au niveau des bases purines et pyrimidines dont la guanine est la cible privilégiée. L'oxydation de la guanine génère de la 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodGuo) (*Helbock HJ, 1999 ; Cadet J, 1999 ; Cadet J, 2002*).

La chaîne respiratoire et ses différents composants mitochondriaux (complexe de la chaîne respiratoire, membrane, ADN...) sont également affectés par le ONOO⁻ (Shiva S, 2004). La nitration des protéines secondaire à la formation de peroxy-nitrite participe à de nombreux processus pathologiques mais représente aussi un des marqueurs du stress nitrosatif. Lors de réactions inflammatoires, une augmentation de la production d'O₂⁻ et de NO peut être observée, et augmenter le taux de ONOO⁻ (Pacher P, 2007). De surcroît, le NO amplifie cette réaction en inhibant la chaîne respiratoire mitochondriale ce qui empêche le transfert des électrons du cytochrome c à la sous-unité I du cytochrome oxydase, et aboutit à une production accrue d'O₂⁻ et de fait de ONOO⁻ (Poderoso JJ, 1996).

D'autre part, il a été démontré que la fumée de cigarette contient des taux élevés de ce composé (Pryor WA, 1991 ; Heitzer T, 1996 ; Yamaguchi Y, 2007). La fumée de cigarette constitue donc une source exogène d'ERO.

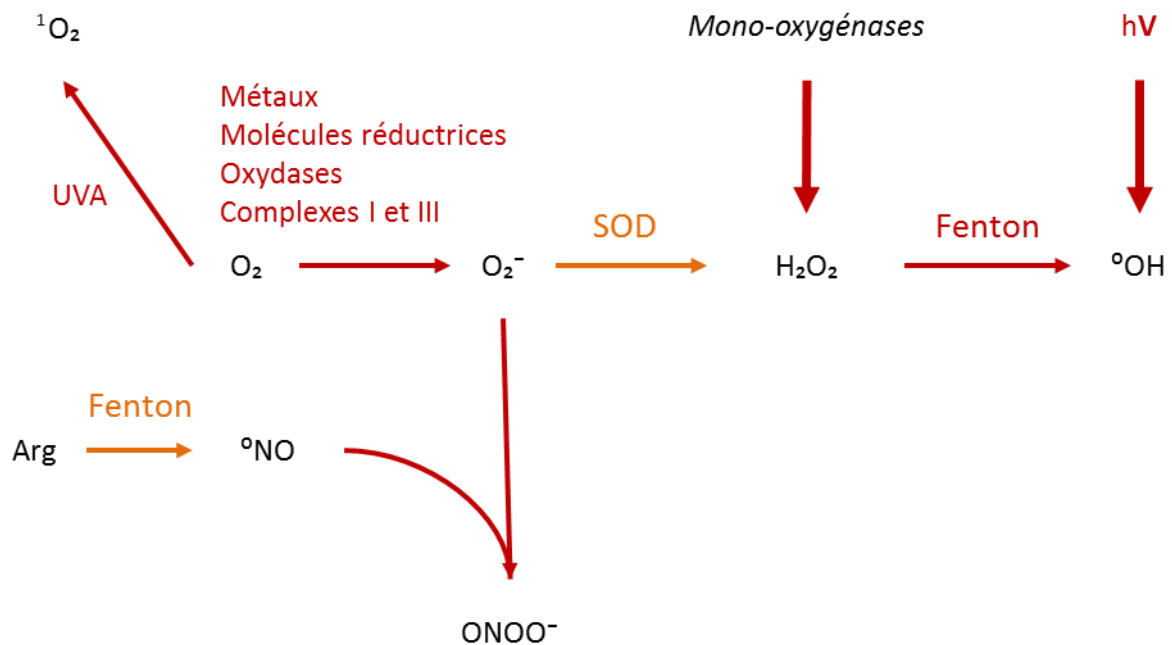


Figure 16. Voie métabolique de l'oxygène et des ERO (sans le système antioxydant). Ce schéma résume l'ensemble des systèmes producteurs d'ERO. La production d'O₂⁻ par les complexe I et III de la mitochondrie ou la NADPH oxydase ; en ce qui concerne l'H₂O₂, il provient principalement de la dismutation de l'O₂⁻ via SOD mais peut être également produit par les mono-oxygénase dont IL-4i ; l'ONOO⁻ provient de la réaction entre le NO et l'O₂⁻ ; l'OH⁻ provient de la réaction de fenton.

2.3. Sources exogènes d'oxydants

A côté des sources endogènes d'ERO que nous venons de décrire, les ERO peuvent également être générées sous l'effet d'oxydants environnementaux auxquels nous sommes exposés : la pollution atmosphérique, le tabagisme, les métaux lourds, l'exposition prolongée aux radiaisons UVB du soleil ou les xénobiotiques, entre autres.

Les métaux lourds comme le cadmium, le mercure ou l'arsenic sont souvent trouvés dans l'environnement (sol, air et eau). Il a été montré que ces métaux lourds ont la capacité de générer des ERO, provoquant des dommages cellulaires importants en diminuant les activités enzymatiques, et au niveau de l'ADN (*Flora SJ, 2008*). Les radiations UV, notamment les UV B, génèrent de l'oxygène singulet et provoquent des dommages au niveau de l'ADN (*Sutherland BM, 1980*). L'exposition à des xénobiotiques (pesticides, amiante, antibiotiques) favorise la production de radicaux libres, par voie mitochondriale, ou via le cytochrome p450 (*Halliwell B, 1999*).

La fumée de cigarette constitue une source importante d'oxydants exogènes, surtout dans le cadre de la physiopathologie de la BPCO. Nous allons décrire sa composition en détail.

2.3.1. Composants de la fumée de cigarette

La fumée de cigarette peut être définie comme un aérosol constitué d'une phase gazeuse et d'une phase particulaire. La phase particulaire représente une fraction minoritaire comprise entre 4 à 9% de la masse totale de la fumée alors que la phase gazeuse constitue les 91-96% restants. Ainsi, la combinaison des deux forme la fumée totale (Figure 17) (Clunes LA, 2008).

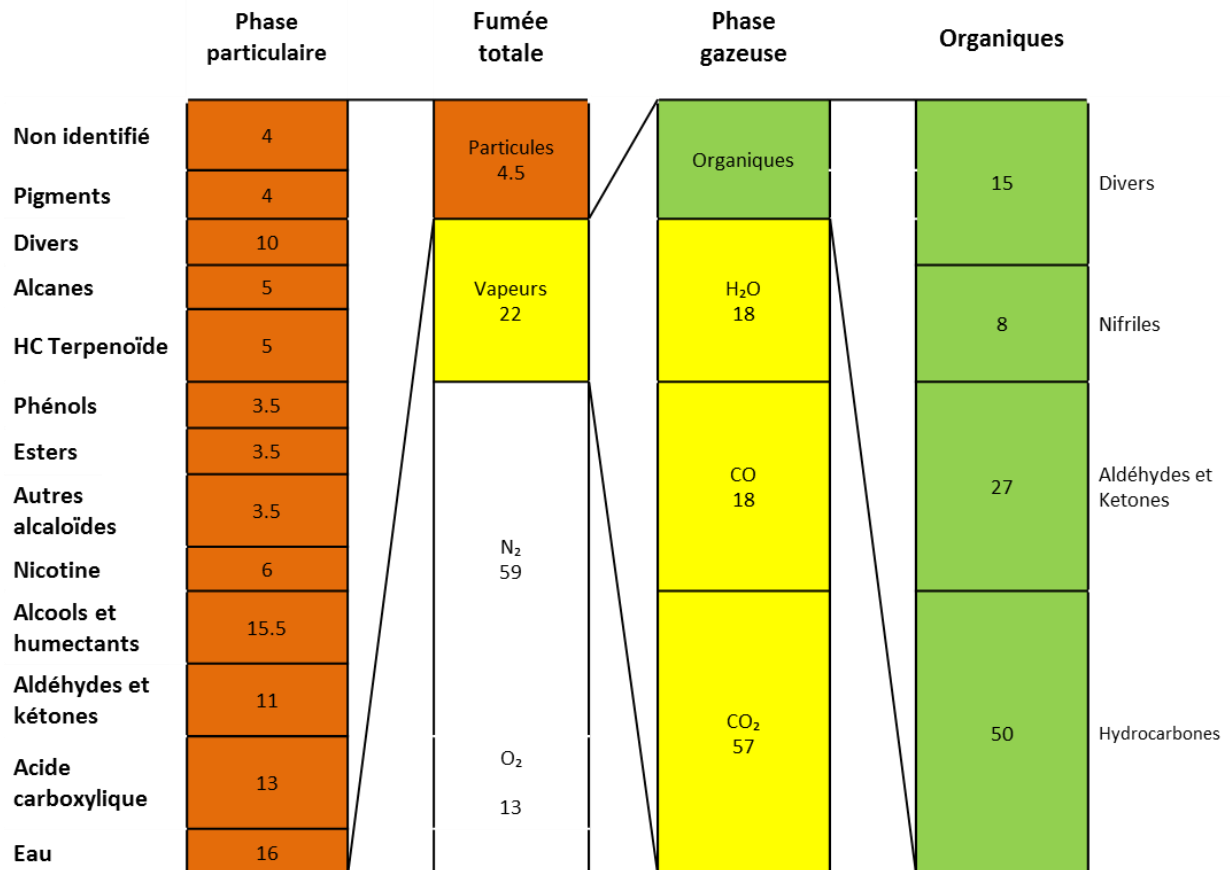


Figure 17. La composition de la fumée de cigarette totale

L'analyse chimique des composants de la fumée de cigarette se fait au moyen d'une machine à fumer constitué d'un filtre en verre, appelé filtre de Cambridge, qui permet la rétention de la phase particulaire correspondant au goudron. Nous nous intéresserons à la phase gazeuse et plus particulièrement aux composants solubles. Le tableau 4 permet une appréciation des constituants les plus importants dans la phase gazeuse de la fumée tels que la nicotine, l'acroléine, les dérivés nitrés, les dérivés oxygénés, benzène, du nickel ... ainsi que d'autres composés (isoprène, acrylonitrile) (Hoffmann D, 1997). Il est également identifié de très grandes quantités de radicaux

libres, environ 10^{14} par bouffée, dont la majorité sont des radicaux alkoxy ($RO\bullet$) et peroxy ($RO_2\cdot$) (cf. annexes) (Church DF, 1985 ; Laugesen M, 2005).

Classe	Nombre d'espèces dans la classe
Amides, imides, lactams	237
Acides Carboxyliques	227
Lactones	150
Esters	474
Aldéhydes	108
Ketones	521
Alcools	379
Phénols	282
Amines	196
N-Hétérocycles	921
Hydrocarbures	705
Nitriles	106
Anhydrides	11
Carbohydrates	42
Ethers	311
Inorganiques	50
Total	4720

Composition	En phase gazeuse (%)
Acétaldéhyde	98
Acroléine	93
Benzène	78
Formaldéhyde	68
HCN	50
Acétone	34
Organique	< 2

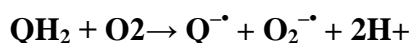
Tableau 4 . Les principaux constituants de la fumée de cigarette (Chuan Liu 2011)

Dans les études expérimentales, y compris celles effectuées pendant ma thèse (voir chapitre II), des extraits de la fumée de cigarette sont récupérés par un système de « bullage », qui consiste à mélanger la phase gazeuse de la fumée dans un milieu de culture, c'est le condensat de fumée de

cigarette (CFC). Il représente 5% des particules solubles de la phase gazeuse de la fumée totale (la phase particulaire est filtrée) (*St-Laurent J, 2009*). Le choix de ce modèle est justifié par le fait qu'immédiatement après l'inhalation de la fumée celle-ci entre dans un environnement plus humide et que les espèces réactives formées en solution aqueuse sont différentes de celles formées dans l'air ambiant.

2.3.2. Composants du condensat de fumée de cigarette (CFC)

De nombreux composants sont suggérés, comme acteur, dans la production d'espèces réactives de l'oxygène. Parmi eux, le dihydrobenzène est un bon candidat. En effet, l'oxydation des hydroquinones (QH₂) par l'oxygène génère une semi-quinone et de l'anion superoxyde, en solution aqueuse.



Une dismutation de l'O₂^{·-} spontanée ou catalytique par la SOD produit de l'H₂O₂.



En présence, d'ions métallique de transition comme Fe²⁺, il se forme le radical hydroxyle



2.3.2.1. L'anion superoxyde (O₂^{·-})

L'équipe de Frejaville a identifié l'O₂^{·-} dans le CFC issu d'une solution contenant le 5-Diethoxyphosphoryl-5-méthyl-1-pyrroline-N-oxide (DEPMPO) (*Frejaville C, 1995*). Le DEPMPO piège l'O₂^{·-}.

2.3.2.2. Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et l'OH⁻

Grâce à une méthode polarographique, Nakayama et collaborateurs découvrent que le CFC formée dans une solution phosphate (PBS) a des niveaux élevés d'H₂O₂. Au bout de 4h les concentrations passe de 37 à 123 µM. Cependant, la technique fluorimétrique AMplex Red a montré que les niveaux d'H₂O₂ du CFC de PBS sont négligeables par rapport à ceux issus de la fumée totale (Yan F, 2005).

2.3.2.3. Peroxynitrite

Le NO et le ONOO⁻ sont les composants majeurs de la fumée de cigarette (Counts ME, 2005). Dans les solutions de CFC, les composants réagissent entre eux pour former les alkyls peroxynitrite. En effet, l'oxydation de l'hydroquinone génère de l'O₂⁻ qui réagit avec le NO pour former le ONOO⁻ (Halliwell B, 1999 ; Church DF, 1985 ; Pryor WA, 1983 ; Pryor WA, 1984). Ce composé est identifié comme un marqueur du stress oxydatif (ou Nitrosatif) induit par les particules solubles de la fumée. Après avoir déplété une partie du contenu en glutathion intracellulaire, il réagit avec des cibles biologiques : la tyrosine (nitrotyrosine) ou les guanines ou les lipides (Müller T, 1994 ; Müller T, 1998 ; Muller T, 1997).

En résumé, les constituants de la fumée de cigarette ont une forte capacité à induire des oxydations irréversibles délétères et à dépléter les contenues en glutathion. Les dommages causés par la fumée de cigarette et CFC *in vivo et vitro* au niveau de l'ADN, des lipides, et des protéines, sont largement décrits. Certains composés réactifs de la cigarette (ERO ou acroléine) peuvent interagir avec les composants cellulaires pour former des espèces comme le 4-hydroxynonanal ou des ERO intracellulaires.

En effet, les composant du CFC dont l'acroléine est capable d'induire une production d'O₂⁻ via la xanthine oxydase ou NADPH oxydase des cellules endothéliales (Czernin J, 1995 ; Orosz Z, 2007 ; Jaimes EA, 2004). Le CFC (l'acroléines et ONOO⁻) induit également un stress oxydatif au niveau de la mitochondrie des cellules épithéliales pulmonaires (Hara H, 2013 ; Anbarasi K, 2005 ; Jia L, 2007 ; Slebos DJ, 2007 ; Pacher P, 2007). Ces composés activent des voies de signalisations sensibles aux concentrations élevées d'ERO, comme la voie des MAPK (Pacher P, 2007) et surtout la voie NFκB (Csiszar A, 2005 ; Orosz Z, 2007). De plus, l'activation de la voie NFκB des PBMC totaux issus de fumeurs prime sur celle des non-

fumeurs. Ceci démontre une hyperactivation de la voie de signalisation NFκB impliquée dans les réactions inflammatoires, par les composants de la fumée de cigarette (*van den Berg R, 2001*).

2.4. Systèmes de détoxification des ERO

Les stratégies anti oxydantes à la fois enzymatiques et non enzymatiques sont nombreuses dans les différents compartiments cellulaires. Les composés antioxydants non enzymatiques regroupent des petites molécules hydro et liposolubles chargées de piéger les espèces radicalaires, « scavengers » alors que les enzymes antioxydantes dégradent les ERO. Tout d'abord une première ligne de défense correspondant aux systèmes non-enzymatiques et les systèmes enzymatiques. Puis une deuxième ligne de réponse formée par les systèmes de dégradation et de réparation de l'ADN, des lipides et des protéines. Enfin, la dernière ligne de réponse est un processus conduisant à la mort cellulaire.

2.4.1. Systèmes non enzymatiques

Les antioxydants sont des molécules produites par notre organisme ou apportées par l'alimentation, pour combattre les effets toxiques des ERO. Les molécules anti-oxydantes interagissant directement avec les ERO pour les réduire.

2.4.1.1. Les vitamines A, E et C

La vitamine E (α-tocophérol), liposoluble, piège les radicaux libres organiques provenant de l'oxydation des lipides, et contribue à diminuer la peroxydation lipidique (*Kamal-Eldin A, 1996*).

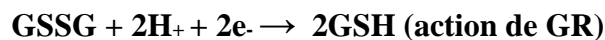
La vitamine C (acide L-ascorbique) réduit l'anion superoxyde, le radical hydroxyle, l'oxygène singulet et réduit le peroxyde d'hydrogène en eau, via l'ascorbate peroxydase (*Noctor G, 1998*).

Et pour conclure, le précurseur de la vitamine A, le β-carotène capture l'oxygène singulet O_2^1 (*Stahl W, 2002*) formé par les radiations solaires, ainsi que les radicaux OH⁻ via leurs chaînes carbonées riches en double liaison. Les acides gras polyinsaturés et les flavonoïdes sont aussi des « scavengers » des ERO. Les métaux se comportent indirectement comme des antioxydants en se fixant sur le site actif des enzymes anti-oxydantes. Un bon exemple est le

sélénium qui est un cofacteur enzymatique essentiel aux systèmes du glutathion et de la thiorédoxine (*Ganther HE, 1999*).

2.4.1.2. Le glutathion (GSH)

Le glutathion (GSH) est un tripeptide, formé d'acide glutamique, de cystéine et de glycine qui contient un groupement thiol (R-SH) (cystéines) qui lui confère ses principales propriétés antioxydantes. La glutathione synthétase et la sous-unité catalytique de la glutamylcystéine ligase (GCLC), mobilisent l'acide aminé cystéine, le glutamate et la glycine dans la synthèse du GSH. Ces deux enzymes sont **limitantes** dans la biosynthèse *de novo* du GSH (*Soltaninassab SR, 2000*). Le potentiel redox d'une cellule est indiqué par le ratio GSH couplée à sa forme oxydée GSSG (forme disulfure oxydée). Ce ratio est déterminé par les enzymes glutathion peroxydases (GPx) (§2.4.2.2.C Systèmes enzymatiques) impliquées dans la catalyse de la réaction de réduction de l'H₂O₂ et la glutathion réductase (GR) (Figure 21) (*Ostergaard H, 2004*).



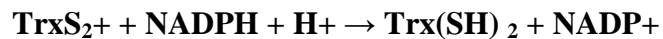
Sous sa forme réduite, le GSH interagit avec presque toutes les ERO (OH⁻, ¹O₂, H₂O₂, HOCl, ONOO⁻, RO⁻, RO₂⁻) directement ou indirectement via la réaction couplée à la glutathion peroxydase et occupe donc une place de pivot dans la mise en jeu des voies de défenses anti-oxydative (*Griffith OW, 1999*) (*Griffith et Mulcahy, 1999*).

En condition normale, l'état redox intracellulaire est très réduit par la présence des thiols. Une diminution du ratio GSH/GSSG indique un état oxydant élevé comme un stress oxydatif, et dans le cas contraire qu'un environnement réducteur prend l'ascendant. De plus, une étude a montré que la modulation de ce ratio par des traitements antioxydants comme la N-acétyl cystéine (précurseur du glutathion) ou des inducteurs d'oxydants, la Pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC), définit vers une voie de signalisation particulière, sur des cellulaires épithéliales alvéolaires. Un environnement pro-oxydant stimule la voie NFκB (*Haddad JJ, 2000*).

Des travaux récents ont montré qu'un environnement réducteur favorise la prolifération des LT. En outre, les LT effecteurs sont incapables de produire leur propre GSH intracellulaire et dépendent des DC qui leur fournissent les cystéines. Les Treg interfèrent dans ce mécanisme en inhibant les DC, ce mécanisme constitue l'un des mécanismes immunosuppresseurs des cellules T régulatrices. (Yan Z, 2010).

2.4.1.3. La Thiorédoxine (Trx)

Il existe également les Thiorédoxines (Trx) qui sont des dithiols-disulfides (SH)₂ oxydoréductases catalysant la réduction des disulfures en leurs formes sulfhydryles correspondantes. Sur le même principe que le GSH, le système Trx comprend une sélénoenzyme réductase TrxR pour le maintien de la forme réduite Trx et des autres protéines disulfures (Figure 21) (Arner ES, 2009). Les Trx interviennent dans un nombre important de phénomènes cellulaires comme la prolifération. Elles réduisent l'H₂O₂ en collaboration avec les peroxyredoxines §2.4.2.2 E)



Les thiorédoxines sont en faible concentration par rapport aux GSH et aux autres anti-oxydants. Elles semblent être spécifiques de certains types cellulaires. Cependant, un lien potentiel entre la Trx, le GSH et la GR a été établi dans des cellules primaires de testicule. La formation de pont disulfure entre les 2 protéines pourrait avoir un rôle important dans les voies de signalisation lors d'un stress oxydatif (Casagrande S, 2000).

L'équipe de Mougiakakos et collaborateurs a montré que dans la sous-population régulatrice Treg le contenu en thiol est plus important que les populations T effecteurs ; ce qui les protège de la mort cellulaire induite par un stress oxydatif (Mougiakakos D, 2009). Une étude complémentaire de la même équipe montre que les niveaux de Thiorédoxine et de fait de la thioréductase réductase sont responsables de cette résistance à la mort cellulaire induite par le stress oxydatif (Mougiakakos D, 2011).

2.4.2. Systèmes enzymatiques

2.4.2.1. Le Nuclear factor erythroid-derived 2-like (Nrf2)

Nrf2 est un facteur de transcription sensible à une augmentation d'oxydants. Dans les conditions physiologiques, Nrf2 est lié à kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1), une protéine qui empêche sa translocation nucléaire et participe à sa dégradation par le protéasome (culin3). Des études sur des modèles murins déficients pour Keap1^{-/-} montrent une létalité postnatale des souriceaux due à une surproduction des protéines anti-oxydantes, en l'absence de toute stimulation (Wakabayashi N, 2003). Cette réponse anti-oxydante élevée est également observée *in vitro* dans des kératinocytes dont l'expression de Keap1 est supprimée par interférence ARN, en condition basale (Devling TW, 2005). Une étude *in vitro* montre qu'un traitement par un anti oxydant CuDIPSH, mimant l'activité de la SOD, augmente l'expression de Nrf-2 alors qu'un traitement par la catalase supprime l'expression. Ces faits démontrent qu'un stress induit par l'H₂O₂ est susceptible d'induire Nrf2 (Pi J, 2003). De plus, une perturbation du ratio GSSG/2GSH par un stress oxydatif active également Nrf2 (Li T, 1997). En effet, Nrf2 exerce un rôle de signal en induisant, à un niveau transcriptionnel, la réponse cellulaire adaptée au stress oxydant par la mise en place d'un système de défense via la transcription des gènes codant les enzymes anti-oxydantes (Figure 18). De nombreuses enzymes anti-oxydantes dépendant de Nrf2 (Tableau 5)

En situation de stress oxydatif (augmentation des niveaux d'ERO), le facteur de transcription DJ-1 stabilise Nrf2 en provoquant sa translocation nucléaire et le libérant de Keap1 pour qu'il interagisse avec un élément de réponse antioxydant (ARE) sur les promoteurs de gènes codant pour les protéines antioxydantes (Figure 18) (Wasserman WW, 1997). Les séquences ARE peuvent aussi se fixer à BACH1 et activating transcription factor 3 (ATF3). Lors d'une augmentation du niveau d'ERO intracellulaire, il a été montré que BACH1 et ATF3, de la famille des b leucine zipper, se détachent des ARE et sont exportés dans le cytoplasme, permettant l'accessibilité de la séquence ARE pour NRF2 (Sun, 2002 ; Dhakshinamoorthy S, 2005 ; Brown SL, 2008).

Par ailleurs, l'oxydation des cystéines de Keap1 et la phosphorylation de Nrf2 permettent la dislocation du complexe et Nrf2 peut être transloqué au noyau et jouer son rôle de facteur de

transcription en se liant au domaine ARE Nrf-2, en collaboration avec un complexe transcriptionnel. Ce dernier induit la transactivation de gènes codant : les enzymes impliquées dans la biosynthèse du glutathion (GCLC, GR et glutathion S-transférase), du NADPH, les Trx, TrxR, Prx, de même que l'Hème Oxygénase-1(HO-1) (Boutten A, 2010 ; Kwak MK, 2003) (Tableau 5).

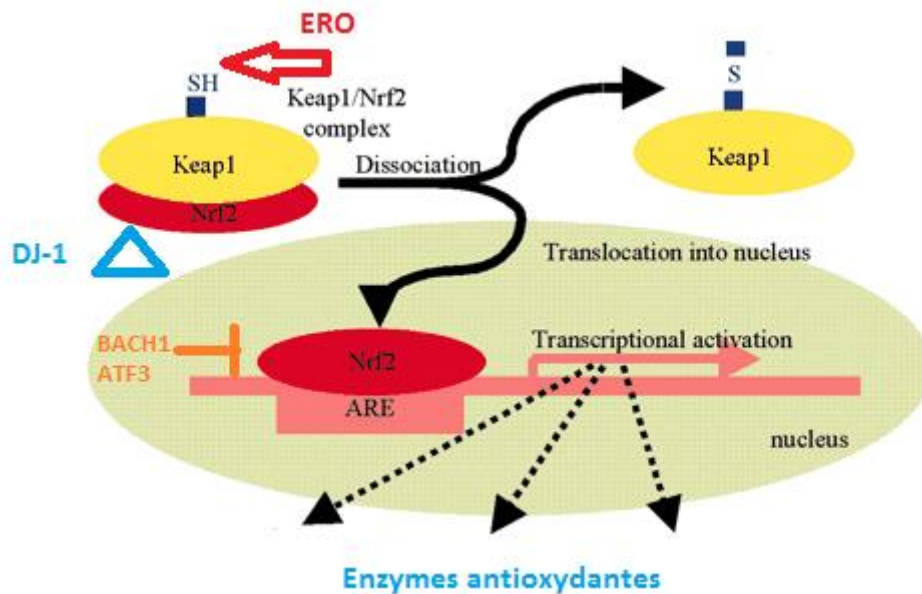


Figure 18. Régulation de la translocation nucléaire de Nrf2 . A l'état basal, l'expression de Nrf2 est maintenue à un niveau bas dans la cellule par sa liaison à Keap1, permettant son adressage au protéasome. Lors d'un stress oxydatif, les ERO oxydent des cystéines de Keap1 et la phosphorylation de Nrf2 permettent la dislocation du complexe et Nrf2 peut être transloqué au noyau et jouer son rôle de facteur de transcription en se liant au domaine ARE pour induire l'expression des enzymes anti-oxydantes. ATF3 et BACH1 sont des inhibiteurs transcriptionnels. Un niveau élevé d'ERO les exporte dans le cytoplasme afin de libérer l'accès à la séquence ARE pour Nrf2 (adapté de T. Satoh, 2006).

Des modèles murins déficients pour Nrf2 présentent :

- Une protection face à l'emphysème induit par l'exposition à la fumée de cigarette (*Iizuka T, 2005*)
- Une susceptibilité aux asthmes allergiques via une augmentation de la réponse Th2

Cette dernière étude a montré que la délétion du gène Nrf2 dans les cellules dendritiques augmente la production d'ERO et favorise une différenciation Th2 des lymphocytes Th0, après une exposition aux aéropolluants. En revanche, les DC issus de souris Nrf2^{+/+} produisent moins d'ERO que les souris Nrf2^{-/-} et induisent une réponse Th1. L'absence de Nrf2 et de ce fait l'augmentation d'ERO favoriserait la susceptibilité aux maladies allergiques (*Williams MA, 2008*).

Classification fonctionnelle	Description des gènes
Enzymes antioxydantes	Superoxyde dismutase (SOD1, SOD2, SOD3), Catalase, Glutathion peroxydase (GPx2, GPx3, GPx4), Glutathion reductase (Gr), Thioredoxine (Trx), Thioredoxine reductase (TrxR), Peroxyredoxine (Prx1, Prx3), Glutamate cysteine ligase (GCL)
Enzymes antioxydantes de la phase	Glutathione-S-Transférases (GSTs, GSTA, GSTT, GSTP, GSTM, GSTO), UDP-glucoronyl transférase (UGT), Epoxyde hydrolase, NAPD(H) : quinone oxydoréductase 1 (NQO1)
Protéines et enzymes cytoprotectrices	Hème oxygénase 1 (HO-1), Ferritine

Tableau 5. Enzymes anti-oxydantes régulées par Nrf2

2.4.2.2. Enzymes anti-oxydantes

Le système de la SOD et la catalase sont les systèmes antioxydants les plus importants en comparaison du GSH et de la Trx.

A. La superoxyde dismutase

Le radical superoxyde qui présente une toxicité élevée et une réactivité importante est réduit de façon à être maintenu à un niveau de concentration assez bas par des enzymes appelées superoxyde dismutases (SOD) qui catalysent sa réduction par dismutation (Figure 19) :



Trois isoformes sont présentes chez l'homme : la SOD à cuivre et zinc (SOD1 ou Cu Zn - SOD) se trouvant dans le cytoplasme, la SOD à manganèse (SOD2 ou Mn-SOD) au niveau de la mitochondrie, et la SOD extracellulaire (SOD3 ou EC-SOD) (*Fridovich I, 1995*).

B. La catalase

Comme nous l'avons précisé précédemment (§2.2.2.2), cette enzyme est présente dans les peroxysomes. Il s'agit d'un tétramère formé de quatre hèmes, chacun atome de Fer pouvant réagir avec une molécule d'H₂O₂. L'enzyme réagit donc très rapidement avec le peroxyde d'hydrogène pour former de l'eau et de l'oxygène (Figure 20) :



Cette enzyme est l'une des plus efficaces des enzymes anti-oxydantes, elle n'est pas saturable. Le fer étant son cofacteur, la catalase est essentiellement présente dans les peroxysomes hépatiques, mais aussi dans les hématies et les mitochondries de cellules cardiaques (*Putnam CD, 2000*). Takashi et collaborateurs ont montré que les lymphocytes TCD4+ et TCD8+ humains surexprimant la catalase (vecteur rétroviral) sont protégés de la mort cellulaire induite par le stress oxydatif (H_2O_2 et 4-HNE) (*Ando T, 2008*).

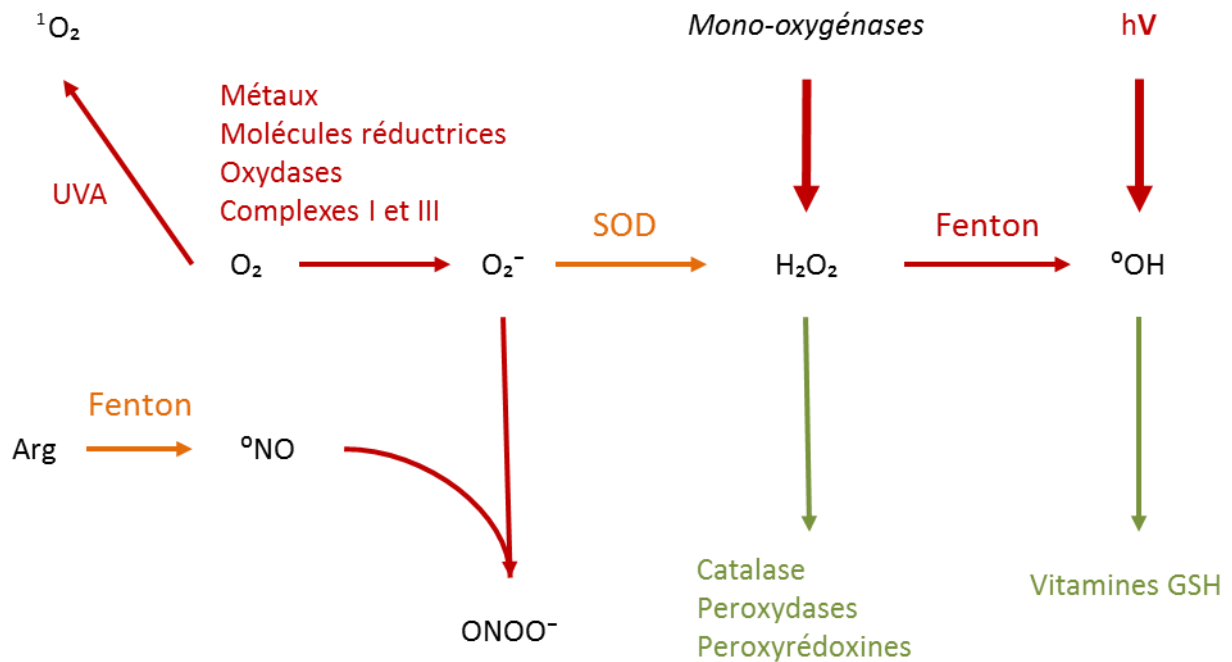
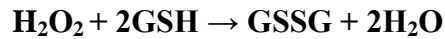


Figure 19. Voie métabolique de l'oxygène et ERO incluant les antioxydants. Les ERO issus de différents systèmes enzymatiques ou non (mitochondrie, NADPH oxydase, IL-4i1...) sont réduits par les protéines thiols (enzymes anti-oxydantes (SOD, catalase, Gpx) (Trx, GSH) et les molécules non thiols (vitamines).

C. Le glutathion peroxydase (GPx)

Le GPx constitue une des défenses antioxydantes majeures de l'organisme (§2.5.1.2). Des GPx à sélénium sont présentes dans le cytosol (cGPx), dans le plasma (pGPx) et au niveau de la membrane cellulaire (HPGPx). Il joue un rôle important dans la prévention de la peroxydation lipidique (*Arthur JR, 2000*) (Figure 21). Elles accélèrent également la réaction d'oxydation du glutathion (thiol peptidique, symbolisé par GSH) par l'eau oxygénée selon la réaction suivante :



Elle agit également sur les peroxydes organiques toxiques formés par oxydation des acides gras ou du cholestérol (*Ursini F, 1995*).

D. La glutathion réductase (GR)

La GR (§2.5.1.2) est une flavoprotéine membranaire dépendante de NADPH et FAD. Elle assure la régénération du glutathion sous sa forme réduite et a un rôle capital dans le maintien des pools de GSH ; le GSH est aussi dépendant de la voie des pentoses phosphates pour la production de NADPH.



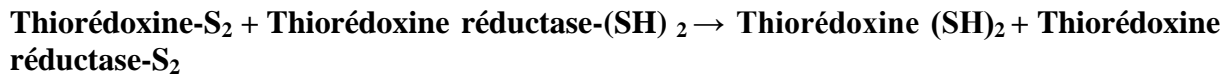
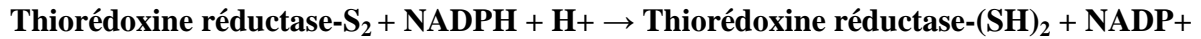
E. Peroxyredoxines (Prx)

Les peroxyredoxines (Prx) ou thiorédoxine peroxydase ont été découvertes récemment. (*Wood, 2003*). Elles possèdent deux sites catalytiques comportant des résidus de cystéines, ne dépendant pas du sélénium, et sont localisées dans le cytosol, les mitochondries, les peroxysomes, ou associées au noyau et aux membranes. Ces protéines exercent leur rôle antioxydant par réduction des ERO comme l' H_2O_2 , le peroxydrite, de nombreux hydroperoxydes mais également les alkyl hydroperoxydes, le peroxydrite et les hydroperoxydes dérivés de phospholipides ou d'acides gras, en utilisant la Trx comme réducteur (*Rhee SG, 2005*). De plus, les Prx joueraient un rôle dans la réponse à un stress oxydant pulmonaire (Figure 21) (*Kim HS, 2001*).

F. Thiorédoxine Réductase (TxnR)

La TxnR est une sélénoenzyme qui permet de renouveler les stocks de Trx sous sa forme réduite (§2.4.1.3) (Figure 21).

La réaction se fait en deux temps :



G. Glutaredoxine

Les glutaredoxines (Grx) sont aussi des (SH)₂-disulfides oxydoréductases comme les Trx, dont les fonctions catalytiques requièrent la présence de GSH. Elles catalysent la réduction des protéines disulfures en leurs formes sulfhydriles respectives (Figure 20 et 21). La forme oxydée de la Grx est alors re-réduite grâce aux équivalents réduits du GSH selon la réaction :

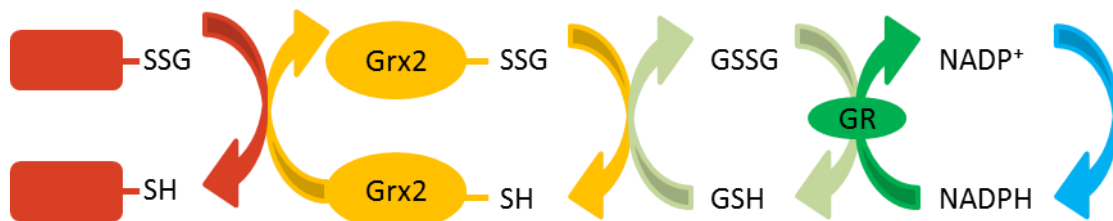
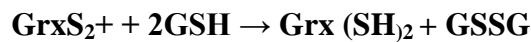


Figure 20. Réduction des ponts disulfures par les Glutaredoxines avec l'aide du GSH.

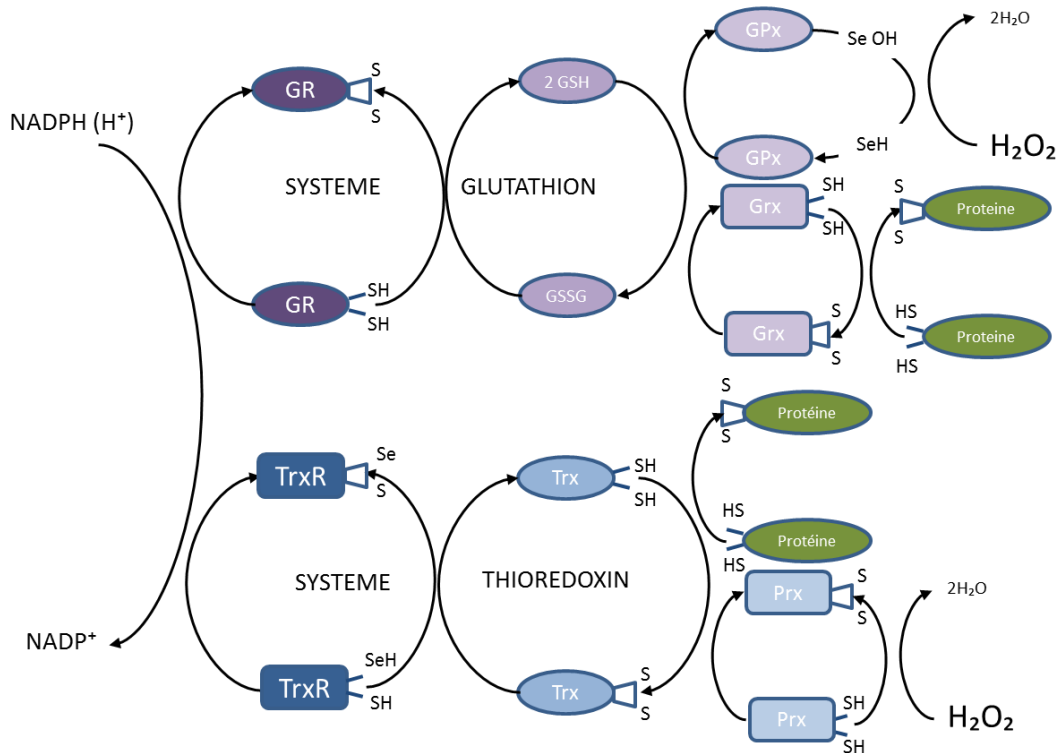


Figure 21. Schéma récapitulatif des systèmes antioxydants dépendants des thiols. Les systèmes antioxydants dépendants des groupements thiols sont constitués du système du glutathion (GR, GPx et Grx) et du système de la thiorédoxine (TrxR, Trx, Prx). Les molécules GSH et Trx réagissent directement avec les ERO et sont régénérés via les enzymes réductases et la NADPH (voie pentose phosphate)

2.5. Rôles des espèces réactives de l'oxygène

Les ERO ont longtemps été décrites comme délétères mais des études publiées les 2 dernières décades ont montré que leur existence est nécessaire pour le maintien du potentiel redox d'une cellule et la signalisation cellulaire. En effet, dans les conditions physiologiques normales, la production de radicaux libres est parfaitement contrôlée par une réponse antioxydante fine, autorisant une adaptation subtile aux niveaux de radicaux générés (*Halliwell B, 1994*). Ces ERO peuvent donc exercer à de faibles concentrations, un rôle de messenger secondaire permettant de réguler des fonctions cellulaires, et de fournir une protection contre les infections (*Halliwell B, 1999 ; Sies H, 1993 ; Dikalov S, 2007*). La production accrue d'ERO se traduit par des oxydations irréversibles au niveau des groupements thiols des protéines et non protéines, de l'ADN ou de lipides ; ceci est caractéristique d'un stress oxydatif responsable de l'altération des fonctions physiologiques

d'une cellule (Figure 22). Nous allons décrire d'abord les rôles physiologiques, puis les rôles physiopathologiques des ERO. De plus, l'inhibition des systèmes de détoxication tels que la catalase et l'ascorbate peroxydase, active certaines voies de signalisations (*Durzan DJ, 2002*).

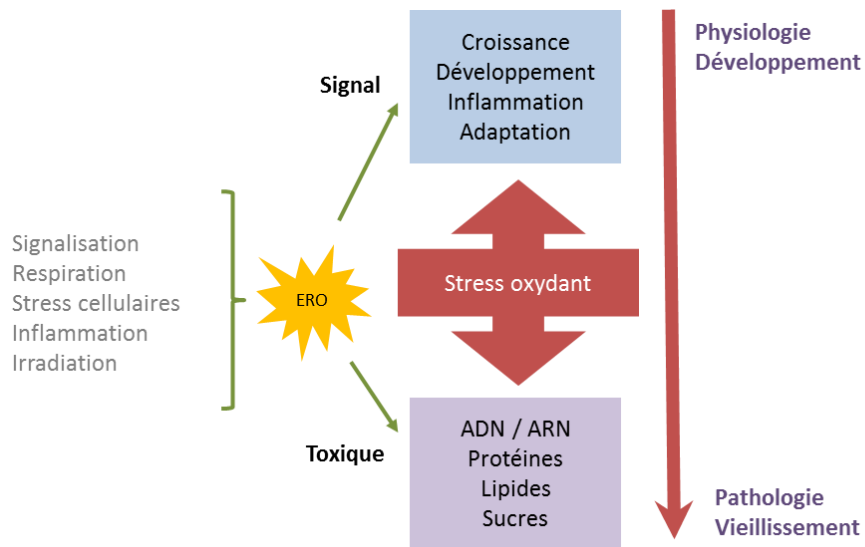


Figure 22. Nature ambivalente des ERO. A des faibles niveaux, les ERO assurent des fonctions physiologiques (inflammation, prolifération...) et à des concentrations élevées (stress oxydatif) deviennent délétères en modifiant la structures des protéines, lipides à l'origine de différentes maladies liées au vieillissement (*adapté de Barouki R, 2002*)

2.5.1. Rôle physiologique des ERO

Les ERO sont importants dans les fonctions cellulaires telles que la prolifération, les défenses immunitaires et la régulation des voies de signalisation. Dans un premier temps, les mécanismes biochimiques à l'origine de l'oxydation médiée par les ERO sera décrite puis les différentes fonctions seront détaillées en fonction des niveaux de stress oxydatif (Figure 23).

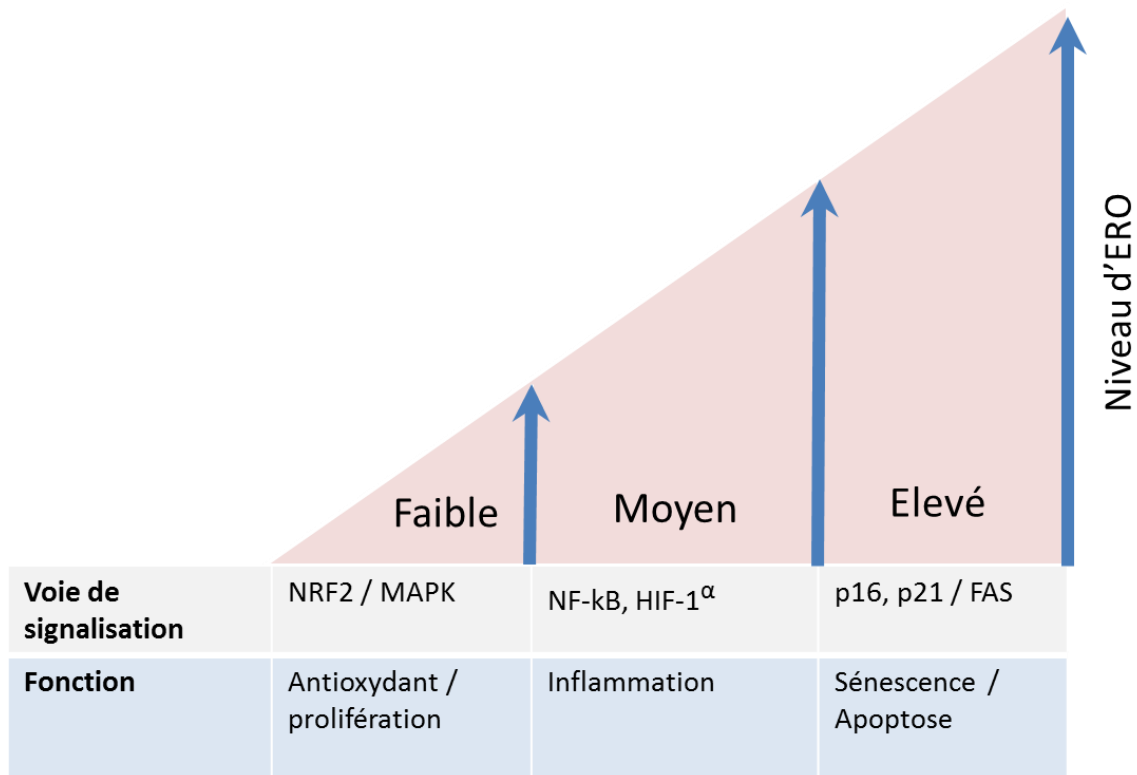


Figure 23. Modèle hiérarchique des voies de signalisations induites par les taux d'ERO. De faibles quantités d'ERO induisent le facteur de transcription Nrf-2, impliqué dans l'induction de gènes codant les antioxydants. Des niveaux moyens d'ERO activent une réponse inflammatoire et/ou hypoxique via NF-kB. Des niveaux importants provoquent la mort cellulaire par apoptose ou encore la sénescence via p16/p21.

2.5.1.1. Mécanismes d'action des ERO

Les cibles protéiques qui peuvent être oxydées de manière réversible par les ERO sont celles qui leur permettent également d'assurer un rôle physiologique. Les cystéines représentent des cibles d'intérêts, en raison de la présence des groupements thiols. En effet, les groupements thiol sont très sensibles à l'oxydation par les ERO. L'oxydation de la cystéine catalytique provoque sa réduction et la formation d'un acide sulfénique (SOH). Puis l'attaque de l'acide sulfénique par une cystéine de recyclage ou un thiol externe donne un pont disulfure qui sera régénéré à l'état initial, par réduction du pont disulfure par les thiorédoxines, glutarédoxines, glutathion (Figure 25) (Lee SR, 2002 ; Leslie NR, 2003 ; Hiroaki H, 2011). Cette étape marque le maintien du statut redox et des fonctions physiologiques. Cependant, il peut se produire une suroxydation aboutissant à la formation d'acides sulfinique (SO₂H) ou sulfonique (SO₃H), inactivant la protéine, après réaction avec une deuxième ou une troisième molécule de peroxyde (Wood LG, 2003) ; cette étape marque le stress oxydatif et une phase irréversible (Bedard K, 2007) (Figure 24 et 25).

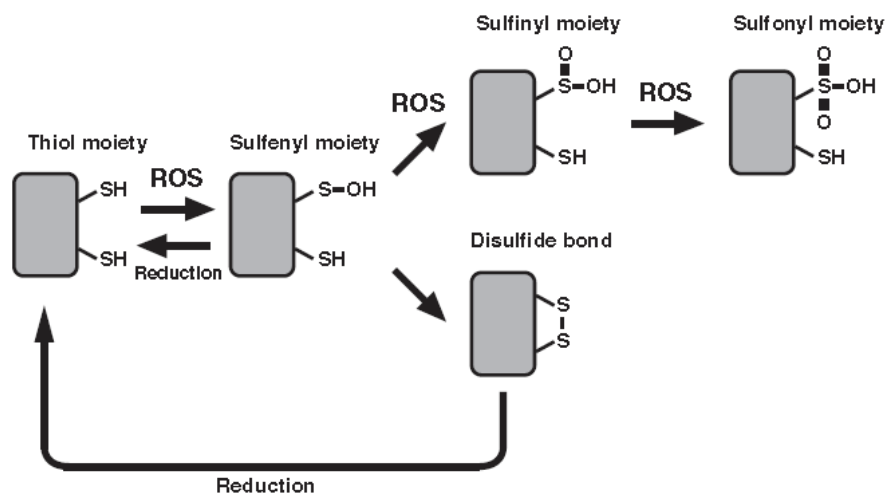


Figure 24. Mécanisme d'action des ERO au niveau des groupements thiols

Donc les groupements thiols des protéines (phosphatase) et non-protéines (vu précédemment) sont des cibles pour les ERO. En effet, les Protéines tyrosine phosphatase (PTP) possèdent un centre catalytique avec une séquence cystéine (HCxxGxxRS/T) dont la régulation est redox dépendante. L'oxydation de la séquence par les ERO (H₂O₂) rend la

protéine inactive or ce type de protéine a un rôle clé dans la transduction de différentes voies de signalisation (Xu D, 2002 ; Andersen JN, 2001). En général, l'oxydation par les ERO perturbe l'activité d'une protéine dont l'activité maximale existe lorsqu'elle est dans son état le plus réduit au niveau du groupement R-SH. Comme nous l'avons décrit précédemment (§ 2.1.2 H₂O₂), les groupements thiols réduits SH sont très sensibles aux ERO.

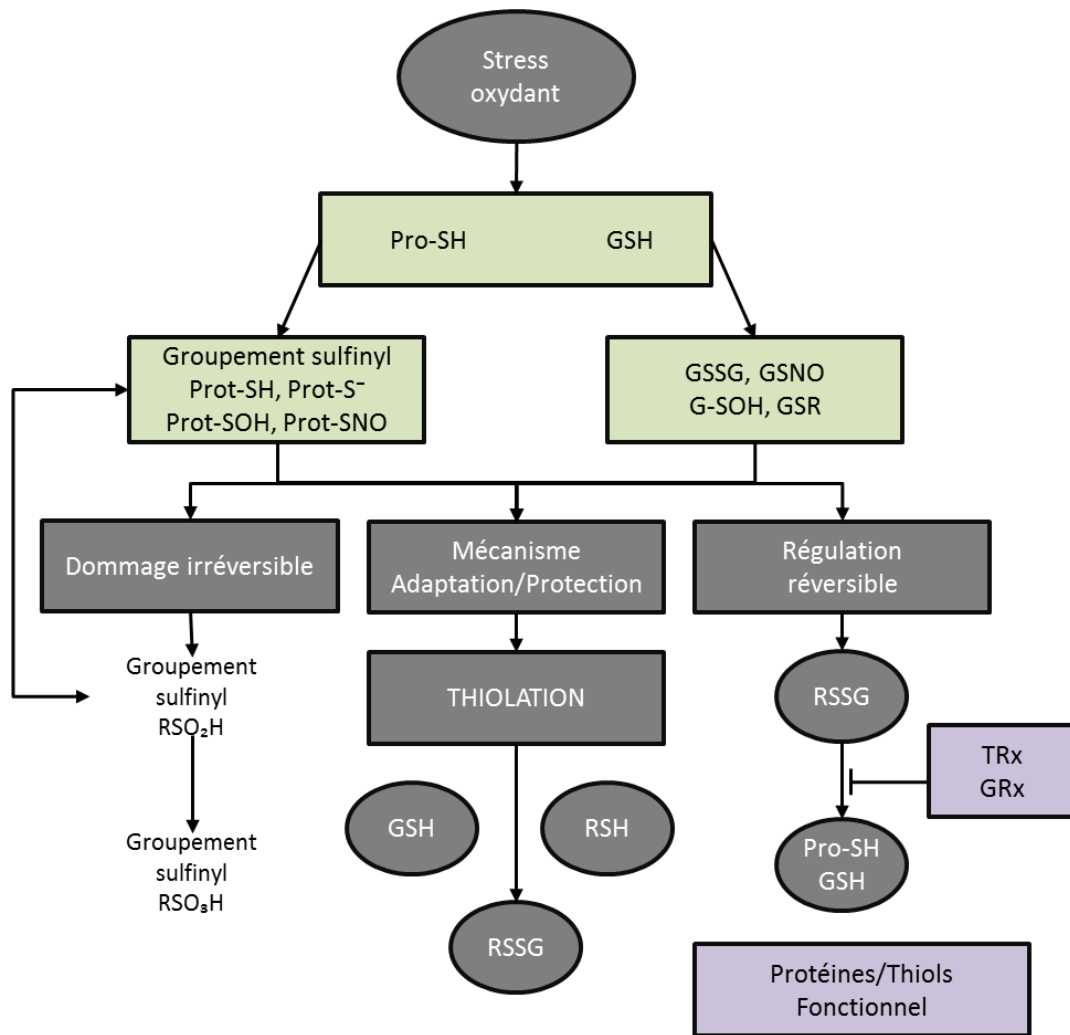


Figure 25. Mécanisme d'actions ERO et des antioxydants. Les ERO engendrent 3 niveaux d'oxydation : réversible via les groupements sulfényles où les systèmes antioxydants peuvent intervenir GSH/Trx ; la thiolation pour la protection des groupements SH ; la phase irréversible via les groupements sulfényles et sulfonyles.

2.5.1.2. Rôles de Messagers secondaires

Les ERO ,secondaires à l'activation d'un récepteur membranaire (Hansen et al., 2006), sont impliquées dans les voies de signalisation liées aux mécanismes d'activation, prolifération, différenciation/migration cellulaire, ... (Sundaresan M, 1995 ; Lander HM, 1997). Ceci est possible grâce à leur rôle de second messenger qui oxyde de manière réversible les protéines comme les kinases liées aux voies de signalisations. Des nombreuses protéines jouant un rôle de facteurs de transcription sont sensibles aux ERO dont p53, AP-1, JNK, Fos, NRF-2, NF-Kb... (Takada Y, 2003).

A. Cellules non lymphocytaires

Les ERO participent aux cascades de signalisation intracellulaire dans de nombreuses cellules comme les fibroblastes, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, le tissu thyroïdien et les phagocytes (Dröge W, 2002). NF-kB est un facteur redox-sensible (H_2O_2) qui répond directement au stress oxydant au moyen de la voie I κ B kinase (IKK) (Gloire G, 2006). L'activation de NF-kB régule divers transcrits de gènes codant pour des cytokines, des chimiokines, des molécules d'adhésion et des facteurs pro-/anti-apoptotiques impliqués dans les phénomènes inflammatoires (Martin MU, 2002).

Une autre fonction physiologique assurée par les oxydants est l'élimination des cellules endommagées, par l'induction de l'apoptose au travers de la voie signalisation des récepteurs du Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) et de Fas L ,CD95/Fas (Kroemer G, 1998) et des caspases. Finalement, le NO a la capacité d'activer la guanylate cyclase, générant un second messenger important dans de nombreuses réponses physiologiques, le GMPc. Dans les cellules musculaires lisses, l'activation de la protéine kinase GMPc dépendante permet la phosphorylation et l'activation de canaux potassiques calcium dépendants responsables de la relaxation des vaisseaux sanguins (Archer SL, 1994). Ils peuvent aussi activer des protéines issues de la famille des MAP kinases, impliquées dans la prolifération des cellules (Sundaresan M, 1995 ; Arnold RS, 2001).

B. LYMPHOCYTES

Plusieurs études ont confirmé la génération d'ERO par les LT, en réponse à une stimulation par des mitogènes (*Tatla S, 1999*), superantigènes (Staphylococcal enterotoxin A, B...) (*Pani G, 2000*) et en particulier par un anticorps anti-CD3 (*Devadas S, 2002 ; Kwon J, 2003*) ou anti-CD28 (*Lahdenpohja N, 1998*). Ces études se sont servies, pour la plupart d'entre elles, de sondes métaboliques spécifiques des ERO (DHR, DCFDA et DHE). En effet, leur oxydation libère la fluorescence qui est dépendante des ERO. L'utilisation de ces sondes en CFM facilite la détection des ERO dans des sous-populations lymphocytaires de LT, grâce à l'association du marquage de la sonde avec les marqueurs membranaires propre à une sous-population (c.f. Matériel et Méthodes).

La cinétique de la formation d'oxydants dans les LT dans ces différentes études est effectuée sur des temps courts de 1 à 60 minutes. Les expériences de liaison spécifique du TCR (crosslinking) montrent une oxydation rapide des sondes à partir de 2-4 min, sur des lignées cellulaires immortalisées de LT (Jurkat) ou des cellules primaires issus de LT murins ou des LT activés humains. Ceci sous-entend que la signalisation liée au TCR et celle qui conduit à l'activation des LT sont impliquées dans la production d'ERO. Ce dernier aurait un rôle dans la régulation de la transduction du signal liée à l'activation des LT via le CD3 (*Kwon J, 2003 ; Jackson SH, 2004*). En d'autres termes, des stimuli visant l'activation des LT conduisent à la génération intracellulaire d'oxydants.

Il est important de préciser que la plupart de ces équipes ont pris le soin d'isoler les populations de LT ou d'utiliser des lignées de LT, car l'utilisation de populations mixtes (cellules phagocytaires, monocytaires) peut être à l'origine des ERO et interférer dans les résultats. En effet, dans une population mixte, les LT activés sécrètent et expriment en surface des protéines (TNF- α , CD40L) qui peuvent aboutir à la formation d'ERO par des cellules non T (LB, cellules myéloïdes) (*Sundaresan M, 1996 ; Lee JR, 1998*). En outre, il existe un effet paracrine des ERO qui peuvent diffuser d'une cellule non T à une cellule LT chez l'homme mais également dans les modèles murins (*Matsue H, 2003 ; Rabesandratana H, 1992*). L'emploi d'anti-CD3 et/ou CD28 permet de sélectionner dès le départ la population cellulaire à activer, à savoir les LT, et facilite donc leur production d'ERO de manière spécifique (*Pani G, 2000 ; Nagy G, 2003 ; Gergely P Jr, 2002*).

D'autre part, l' H_2O_2 active la voie de signalisation des Mitogen Activated Protein Kinases (MAPK) impliquée dans l'activation et prolifération des cellules T. L'action d'antioxydants tels que la catalase ou la Thioredoxine Peroxydase diminue le niveau d' H_2O_2 issu de l'activation du TCR. Ceci évoque un lien entre la production d'ERO et la régulation de la voie de signalisation liée au TCR et CD3, et donc un rôle de l' H_2O_2 dans l'activation des LT via la voie des MAPK. De plus, le traitement par des antioxydants diminue la phosphorylation de la MAPK Erk1/2 des LT (Devadas S, 2002). Une étude réalisée sur des LT préactivés montre que le traitement par un antioxydant spécifique de l' H_2O_2 augmente la phosphorylation d'ERK indiquant l'existence d'une boucle de rétrocontrôle négatif de la voie MAPK par le niveau d' H_2O_2 produit. Ainsi les ERO dans cet exemple ont une fonction dans la régulation de l'activation des LT (Kwon J, 2003).

D'autre part, Devadas S et collaborateurs montrent que les voies de signalisation activées dépendent de la nature de l'entité oxydante. En effet, l' O_2^- active la voie FAS Ligand (FASL) associée à un phénomène de mort cellulaire programmée, l'apoptose. Le traitement par des antioxydants (MnSOD) spécifique du RLO diminue la proportion des LT apoptotiques et l'expression de FasL.

2.5.1.3. Rôles dans les Défenses immunitaires

Les polynucléaires neutrophiles (PN), participent à la défense de l'organisme notamment contre les bactéries par le phénomène de « burst oxydatif » via les entités oxydantes. Ils phagocytent les microorganismes par le phagolysosome à l'intérieur duquel les particules infectieuses sont digérées. Cette activation des neutrophiles permet la libération de protéines cationiques d'enzymes lytiques, et implique la NADPH oxydase (myéloperoxydase (MPO) dans les polynucléaires) et la NOS (production de NO). La NADPH oxydase relargue une importante quantité O_2^- qui est ensuite dismutée en H_2O_2 dans le phagosome contenant du chlorure à forte concentration. Ainsi, l'interaction de l'acide hypochlorique (HOCl), issus des MPO, peut réagir avec l' O_2^- pour former le radical hydroxyle nécessaire à l'éradication des micro-organismes (Serteyn D, 2003).

A côté de leurs effets positifs aux doses physiologiques, les ERO produits en excès sur une longue période ne peuvent plus être compensés par des systèmes de détoxification, ce qui conduit à un stress oxydatif cellulaire (*Sies H, 1991*). Les dégâts cellulaires atteignent l'ensemble des macromolécules biologiques (membranes cellulaires, protéines, ADN) et en conséquence aboutissent à des altérations structurelles et fonctionnelles (apoptose, sénescence, production de cytokines pro inflammatoires...) (*Adler V, 1999 ; Buttke TM, 1995*).

2.5.2. Effets des ERO

2.5.2.1. Cibles biologiques

A. Lipides

Par leurs nombreuses doubles liaisons les acides gras polyinsaturés, comme l'acide linoléique ou l'acide eicosapenténoïque constituent des cibles de prédilection pour une oxydation par les ERO (*Pamplona R, 2000 ; Hulbert AJ, 2005*). Les réactions radicalaires avec les lipides sont à l'origine de la peroxydation lipidique par le radical OH- (hydroperoxydes lipidiques) qui se traduit *in vitro* par l'accumulation de l'isoprostane, le malondialdéhyde (MDA), 4-hydroxynonéanal (4-HNE) et de Low Density Lipoprotein (LDL). Le 4-HNE et MDA peuvent interagir avec les protéines et l'ADN. Une augmentation prolongée des taux d'hydroperoxydes lipidiques membranaires peut avoir de nombreux effets négatifs dans les compartiments lipidiques mais varient suivant les types de lipides affectés. Lorsque les phospholipides membranaires sont touchés, la peroxydation est responsable d'altérations physiques, telles que la diminution de la fluidité, création de pores hydrophiles. La peroxydation peut également entraîner des altérations fonctionnelles au niveau des récepteurs ou des transporteurs à la membrane (y compris la membrane mitochondriale interne) et de la transduction des signaux cellulaires (*Hong J, 2004*). Ces marqueurs (MDA, 4-HNE, LDL, et MDA) sont retrouvés en proportion importante, chez les sujets âgés (*Chowdhury PK, 2004*) et chez les patients atteints d'athérosclérose, de maladies rénales chroniques, de diabète et de BPCO (*Fraley AE, 2006 ; Grimsrud PA, 2007 ; Montuschi P, 2000 ; Rahman I, 2002*).

B. Protéines

Les protéines (et acides aminés), au même titre que les lipides, subissent des modifications par les oxydants (OH^-). Les acides aminés touchés par l'oxydation sont principalement les méthionines et tyrosines générant de la méthionine sulfoxyde et de la nitrotyrosine. Les protéines les plus touchées sont celles portant le groupement sulfhydryle (thiol : SH) important dans les fonctions de détoxification des molécules anti-oxydantes (*Peng J, 2000 ; Levine RL, 2002*). Lors d'atteintes oxydatives, les altérations structurales occasionnées sur les protéines engendrent leur inactivation et affectent leurs propriétés biologiques (protéines antioxydantes, phosphatase...). De plus, les protéines oxydées sont facilement détectables par le protéasome pour leur dégradation (*Dean RT, 1997*).

C. ADN

L'oxydation de l'ADN par l' OH^- ou le peroxy-nitrite au niveau des bases, induit des cassures des brins, des mésappariements, et des pontages ADN-protéines (*Cadet J, 2002*). Leur cible privilégiée est la guanine donnant lieu à la 8-oxoguanine, 8-nitroguanine et 8-oxoadénine, qui sont des marqueurs du stress oxydatif (*Favier A, 2003*). En outre, l'ADN mitochondriale de par sa proximité avec les sites de production d'ERO et son manque de ressources de réparation est plus exposé aux attaques oxydantes (*Wallace DC, 2008*). Ces faits sont confirmés par la présence élevée de marqueurs mutagènes.

Ces effets délétères affectant les différentes macromolécules peuvent s'accumuler avec l'âge pouvant conduire à des pathologies et aux manifestations du vieillissement.

2.5.2.2. ERO et maladies

Nous avons décrit l'importance des entités oxydantes à des doses faibles dans les fonctions physiologiques ainsi que leurs effets néfastes à des doses élevées sur les lipides, les protéines, l'ADN qui conduit à un profond remaniement des fonctions cellulaires de base. Le microenvironnement prooxydant généré en réponse à une production importante d'ERO intracellulaires (ou exogènes comme nous verrons plus loin) joue un rôle clé dans la pathogénèse de nombreuses maladies. En effet, le stress oxydatif est impliqué dans l'ischémie/re-perfusion, les maladies neurodégénératives, les cancers, l'infarctus, le diabète, l'hypertension mais aussi dans la formation des lésions vasculaires de l'athérosclérose

(*Madamanchi NR, 2005 ; Mueller CF, 2005*). Notons que ces pathologies sont intimement liées au vieillissement.

Lors d'ischémie, le glucose sanguin diminue entraînant une augmentation de la synthèse d'ERO mitochondriales et l'activation de xanthine oxydase produit davantage d'ERO (H_2O_2 et O_2^-).

De la même façon, l'athérosclérose résulte d'une accumulation de LDL oxydées dans la paroi artérielle les macrophages captent les LDL et produisent des ERO (*Sorg O, 2004*).

Dans les cancers, les entités oxydantes sont à l'origine de dommages et mutations de l'ADN (§2.4.2.1 C) qui constituent en soi un facteur de risque dans l'initiation et le développement de la maladie (*Migliore L, 2002*). Les ERO interviennent dans l'activation des carcinogènes, créant des lésions de l'ADN, inhibant des gènes suppresseurs de tumeurs, comme p53 et amplifiant ainsi les signaux de prolifération (*Favier A, 2003*).

Dans les maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson, l'auto-oxydation de la dopamine produit le radical O_2^- et H_2O_2 qui renforceraient la dégénérescence des neurones dopaminergiques, à l'origine de la pathologie. Enfin, les patients souffrant de la maladie d'Alzheimer présentent des niveaux élevés de marqueurs de stress oxydatif (*Rao AV, 2002 ; Hardy J, 2002*).

2.5.2.3. Rôle des ERO dans le vieillissement cellulaire

Les dommages causés par les ERO, au niveau de l'ADN, stimulent les systèmes de réparation de l'ADN et entraîne un arrêt transitoire du cycle cellulaire. Dans certains cas, cet arrêt est permanent, c'est la sénescence cellulaire. Dans un premier temps, nous allons décrire le déroulement du cycle cellulaire puis nous décrirons la sénescence cellulaire.

A. Régulation du cycle cellulaire

Au cours du cycle cellulaire, quatre phases se succèdent dans cet ordre: G1, S, G2 et M. La phase S correspond à la réplication de l'ADN, la phase M celle de la division cellulaire. Les phases G1 et G2 sont respectivement des phases de préparation à la réplication et à la mitose. La progression du cycle cellulaire est liée aux cyclines et aux kinases cyclines dépendants, CDK qui sont des sérines thréonines kinases, et aux molécules qui les régulent. Les CDK sont activées par liaison à une cycline. Différents complexes cycline/CDK sont formés et activés au cours des étapes successives du cycle cellulaire. Elles catalysent les réactions de phosphorylation en provoquant l'activation ou l'inhibition de protéines cibles.

Le cycle cellulaire compte 6 complexes cycline/CDK intervenant à un moment précis. Les cyclines de type D vont activer les CDK4 et 6 et faciliter la transition durant la phase G1. Puis, les cyclines de type E en association avec les CDK2, vont faciliter le passage de la phase G1 à la phase S du cycle. Les cyclines de type A activent les CDK2 et 1 à la fin de la phase S permettant le passage en G2. Enfin, les cyclines de type B permettent l'entrée en mitose (Figure 26).

Afin de s'assurer de l'efficacité du cycle cellulaire et de l'intégrité de l'ADN à chaque étape, il existe un système de contrôle (*Hartwell LH, 1989*) :

- En fin de Phase G1, une vérification de l'intégrité de l'ADN et de la présence d'une éventuelle lésion est effectuée. En l'absence d'anomalie, les cellules poursuivent le cycle cellulaire en phase G1/S. Ce point de surveillance est appelé « DNA damage checkpoint » (DDP)

- En fin de phase G2 et phase S, la transition G2/M ne se fait que si l'ADN est correctement dupliqué. Cette étape se nomme « replication checkpoint » (RCP)
- Pendant la métaphase, les chromosomes doivent être correctement alignés au niveau de la plaque métaphasique pour la transition métaphases/ anaphase, c'est le « Mitotic checkpoint » (MCP).

Parmi les mécanismes de surveillance, d'autres kinases différentes des CDK interviennent, l'ataxia-telangiectasia mutated (ATM), l'« ataxia-telangiectasia related » (ATR), les protéines sérine-thréonine kinases check-point protéine kinases 1 et 2 (Chk1 et Chk2) et la protéine Mitotic arrest deficient-2 (Mad2). Lorsque l'ADN est endommagé, ATM/ATR et Chk1/Chk2 sont activés.

Lorsqu'une phase est non achevée ou lors d'un dommage au niveau de l'ADN qui nécessite une réparation, le cycle cellulaire est arrêté. Cet arrêt est la conséquence directe de la régulation de l'activité des CDK par des activateurs, les cyclines, et des inhibiteurs, les CDK inhibitors (CKI).

La protéine du rétinoblastome (Rb) est un inhibiteur du cycle cellulaire. Pendant la phase G1 du cycle cellulaire et après un stress, Rb est hypophosphorylée et séquestre les facteurs de transcription de la famille E2 Factor (E2F) (Narita M, 2003 ; La Thangue NB, 1994). E2F induit l'expression de nombreux gènes codant des protéines nécessaires à la phase S du cycle cellulaire (les cyclines, l'ADN polymérase α , la thymidine kinase). La séquestration d'E2F par Rb empêche son activité transcriptionnelle et les cellules sont retenues en phase G1. Une phosphorylation de Rb par les complexes cyclines D/CDK 2,4 ou 6 libère E2F et les cellules peuvent entrer en phase S (Figure 26) (Sherr CJ, 1999 ; Ewen ME, 1993).

La protéine p53 est un facteur de transcription jouant un rôle majeur dans le blocage du cycle cellulaire, c'est un gène suppresseur de tumeur. En condition physiologique, p53 est présent en très faible quantité car l'ubiquitine ligase, la murine double minute (MDM-2), conduit à sa dégradation par le protéasome (Haupt, 1997). Lorsque l'ADN est endommagé (UV ou raccourcissement des télomères), Mdm2 est séquestrée par p14 (décrit plus loin) ce qui réduit la dégradation de p53. De plus, ATM/ATR et Chk1/Chk2 phosphorylent p53 (d'Adda di

Fagagna F, 2003 ; Wahl GM, 2001) qui active l'expression des gènes codant pour les protéines impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire les CKI comme p21 (Figure 26)..

Les CDK sont également régulées par des protéines de la famille INK4 et KIP. Chez l'homme, les inhibiteurs de la famille INK4 comprennent p16^{INK-4A}, p15^{INK-4B}, p18^{INK-4C} et p14^{INK-4D} qui inhibent les CDK4 et CDK6. Les différents membres INK4 se distinguent par des profils d'expression différents en réponse aux divers signaux externes. Ils exercent leur action inhibitrice de deux manières distinctes soit en empêchant la liaison de la cycline activatrice, soit en bloquant l'interaction du complexe cycline/CDK avec son substrat (*Hirai H, 1995*). En effet, p16^{INK-4A} (p16) inhibe l'association de CDK4 et CDK6 avec la cycline D ou provoque la dissociation du complexe et inhibe la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome (Rb) substrat (*Hirai H, 1995*). Ce mécanisme empêche la sortie de la phase G1 et donc l'entrée en phase S, le cycle cellulaire est bloqué en phases G1 (Figure 26).

Les inhibiteurs de la famille de KIP, tels que $p21^{WAF-1}$, $p27^{KIP-1}$ et $p57^{KIP-2}$ peuvent inhiber tous les complexes cycline/CDK présents en phase G1 mais également le complexe cycline B/CDK1 en phase G2 (Dulić V, 1994). En présence de stress (dommage de l'ADN), la protéine $p21^{WAF-1}$ ($p21$) peut inhiber toutes les CDK ayant un rôle en phase G1 et en phase S du cycle cellulaire : CDK2, CDK4 et CDK6 (Harper JW, 1995 ; Kulju KS, 1995 ; Wong H, 1996). Or, ces CDK sont nécessaires à l'inactivation de la protéine Rb et donc à la libération d'E2F pour la poursuite du cycle cellulaire. L'hypophosphorylation de Rb empêche la libération d'E2F et le cycle cellulaire est arrêté en phase G1. Au final, $p21$ permet l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 mais également en phase G2 via l'hypophosphorylation de Rb (Figure 26) (Drané P, 2002).

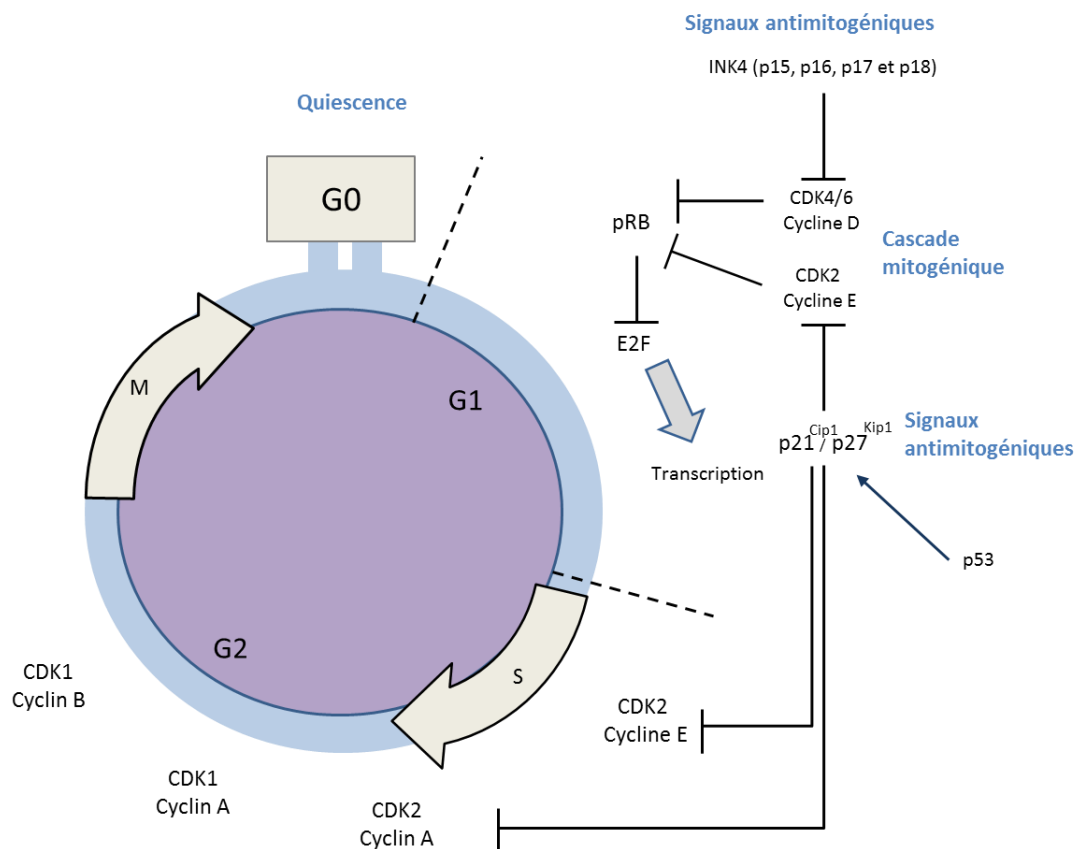


Figure 26. Régulation du cycle cellulaire. Le cycle cellulaire est constitué des phases G1, S, G2 et M. Le passage de la phase G1 à S nécessite le facteur E2F qui est séquestré à l'état basal par pRB. L'hyperphosphorylation de la protéine pRB par les cyclines D CDK4/6 et cycline E CDK2 libère E2F et permet la progression du cycle cellulaire. Il existe des inhibiteurs de ces cyclines dont p53, p21 ou p16 qui vont inhiber cette phosphorylation et ainsi empêcher l'avancée du cycle cellulaire.

Le tableau ci-dessous résume les différents complexes sollicités pour chaque phase et leur rôle.

Phase du cycle /	Protéine inhibant cdk	Complexe cycline/cdk	Effets du complexe
G1	p16	Cycline D/CDK4 Cycline D/CDK6	<ul style="list-style-type: none"> • Inactivation de RB par phosphorylation • Libération d'E2F nécessaire à la synthèse des cyclines des phases G1/S et S
G1/S	p21	Cycline E/ CDK2	<ul style="list-style-type: none"> • Transition G1/S et phosphorylation de RB
S	p21	Cycline A/ CDK2	<ul style="list-style-type: none"> • Phosphorylation substrat pour la phase S • Inhibition facteurs transcription phase G1 • Arrêt de la dégradation de la cycline B
G2/M		Cycline B/CDK1	<ul style="list-style-type: none"> • Phosphorylation et transition vers la mitose

Tableau 6 . Complexes cycline/CDK régulant le cycle cellulaire

Le stress oxydatif génère des dommages de l'ADN réversible ou non pouvant entraîner un blocage transitoire en phase G1/S ou un arrêt permanent, c'est la sénescence.

B. Sénescence cellulaire

Définition

La sénescence cellulaire consiste en un état d'arrêt permanent de la prolifération qui limite le renouvellement des tissus et participe aux processus de vieillissement (*Ben-Porath I, 2005*). Il fut décrit pour la première fois en 1961 par l'équipe d'Hayflick. Ce dernier découvre que le nombre de division des fibroblastes embryonnaires humains est limité (*Hayflick L, 1961*). En effet, la prolifération des cellules ralentit jusqu'à un arrêt complet.

Il existe deux types de sénescence : la sénescence répllicative en réponse à un raccourcissement des télomères et la sénescence prématurée secondaire à un stress oxydatif (ou autre stress par UV, hyperoxie, stimulation oncogénique) (*Di Leonardo A, 1994*).

Caractéristique des cellules sénescents

Les cellules sénescents présentent des caractéristiques communes :

- perte complète et irréversible de la capacité répllicative
- métabolisme actif
- augmentation de l'activité de la β -galactosidase
- changements morphologiques (aplatie, granuleuse, augmentation de la taille)
- production augmentée de protéases et de médiateurs de l'inflammation (chimiokines, cytokines)
- résistance à l'apoptose

A la différence des cellules en quiescence, les cellules sénescents sont métaboliquement actives (*Matsumura T, 1979*). Leur profil de sécrétion est modifié par rapport aux cellules non sénescents, notamment avec une sécrétion majorée de médiateurs pro-inflammatoires (*Coppé JP, 2008*). Ce profil est relativement conservé d'un type cellulaire à l'autre et entre les espèces (*Coppé JP, 2010*).

La β -galactosidase (β -gal) est une hydrolase lysosomale qui présente une activité à pH 6 et non à PH acide (pH 4-4,5 optimale), dans les cellules sénescents (*Dimri GP, 1995*). L'activité accrue de l'enzyme résulte de l'augmentation du volume lysosomal (*Kurz DJ, 2000*).

Enfin, le changement morphologique s'explique par des modifications du cytosquelette, tel que la surexpression de la vimentine qui augmente l'étalement cellulaire (*Goldstein S, 1990 ; Nishio K, 2001*). La résistance à l'apoptose des cellules sénescents est justifiée par une augmentation de bcl-2, une protéine anti-apoptotique (*Wang E, 1995*).

Sénescence répllicative

La sénescence peut être la conséquence directe d'un raccourcissement de la longueur des télomères : c'est la sénescence répllicative.

Les télomères sont des régions composées de séquences répétées et situées aux extrémités de l'ADN. Ils protègent l'ADN d'éventuels agressions et alertent le système de réparation lorsque leur taille atteint une taille critique qui peut aboutir à un arrêt du cycle cellulaire. Le raccourcissement de la longueur de la taille des télomères peut être dû aux divisions successives, c'est un processus physiologique. Cependant, il existe une enzyme permettant de réparer les télomères, la télomérase (*Greider CW, 1985*). Des études ont montré un lien entre le raccourcissement de la longueur des télomères et l'apparition des marqueurs de sénescence. En effet, la surexpression de la sous-unité catalytique de la télomérase (TERT) dans des cellules humaines normales prévient l'apparition de la sénescence alors que leur inhibition favorise la transformation en cellule tumorale (*Bodnar AG, 1998 ; Hahn WC, 1999*).

Sénescence prématurée

La sénescence peut également être due à un endommagement de l'ADN, causé par des stimuli extérieurs, c'est la sénescence prématurée ou accélérée. Cette sénescence se met en place sans altération de la taille des télomères et peut être induite par divers types de stress. L'implication des ERO dans le processus de vieillissement est proposée pour la première fois par Harman et collaborateurs (*Harman D, 1998*).

Par la suite, des études ont montré que les marqueurs de stress oxydatif sont plus importants dans les cellules sénescentes : (i) l'augmentation de la production des ERO telles que l' H_2O_2 , (ii) des niveaux élevés d'oxo8dG (oxydation de l'ADN) (*Lee KW, 1999 ; Chen Q, 1995*). Ceci démontre que le stress oxydant a un rôle essentiel dans l'induction de la sénescence. Afin de confirmer ce rôle, différents types cellulaires sont cultivés *in vitro* soit en condition hyperoxie, soit en présence de doses uniques ou répétées d'inducteurs de stress oxydatif (H_2O_2 , Tert-butyl hydroperoxide (THBP), CFC). Les résultats montrent qu'il y a une induction de sénescence (*Michiels C, 1990 ; Horikoshi T, 1991 ; Wang Y, 2004 ; Duan J, 2005 ; Nyunoya T, 2006*). D'autre part, le lien des ERO avec la sénescence a aussi été mis en évidence par des traitements antioxydants qui préviennent l'apparition des marqueurs liés au stress oxydant (*Chen Q, 1995*). De plus, la présence d'ERO mitochondriaux à des taux élevés chez les personnes âgées soutient également cet argument (*Sohal RS, 2002*).

D'autres facteurs sont aussi responsables de l'induction de la sénescence prématurée comme les UV, irradiation au cobalt, agents pharmacologiques (bléomycine, actinomycine D) ou encore une privation en sérum dans les milieux de culture (*Serrano M, 1997 ; Zhu J, 1998 ; Di Leonardo A, 1994 ; Chainiaux F, 2002 ; Ramirez RD, 2001*). De même, un certain nombre d'oncogènes sont décrits comme inducteur de la sénescence accélérée, ce sont des oncogene-induced senescence (ou OIS). Ils appartiennent à la famille des ras (petites GTP-binding proteins) (*Serrano M, 1997*), des Raf (sérine/thréonine kinases) (*Zhu J, 1998*), ou de la voie MEK/MAPK (*Lin AW, 1998*), qui sont liés dans la transduction des signaux mitogéniques.

C. Mécanismes moléculaires impliqués dans la sénescence

La sénescence se traduit par un arrêt du cycle cellulaire entre les phases G1 et S, aboutissant à un arrêt permanent de la prolifération. Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'induction de la sénescence sont identiques à ceux sollicités pour un arrêt provisoire du cycle cellulaire, lors de la réparation de l'ADN endommagé.

i. Implication de p53 et p21 dans la sénescence

De nombreuses données dans la littérature démontrent un rôle de p53 dans l'induction de la sénescence. En effet, l'inhibition de la fonction de p53 (oligomères anti-sens ou inhibition pharmacologique de p53 ou mutation) induit une augmentation de la capacité de prolifération mais prévient également la sénescence induite par l'indoxyl-sulfate des cellules (fibroblastes, cellules endothéliales) (*Hara E, 1991 ; Bond JA, 1994 ; Komarov PG, 1999*).

L'augmentation de l'expression de p53 est observée dans les fibroblastes sénescents mais également dans ceux qui ne le sont pas (ADN endommagé). Cependant, il est possible de les distinguer par le taux de protéine p53 modifiées post-traductionnellement (phosphorylation des sérines thréonines) qui reste plus élevée chez les cellules sénescents (*Atadja P, 1995 ; Webley K, 2000*). Comme nous l'avons décrit précédemment, en condition physiologique, p53 est peu exprimée du fait de son association avec MDM2 ; elle devient active et assure sa fonction de facteur de transcription qu'une fois phosphorylé par les kinases, ATM/ATR ou Chk1/Chk2 elles-mêmes stimulées par un stress (*Jabbur JR, 2000 ; Sakaguchi K, 2000 ; Schon O, 2002*). La protéine p53 phosphorylée active l'expression de p21 dont l'expression est augmentée dans les cellules sénescents (*Stein GH, 1999 ; Herbig U, 2004*) (Figure 27).

Comme nous le savons, la protéine p21 entraîne l'arrêt du cycle cellulaire en G1 via l'hypophosphorylation de Rb (§A.i). L'expression de p21 dans la sénescence a été mise en cause dans différentes études. Notamment, chez des fibroblastes embryonnaires murins délétés pour p21 qui ne présentent pas un arrêt du cycle cellulaire en réponse à des oncogènes (*Deng C, 1995*) ou à des radiations (*Brugarolas J, 1995*) alors qu'une surexpression augmente les marqueurs de sénescence (cellules positives pour le marquage à la β -galactosidase) (*McConnell BB, 1998*). Par ailleurs, il a été constaté que les voies ERK1/2 induisent la sénescence via l'expression de p21 (*Woods D, 1997*). De plus, la coopération d'ERK1/2 avec

p38 stimule également p21 dans des lignées cellulaires de fibroblastes de Hamster (CCL39) et des cellules de rats (*Todd DE, 2004*). Récemment, une étude sur les lymphocytes humains et murins a révélé que les Treg stimulent la sénescence des lymphocytes T effecteurs via l'induction des voies de signalisation TLR8 et MAPK (ERK1/2 et p38); l'induction de la sénescence serait une des nouvelles fonctions immunosuppressives des Treg (*Ye J, 2012*).

ii. Implication de p16 dans la sénescence

Chez l'homme, le locus INK4a/ARF est situé sur le chromosome 9 en 9p21 et comporte deux gènes, INK4a et ARF, qui expriment respectivement les transcrits α et β codant pour les protéines p16 INK4a et p14ARF (p19ARF chez la souris) distinctes sur les plans structural et fonctionnel (*Kim WY, 2006*). La protéine p16INK4a est impliquée dans l'inhibition de CDK4 et CDK6 (§ précédent) et dans l'activation de Rb entraînant l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1. Toutefois, l'expression de p16 ne varie pas au cours du cycle cellulaire mais elle est augmentée lors de l'activation de certaines voies oncogéniques induisant une sénescence accélérée (*Serrano M, 1997*) ou encore au cours de la sénescence répllicative (*Alcorta DA, 1996 ; Hara E, 1996 ; Stein GH, 1999*). L'induction de la protéine p16 est plus longue à se mettre en place que celle de la protéine p21 (*Robles SJ, 1998 ; Stein GH, 1999*). Bien qu'une régulation post-transcriptionnelle de p16 ait été décrite (*Gump J, 2003*), l'analyse conjointe de l'ARNm et de la protéine montre que c'est essentiellement au niveau transcriptionnel qu'intervient sa régulation (*Hara E, 1996*).

Les inducteurs transcriptionnels sont les protéines Ets1 et Ets2 qu'activent le promoteur de INK4a, en réponse à l'activation de la voie Ras/Raf/MEK et la protéine bHLH E47 (*Kim WY, 2006*). Les inhibiteurs de la transcription de p16 sont des protéines HLH Id et la Protéine Bmi1. Dans les fibroblastes diploïdes humains jeunes, l'expression de p16INK4a est faible ; en réponse à l'activation de la voie Ras/Raf/MEK, Id-1 contrebalance l'action de Ets1/2 et de E47 sur le promoteur de INK4a (*Ohtani N, 2001*). Lors de la sénescence accélérée provoquée par l'activation de l'oncogène Ras, la forte activation d'Ets1/2 entraîne une augmentation de l'expression de p16INK4a. Au cours de la sénescence répllicative, l'expression de E47 ne varie pas, celle de Ets1 augmente, tandis que l'expression de Id-1 et de Ets2 diminue ; parallèlement, l'expression de p16INK4a augmente (*Ohtani N, 2001*). De même, au cours de

la sénescence répliquative, une augmentation de l'expression d'Ets-1, mais pas de Ets-2 est observée (Zheng W, 2004) (Figure 27).

En 2006, Takashi et collaborateurs montraient que la voie p16 était induite par les ERO, en coopération avec des signaux mitogéniques et que cette induction induisait et maintenait un état de sénescence cellulaire (Takahashi A, 2006). La voie p38 MAPK semble être impliquée dans l'induction de la protéine p16 par les ERO (Iwasa H, 2003 ; Ito K, 2006). Par ailleurs, des études sur des mélanocytes traités par de l'H₂O₂ décrivent une augmentation rapide de l'expression de p16 (Jenkins NC, 2011).

Depuis peu, l'équipe de Ye a montré que les Treg induisent la sénescence chez les T effecteurs via l'augmentation de l'expression p16 et p21, dans des conditions mitogéniques. De plus, dans cette même étude il a été démontré que la voie p38 et ERK1/2 sont responsables du phénotype sénescence (cellules positives pour le marquage à la β-galactosidase, p16, p21 et p53) (Ye J, 2012). Cependant, l'implication des ERO dans l'apparition des marqueurs de sénescence n'a pas été étudiée. En outre, dans un modèle de fibroblastes isolés à partir de souris délétées pour p53, une augmentation de l'expression protéique de p16 est observée. Ceci indique une coopération entre les deux voies. (Leong WF, 2009).

La protéine p14ARF, quant à elle, s'associe à MDM2 et régule le cycle cellulaire en stabilisant indirectement p53. Celui-ci sous sa forme phosphorylée active la transcription de p21 (Kim WY, 2006) (Figure 27).

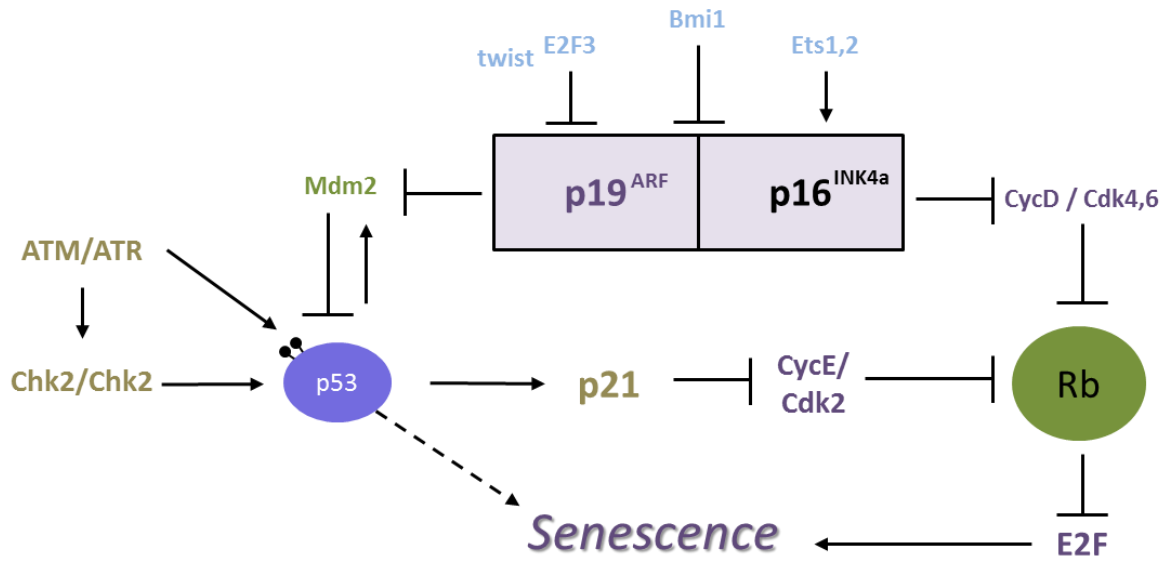


Figure 27. Voies moléculaires d'induction de la sénescence. Un stress (oxydatif, UV, endommagement de l'ADN...) active les kinases ATM/ATR et Chk1/2 qui vont phosphoryler p53 qui à son tour active p21. La protéine p21 inhibe les cyclines impliquées dans la phosphorylation de pRb et ainsi empêche la progression du cycle cellulaire. Les protéines Ets1, 2 induisent la transcription de p16 qui inhibe les cyclines D/CDK4, 6 ; l'expression de p16 survient lors de stress. Il existe des inhibiteurs de la transcription de p16, HLH Id et Bmi1. La protéine p14ARF provoque l'arrêt du cycle cellulaire en se liant à MDM2 et libérant ainsi p53 ; la transcription de p14 peut être inhibée par E2F3 et twist.

2.5.2.4. Immunosénescence

La sénescence des lymphocytes se caractérise par une détérioration du système immunitaire dans le temps avec l'âge qui est en rapport avec la susceptibilité et la sévérité augmentées des personnes âgées aux maladies infectieuses, auto-immunes et cancéreuses (Papagno et al, Plos Biology, 2004). Chez les sujets âgés, les populations mémoires sont en quantité importante par rapport aux populations naïves et empêchent les cellules de répondre à de nouveaux antigènes. De plus, une diminution de l'expression des molécules de co-stimulation (CD27-CD28) et une augmentation de CD57 sont associées à un raccourcissement de la longueur des télomères chez les sujets âgés et ceux atteints d'une infection comme le HIV. Différentes études montrent des caractéristiques de sénescence des lymphocytes T périphériques dans différentes pathologies:

- La déficience en p53 augmente la réponse des lymphocytes T spécifiques d'antigène et la sévérité des lésions dans un modèle murin de diabète de type I (Simelyte, Arthritis Rheum, 2005 ; Zheng, Diabetes, 2005)
- La longueur des télomères est plus courte dans les lymphocytes T CD8+ que dans les lymphocytes T CD4+ avec l'âge (Son, J Immunol, 2000) ;
- L'activité télomérase décroît de façon plus importante avec l'âge en corrélation avec la baisse de l'expression du co-récepteur d'activation CD28 à la surface des lymphocytes TCD8+ (Valenzuela, Clin Immunol, 2002).
- L'augmentation chez les LTCD8+ de patients HIV de l'expression de CD57, un marqueur de l'incapacité de prolifération des LTCD4+ et LTCD8+. Cette augmentation de l'expression de CD57 est associée à un raccourcissement de la longueur des télomères et donc à la sénescence réplivative (Brenchley and al 2003). De plus ces cellules sont CD27- qui est un autre marqueur de stimulation.

Synthèse : Le stress oxydatif

Les espèces réactives de l'oxygène ont des effets pléiotropiques sur les cibles biologiques (Protéines, lipides, ADN). A des niveaux faibles ou moyens, ils assurent des fonctions physiologiques, telles que la régulation des voies de signalisation impliquées dans la prolifération (MAPK) ou l'inflammation (NFkB), via une oxydation réversible des groupements thiols. Ce système est maintenu à l'équilibre grâce aux systèmes antioxydants non enzymatiques (vitamines, GSH, Trx) et enzymatiques (GPx, TxR, Prx...) dont l'expression est régulée par le facteur de transcription NRF2 (en partie). A des concentrations élevées les oxydations des ERO sont irréversibles et engendrent des dommages au niveau de l'ADN (8-oxodGuo), la formation de protéines modifiées et non fonctionnelles. Les cassures au niveau de l'ADN causé par les ERO sont parfois responsables de l'induction de la sénescence via l'induction de p53, p16 et p21. Ces cellules présentent des caractéristiques communes au niveau morphologique, du métabolisme (activité β -galactosidase) et un sécrétome pro inflammatoire.

Dans ce chapitre, nous décrirons à la fois, l'effet du tabagisme chronique sur des individus sains par rapport à des non-fumeurs ainsi que son implication dans la Bronchopneumopathie Chronique Obstructive (BPCO).

3. La Bronchopneumopathie Chronique Obstructive (BPCO)

3.1. Définition et évolution

La BPCO est une maladie respiratoire en constante progression dans les pays développés le plus souvent secondaire à une intoxication tabagique (*Celli BR, 2004 ; Pauwels RA, 2004*). D'ici 2020 la BPCO sera la 3^{ème} cause de mortalité dans les pays occidentaux (Figure 28) (*Roche N, 2004*). Elle est caractérisée par un trouble ventilatoire obstructif non complètement réversible, habituellement progressif, associé à une réaction inflammatoire anormale et à des conséquences systémiques, en réponse à des toxiques inhalés. Un remodelage bronchique et une destruction des cloisons alvéolaires, appelé emphysème pulmonaire, constituent le substratum anatomique de la maladie, les deux altérations ne coexistant pas toujours chez le même malade (*Rabe KF, 2007*). Le développement de la maladie se fait par l'aggravation progressive des lésions, aboutissant une réduction des échanges gazeux au niveau des alvéoles et à une insuffisance respiratoire chronique amenant à un handicap sévère et au décès dans un grand nombre de cas.

A ce jour, la BPCO est une maladie incurable les traitements sont symptomatiques. L'arrêt du tabagisme ainsi que l'oxygénothérapie permettent un ralentissement du déclin respiratoire. Les bronchodilatateurs et les corticoïdes contrôlent les symptômes (*Calverley PM, 2007 ; Tashkin DP, 2008 ; Celli B, 2009*). Il n'existe pas de traitement curatif pour cette pathologie. Un effort de recherche visant à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques paraît nécessaire compte tenu de l'impact majeur en termes de santé publique.

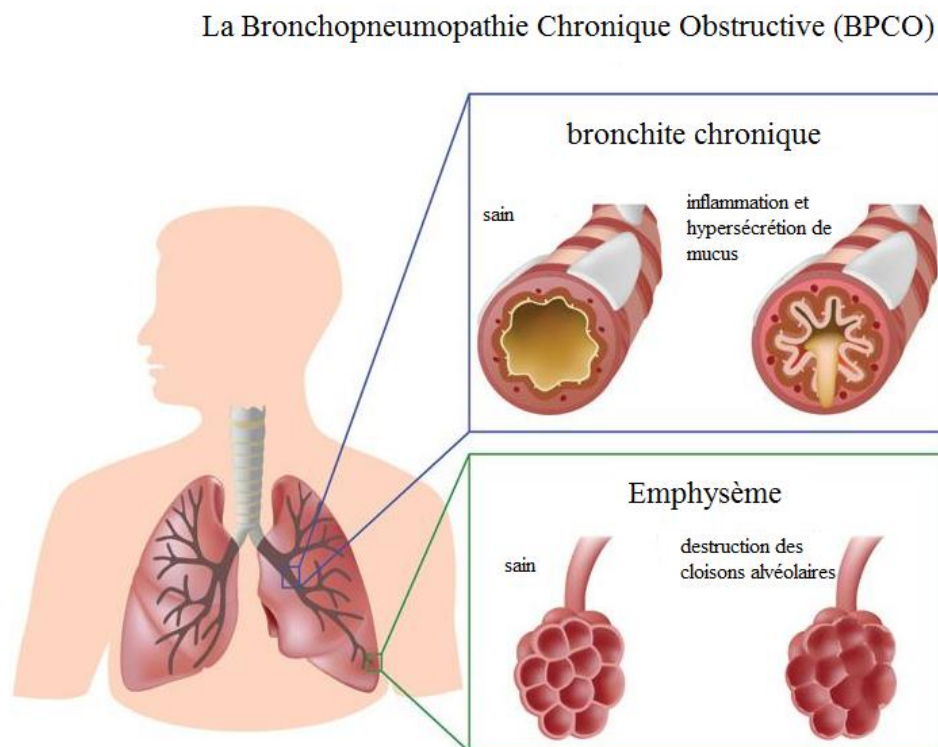


Figure 28. Physiopathologie de la Bronchopneumopathie Chronique obstructive (BPCO). La BPCO est caractérisée par un remodelage bronchique, via un épaississement des parois bronchiques, une inflammation et une hypersécrétion de mucus, et par un remodelage alvéolaire via une destruction des parois alvéolaires, appelé emphysème (Adapté de <http://www.devilbisshc.fr/informations-patient/copd/>).

3.2. Etiologie

La principale cause de la BPCO est l'exposition à la fumée de cigarette, cependant seuls 15 à 20 % des fumeurs vont développer une BPCO. Parmi les composés contenus dans la fumée de cigarette, de nombreuses espèces radicalaires, en particulier des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et du monoxyde d'azote, semblent jouer un rôle clé dans la physiopathologie de la BPCO en général et de l'emphysème en particulier (*Thielen A, 2008*). En effet, les oxydants de la fumée de cigarette font partie des facteurs exogènes induisant un stress oxydatif chronique qui constitue

un des mécanismes physiopathologiques que nous décrivons plus tard. D'autres composés tels que le cadmium et la nicotine ont été également impliqués dans la pathogénie de la BPCO. Cependant, d'autres facteurs de risques environnementaux de cette maladie ont été reconnus, comme les expositions professionnels (travaux publics, métiers agricoles ou encore particules des moteurs diesels) (Eisner MD, 2010).

3.3. Mécanismes physiopathologiques

Dans ce chapitre, seuls les mécanismes participant à la physiopathologie de l'emphysème pulmonaire seront exposés (Figure 29). Nous décrivons en détail les mécanismes en rapport avec mon projet de thèse : le stress oxydatif et les systèmes antioxydants, les rôles des lymphocytes, et la sénescence des cellules de structure et lymphocytaire. Le déséquilibre de la balance protéase/anti-protéase et l'apoptose des cellules alvéolaires participant également au développement de la maladie seront décrits très brièvement.

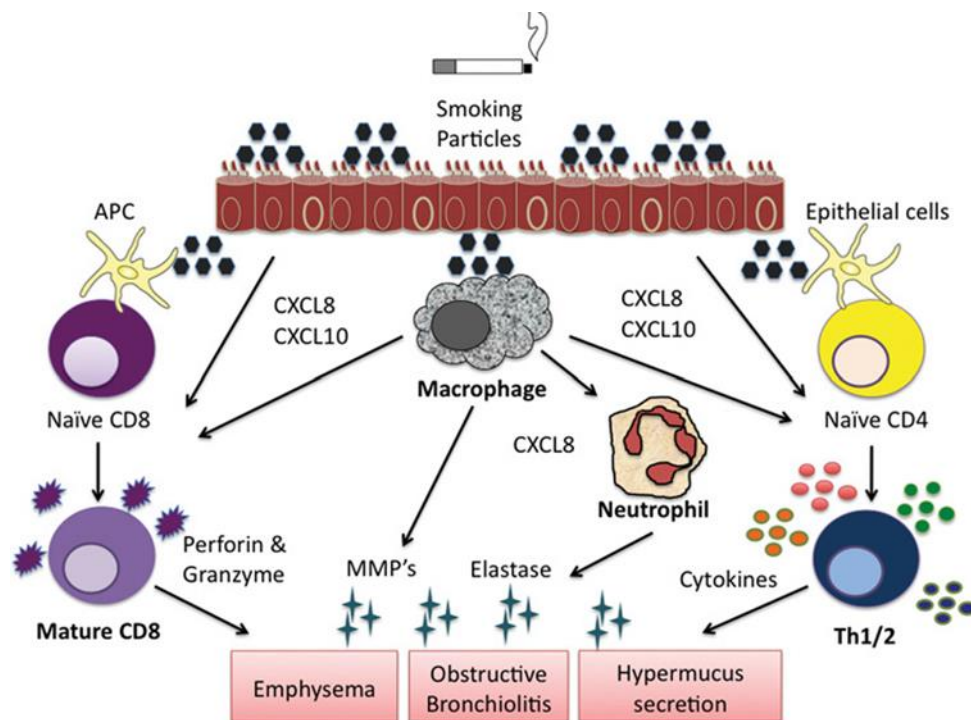


Figure 29. Cellules immunes impliquées dans la physiopathologie de la BPCO. Le stress oxydatif, généré par le tabagisme chronique, active les cellules de l'immunité innée (macrophages) qui à leur tour produisent des ERO et chimiokines (CXCL8, CXCL10) et cytokines capable de recruter les cellules de l'immunité adaptative (TCD8+, TCD4+...). Par ailleurs, la production de protéases par les macrophages (élastase, MMP) est à l'origine de la production de fragments d'élastine et de la production d'autoanticorps par les Lymphocytes B.

3.3.1. Le stress oxydatif

Comme nous l'avons décrit précédemment, c'est un déséquilibre de la balance oxydant/antioxydants en faveur des oxydants. Des bio marqueurs caractéristiques d'un stress oxydatif sont retrouvés aussi bien chez des fumeurs sains que chez des patients avec une BPCO post-tabagique. Nous décrirons d'abord les altérations observées au niveau de la production d'espèces réactives de l'oxygène et des marqueurs de stress oxydatif, puis nous ferons le point sur les altérations de systèmes antioxydants.

3.3.1.1. Profil oxydatif des individus sains : fumeurs et non-fumeurs

Des études réalisées chez l'homme révèlent que les fumeurs présentent des niveaux d'oxydants plus élevés que les non-fumeurs. En effet, les niveaux d' H_2O_2 du condensat de l'air exhalé des fumeurs sont supérieurs aux individus non-fumeurs (*Kharitonov SA, 2001; Rahman I, 2003*). D'autres données montrent une augmentation des marqueurs de stress oxydatif comme l'isoprostane, les taux d'acide thiobarbiturique (TBARS) et l' $ONOO^-$ dans le plasma sanguin (*Morrow JD, 1995; Ichinose M, 2000 ; Kanazawa H, 2003; Rahman I, 1996 ; Morrison D, 1999*) et le condensat de souffle expiré (*Montuschi P, 2003*) des fumeurs par rapport aux non-fumeurs. Ces résultats démontrent une induction de stress oxydatif par le tabagisme chronique.

De plus, l'exposition aiguë à la fumée de cigarette a des effets immédiats sur le niveau d'oxydants du plasma sanguin des fumeurs. Une heure après la consommation d'une cigarette, le taux d' H_2O_2 (*Guatura SB, 2000*), de nitrate et nitrite (*Balint B, 2001*) du condensat d'air exhalé des fumeurs augmente de manière significative par rapport au temps $T=0$ ainsi que les niveaux de 8-OHdG (*Montuschi P, 2000*).

Des études *in vitro* chez l'homme ont montré que l'exposition au condensat de fumée de cigarette induit également une augmentation de la production d' O_2^- par les monocytes du sang périphérique, les cellules épithéliales alvéolaires, les fibroblastes mais également par les LT totaux circulants, par rapport à la condition non stimulée (*Pinot F, 1999 ; Hobson J, 1991 ; Tsuchiya M, 1992 ; Carnevali S, 2003 ; Hernandez CP, 2013; Hubbard RC, 1987 ; Hubbard RC, 1987 ; Morrison D, 1999*).

Un modèle murin exposé 1h à la fumée de cigarette présente un lavage broncho alvéolaire (LBA) avec des concentrations importantes de 8-OHdG et de 4HNE par rapport aux souris non exposées (*Aoshiba K, 2003*).

L'ensemble de ces études souligne le rôle du tabagisme chronique dans l'augmentation des marqueurs de stress oxydatif.

3.3.1.2. Profil oxydatif des patients atteints de BPCO

Le taux d'H₂O₂ du condensat de souffle expiré des patients atteints de BPCO est plus important que les individus sains comprenant les fumeurs et non-fumeurs (*Dekhuijzen PN, 1996 ; Dekhuijzen PN, 2004 ; Murata K, 2013*). Cependant, des études ont fait la distinction entre les fumeurs et non-fumeurs ainsi qu'entre les patients à des stades différents de la maladie. Les résultats mettent en évidence que les taux d'H₂O₂ restent plus élevés chez les patients à un stade avancé de la maladie en comparaison des fumeurs sains (*Kharitonov SA, 2001; Rahman I, 2003*).

En accord avec ces données, des biomarqueurs du stress oxydatif, comme les produits de la peroxydation lipidique, sont détectés à des taux élevés dans le condensat de l'air exhalé (*Montuschi P, 2000*), le tissu pulmonaire (*Rahman I, 2002*), l'expectoration (*Rytilä P, 2006*) et les PBMC totaux (*Ceylan E, 2006*) des fumeurs atteints de BPCO par rapport à des fumeurs indemnes de BPCO et des non-fumeurs. Il est également détecté une augmentation de la 8-Hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OH-dG), marquant les dommages oxydatifs de l'ADN par la présence d'ERO dans le poumon périphérique des patients emphysémateux (*Deslee G, 2009 ; Aoshiba K, 2012*).

L'activité de l'enzyme, la xanthine oxidase, reflète la production d'O₂⁻. Or, cette activité est augmentée dans le LBA de patients BPCO par rapport aux non-fumeurs sains (*Pinamonti S, 1996*). L'augmentation des marqueurs de stress oxydant de patients avec BPCO post-tabagique par rapport aux témoins est accompagnée d'une production accrue d'ERO par des cellules pulmonaires et systémiques obtenues de ces patients.

La relation causale entre la production accrue d'ERO et la survenue de la maladie, et particulièrement de l'emphysème, est mise en évidence dans des modèles animaux. Effectivement, le traitement par des antioxydants tels que la N-acetyl-cystéine (*Rubio ML, 2004*) ou la thioredoxine (*Kinoshita T, 2007*) protègent les animaux contre l'emphysème induit par l'élastase. De même, des modèles murins surexprimant la CuZnSOD, une enzyme détoxifiant l'O₂⁻, sont protégées de l'emphysème induit par la fumée de cigarette ou par l'élastase (*Foronjy RF, 2006*).

En conclusion, les marqueurs de stress oxydatif sont surexprimés par les individus exposés à un tabagisme chronique (Patients BPCO et fumeurs sains), en comparaison des individus sains non-fumeurs. Ces résultats sont confortés par les différents modèles murins. En outre, les patients à un stade très avancé de la maladie présentent un stress oxydant plus important que les fumeurs sains ; ce qui explique que le stress oxydatif soit l'un des mécanismes responsable du développement de la maladie.

3.3.2. Les systèmes antioxydants

Comme nous l'avons vu précédemment (§ 2.4.2.2), les systèmes de détoxification présents dans le poumon sont multiples et incluent à la fois des éléments extracellulaires tels que le glutathion et des éléments intracellulaires tels que la SOD, la catalase ou l'hème-oxygénase-1 (HO-1) dépendant du système Nrf2 (*Cho HY, 2006*).

3.3.2.1. Systèmes antioxydants des fumeurs par rapport aux non-fumeurs

L'analyse de prélèvements sanguins issus des fumeurs comparés à celle des non-fumeurs révèle :

- une augmentation du GSSG (*Muscat JE, 2004*)
- une diminution des taux d'ascorbate (*Lykkesfeldt J, 2000*)

- une diminution drastique du GSH (*Morrison D, 1999 ; Rahman I, 2000 ; Rahman I, 1995*)

Cependant, les niveaux d'antioxydants dans le tissu pulmonaire des fumeurs sont très élevés comparés à ceux des individus sains. En effet, les systèmes antioxydants tels que le GSH sont surexprimés dans le poumon des fumeurs par rapport aux sujets sains non-fumeurs (cellules épithéliales) (*Rusznak C, 2000 ; Barnes PJ, 2004; Rahman I, 1999*). D'autre part, certaines études montrent qu'un supplément d'ascorbate réduit les marqueurs de stress oxydatif dans le plasma sanguin des fumeurs par rapport aux non-fumeurs (*Dietrich M, 2003 ; Barnes PJ, 2004; Rahman I, 1999*) ; ceci suggère un rôle du tabagisme chronique dans l'induction du stress oxydatif. De plus, l'exposition aigue à la fumée de cigarette diminue les niveaux de cystéines intracellulaires de façon transitoire dans le plasma sanguin et confirme le rôle du tabac (*Tsuchiya M, 1992*).

En accord avec ces données, des études *in vitro* d'exposition aigue (entre 1-24h) au CFC sur une lignée cellulaire de pneumocytes de type II A549 montrent une diminution du niveau de glutathion ainsi que dans le LBA des rats instillés en intratrachéal par du CFC alors que les poumons des animaux présentent des niveaux élevés de GSH (*Li XY, 1994 ; Carnevali S, 2003*). En revanche, des souris exposées à la fumée de cigarette, ont des taux de glutathion et thiols élevés dans le LBA par rapport à des souris non exposées (*Bilimoria MH, 1992*).

L'étude comparative des profils oxydatifs (marqueurs de stress oxydatif) entre les fumeurs et non-fumeurs confirment l'implication du tabagisme dans la diminution des systèmes antioxydants dans la circulation sanguine. Cependant, il est observé une augmentation de ces systèmes dans le tissu pulmonaire plus exposée aux constituants de la fumée de cigarette ; ceci pourrait expliquer l'induction des systèmes du GSH dans le poumon.

3.3.2.2. Systèmes antioxydants des patients atteints de BPCO

Chez les patients avec BPCO l'expression de certains systèmes antioxydants est dépendante de la sévérité de la maladie. En effet, l'expression pulmonaire de la MnSOD, HO-1/HO-2 et du GSH augmente au niveau des cloisons alvéolaires au stades modérés de la maladie (*Harju T, 2004 ; Drost EM, 2005*).

En revanche, les macrophages alvéolaires des sujets atteints de BPCO sévère expriment l'HO-1 à un niveau inférieur à celui des macrophages alvéolaires de sujets fumeurs sains (*Maestrelli P, 2003*).

De même, l'expression de Nrf2 est plus faible dans le poumon emphysémateux humain par rapport au poumon de sujets fumeurs indemnes d'emphysème ou non-fumeurs (*Goven D, 2008*). Les mécanismes moléculaires à l'origine de la diminution de l'expression pulmonaire de Nrf2 et HO-1 chez les patients avec BPCO ne sont pas bien connus à l'heure actuelle, mais semblent impliquer le facteur de transcription DJ-1 (*Malhotra D, 2008*). Quoiqu'il en soit, la diminution de l'expression de ces systèmes est probablement impliquée dans la physiopathologie de l'emphysème post-tabagique chez l'homme. En effet, des expériences sur des modèles murins ont montré que ces systèmes protègent les souris de l'emphysème (*Foronjy RF, 2006*).

Des souris invalidées pour Nrf2 présente une susceptibilité accrue à l'emphysème induit par l'élastase (*Ishii Y, 2005*) et la fumée de cigarette (*Iizuka T, 2005*). La même susceptibilité accrue est observée chez les souris invalidées pour le gène HO-1.

3.3.3. Relation entre stress oxydatif et inflammation

Le stress oxydatif déclenché par l'exposition à la fumée de cigarette participe à la réaction inflammatoire pulmonaire observée dans l'emphysème post-tabagique via, entre autres, le recrutement pulmonaire de cellules inflammatoires. Une relation entre les marqueurs de stress oxydatif dans l'air exhalé et le nombre de neutrophiles dans le LBA a pu être observée (*Drost EM, 2005*).

De plus, la comparaison des niveaux de GSH et IL-8 (inflammation) indique un lien dans la physiopathologie de l'emphysème. En effet, la diminution des niveaux de GSH corrélerent avec l'augmentation de la production d'IL-8 ; ces observations sont spécifiques des patients aux stades avancés de la maladie (*Schulz C, 2003 ; Schulz C, 2004*).

L'infiltrat inflammatoire pulmonaire est composé de polynucléaires neutrophiles, de macrophages et de lymphocytes TCD8+ activés (*Drost EM, 2005*). Il est présent dans le poumon emphysémateux au niveau des parois alvéolaires et sont associés à la maladie.

L'augmentation des macrophages et LT dans le poumon des fumeurs est corrélée négativement avec les fonctions respiratoire / aux non-fumeurs (*Finkelstein R, 1995 ; O'Donnell R, 2006*).

L'intensité de la réaction inflammatoire pulmonaire est corrélée à la destruction des cloisons interalvéolaires (*Eidelman D, 1990*). Il est intéressant de noter la présence d'une composante immune caractérisée par des Lymphocytes activés et effecteurs.

3.3.4. Rôle des lymphocytes dans la maladie

3.3.4.1. Lymphocytes T

Le tissu pulmonaire (parenchyme, artères ou bronches périphériques) des patients emphysémateux montrent une augmentation du nombre de lymphocytes TCD3+ et CD8+ (*O'Shaughnessy TC, 1997*). D'autre part, l'augmentation du nombre de TCD8+ activés pulmonaire (*Saetta M, 1998 ; Saetta M, 1999*) et périphérique est directement corrélée à l'insuffisance respiratoire et donc la sévérité de la maladie (*Zhu X, 2009*). Par ailleurs, les patients BPCO présentent une expression importante des cellules CXCR3+ au niveau de l'épithélium bronchique (*Saetta M, 1998*). Or, nous avons décrits précédemment les populations Th1 qui sont caractérisés par ce marqueur. Toutes ces données sur les lymphocytes soulignent leur importance dans le développement de la maladie. Depuis peu, des sous-populations TCD4+ régulatrices Treg et inflammatoires effectrices Th17 sont identifiés dans le LBA, poumon ou encore dans le sang périphérique.

De plus, des modèles chez la souris déficiente pour CD8 sont protégés de l'emphysème induit par la fumée de cigarette (*Maeno T, 2007*). Les Lymphocytes TCD8+ activés semblent avoir un rôle important dans la pathogenèse de la maladie mais également les TCD4+ en raison de leur rôle direct dans l'activation des autres lymphocytes. En effet, des souris ayant été exposées à la fumée de cigarette et préalablement déplétées en TCD4+ ou TCD8+ sont protégés de façon identique de la destruction alvéolaire causée par la fumée de cigarette (*Podolin PL, 2013*). En outre, le pourcentage des Th17 dans le poumon diminue dans les souris déplétées à la fois pour TCD4+ et TCD8+. Ces données ouvrent de nouvelles perspectives thérapeutiques dans l'inhibition de réponses inflammatoires liées aux lymphocytes.

3.3.4.2. Balance Th17/Treg (§ 1.4. 6)

Les lymphocytes Th17 privilégient et renforcent la réponse des cellules de l'immunité innée. Les échantillons de prélèvements sanguins ou de biopsies pulmonaires ou de LBA issus de patients atteints de BPCO, montrent aussi une augmentation de la production d'IL-17 par des lymphocytes TCD4+ qui est directement corrélée à l'insuffisance respiratoire observée pendant la maladie (*Di Stefano A, 2009 ; Doe C, 2010 ; Vargas-Rojas MI, 2011; Zhang J, 2013*). Une proportion élevée des populations Th17 circulantes et pulmonaire chez les patients atteints de BPCO confirment le rôle de ces lymphocytes dans la contribution à l'inflammation chronique. Des études in vitro montrent que les cellules dendritiques issus de patients BPCO favorise une différenciation des TCD4+naïfs vers un phénotype Th17 (IL17-A+, CCR4+CCR6+CXCR3+) (*Shan M, 2009*) Des modèles murins d'exposition à la fumée de cigarette mimant les effets observés durant la BPCO, ont montré une augmentation de la production d'IL-17 par des cellules CD4+CCR6+ dans le LBA et tissu pulmonaire (*Harrison OJ, 2008*). De plus, les souris déficientes pour le récepteur CCR6, et exposées à la fumée de cigarette (FC), sont partiellement protégées de l'emphysème pulmonaire avec une réponse inflammatoire atténuée associée à des niveaux de chimiokines et cytokines proinflammatoires diminués (*Bracke KR, 2006*). De même, la déficience pour le récepteur de l'IL-17, l'IL-17RA, prévient l'installation de l'emphysème chez les souris exposées à la fumée de cigarette (*Chen K, 2011*).

Les données concernant les populations Treg sont controversées mais semblent tout de même indiquer qu'il y a une anomalie au niveau proportionnelle de cette population dans le tissu pulmonaire. En effet, certaines équipes ont montré qu'il y a un défaut de recrutement de ces populations dans le poumon des patients atteints de la maladie par rapport à des fumeurs sains (*Barceló B, 2008 ; Isajevs S, 2009 ; Smyth LJ, 2007*). Au contraire d'autres études présentent une augmentation de la fréquence des cellules CD4+CD25high au niveau du parenchyme pulmonaire chez les sujets emphysémateux. En revanche, ces Treg révèlent des anomalies fonctionnelles : une diminution de l'expression de CD27 (*Smyth LJ, 2007*) ou une augmentation de l'expression de CD127 (*Isajevs S, 2009*). Depuis peu, de nouveaux travaux de recherche ont affirmé les données précédentes en se basant sur les données de Miyara et al (*Miyara M, 2009*). Effectivement, comme nous l'avons présenté précédemment il existe 3 sous-populations de nTreg : Treg naïfs (CD25high CD45RA+ FOXP3 high), les Treg effecteurs (CD25high CD45RA- Foxp3high) et les cellules non régulatrices (inflammatoires)

CD25^{high} CD45RA⁻ Foxp3^{low}. Ces résultats montrent que le pourcentage des sous-populations régulatrices issues des nTreg circulants est diminué par rapport à la sous-population inflammatoire chez un patient atteint de BPCO en comparaison des témoins non-fumeurs et fumeurs sains. Ce déséquilibre pourrait expliquer la progression de la maladie en partie (Hou J, 2013).

L'ensemble de ces données démontrent que le tissu pulmonaire des patients BPCO et des souris issus des modèles expérimentaux de BPCO présente : un défaut de recrutement des Treg et une proportion importante des Th17. Un déséquilibre de la balance Th17/Treg pourrait contribuer à l'inflammation chronique observée durant la BPCO. Mais les données sur ces dysfonctionnements lymphocytaires sont limitées. Cependant, une étude récente met en évidence l'existence de la balance Treg/ Th17, dans un modèle murin d'exposition à la fumée de cigarette (Figure 30) (Wang H, 2012).

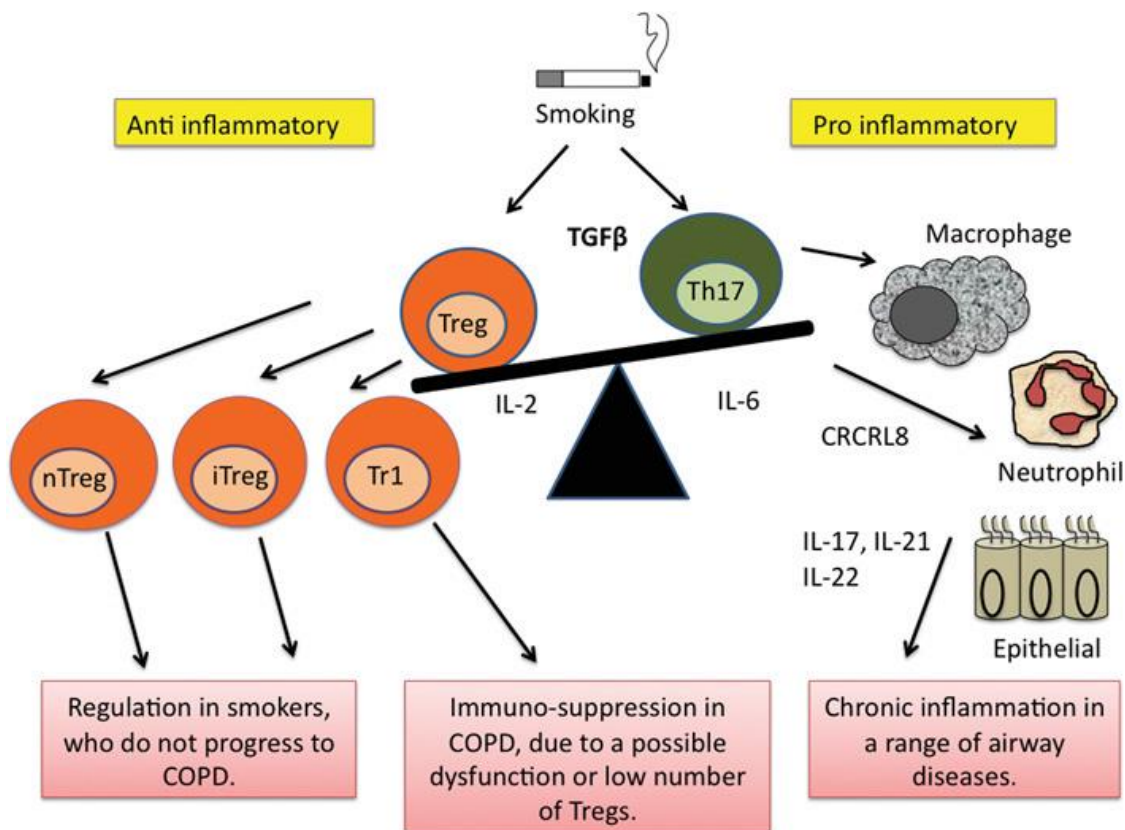


Figure 30. Modélisation hypothétique de la dérégulation Treg / Th17 dans la BPCO

3.3.5. Sénescence cellulaire et vieillissement accéléré

La sénescence cellulaire consiste en un état d'arrêt permanent de la prolifération et participe aux processus de vieillissement (*Collado M, 2007*), et présentent également un phénotype pro-inflammatoires par la sécrétion des nombreuses cytokines, chimiokines, qui modifient l'environnement cellulaire (*Kuilman T, 2009*). L'implication de la sénescence dans le développement de la BPCO a déjà été mis en évidence. Cependant, les mécanismes moléculaires impliqués de la sénescence par la fumée de cigarette et le rôle causal de la sénescence dans le développement de l'emphysème sont peu connus à l'heure actuelle.

3.3.5.1. Comparaison entre les fumeurs et non-fumeur sains

Augmentation de l'expression de p53 dans le poumon des fumeurs par rapport aux non-fumeurs. Cependant, l'arrêt du tabac provoque une légère diminution de p53, chez les patients atteints de BPCO (*Morissette MC, 2008*).

Chez l'homme, des données de la littérature montrent l'existence de marqueurs de sénescence cellulaire (raccourcissement des télomères, induction de l'expression de la protéine p53) au niveau de leucocytes circulants chez des sujets fumeurs par rapport à des non-fumeurs (*Morlá M, 2006*). Des données expérimentales reproduisent ce type de résultat au niveau pulmonaire, soulignant le rôle de l'exposition à la fumée de cigarette.

En effet, *in vivo* chez la souris, il a été mis en évidence une sénescence accélérée dans les cellules alvéolaires après 15 jours d'exposition à la fumée de cigarette (*Tsuji T, 2004*). Par ailleurs, l'exposition *in vitro* de cellules épithéliales alvéolaires murins et de fibroblastes humains à la fumée de cigarette induit une sénescence accélérée (*Tsuji T, 2004 ; Nyunoya T, 2006*), inhibée par des antioxydants (*Tsuji T, 2004*).

Au final, ces études suggèrent l'existence d'une sénescence accélérée, secondaire à un stress oxydant.

3.3.5.2. Comparaison des patients aux sujets sains

Des études récentes ont mis en évidence des marqueurs de sénescence (raccourcissement des télomères et expression protéique augmentée de p21 et p16) dans les cellules épithéliales alvéolaires *in situ* et dans des fibroblastes *in vitro* issus de poumons de patients avec emphysème post-tabagique (Tsuji T, 2006 ; Muller KC, 2006). De même, l'expression de p53 est augmentée *in situ* au niveau pulmonaire dans l'emphysème post-tabagique en comparaison des non-fumeurs et fumeurs sains (Morissette MC, 2008) .

Concernant les télomères, des études ont montré que le raccourcissement de leur longueur est associé à une diminution de l'activité de la télomérase dans les cellules pulmonaires issues de patients atteints de BPCO en comparaison des témoins sains. (Amsellem V, 2011; Tsuji T, 2006).

Par la suite, d'autres équipes ont mis en évidence un lien entre la longueur des télomères, la fonction respiratoire et la susceptibilité à la maladie dans les PBMC totaux de patients atteints de BPCO par rapport aux témoins fumeurs ou non (Savale L, 2009 ; Houben JM, 2009; Morlá M, 2006; Lee J, 2012; Rode L, 2013). Un lien a été aussi établie entre la longueur des télomères des leucocytes circulants et le taux plasmatique de cytokines inflammatoires dont IL-6 (IL-8, IL-1 β , IL-6...) qui est plus important chez les fumeurs BPCO et fumeurs que les sujets sains (Savale L, 2009). Cet ensemble d'éléments montre clairement l'existence d'une sénescence accrue au niveau pulmonaire et systémique chez les patients avec BPCO par rapport aux témoins non-fumeur, mais aussi par rapport aux témoins fumeurs.

Finalement, une étude récente propose un lien entre des télomères courts et la susceptibilité accrue à développer un cancer chez les patients BPCO (Lee J, 2012). Le raccourcissement des télomères joue probablement un rôle dans la physiopathologie de l'emphysème. En effet, Adler et collaborateurs ont montré une sensibilité accrue à développer un emphysème post-tabagique chez des souris avec des télomères raccourcis suite à la délétion de la sous unité catalytique de la télomérase (Alder JK, 2011).

De plus on observe des marqueurs d'immunosénescence chez les patients atteints de BPCO :

- Lymphocytes du sang périphérique, diminution du ratio de LT CD4+/CD8+ avec une augmentation du nombre de TCD8+ périphériques (*Barceló B, 2008*).
- Lymphocytes du sang périphérique, augmentation de la proportion LTCD4+CD28- et LTCD8+CD28- (*Hodge G, 2011*) et augmentation de la sécrétion de molécules de cytotoxicité (Granzyme B, perforine) (*Lambers C, 2009 ; Barceló B, 2008*).
- Leucocytes du sang périphérique, raccourcissement de la longueur des télomères (*Savale L, 2009 ; Houben JM, 2009 ; Morlá M, 2006 ; Lee J, 2012 ; Rode L, 2013*)

3.3.6. Les autres mécanismes

Le déséquilibre de la balance protéase / antiprotéase est responsable d'une dégradation excessive des protéines de la matrice extra-cellulaire, en particulier de l'élastine. Les protéases impliquées dans l'emphysème sont essentiellement des sérines protéases telles que l'élastase du polynucléaire neutrophile et des métalloprotéases de la matrice (MMP). Dans le poumon des patients atteints de BPCO, l'élastase du neutrophile est co-localisée avec les lésions d'emphysème (*Damiano VV, 1986*). Les MMP-1, MMP-2, MMP-9, MMP-12 et MMP-14 ont été retrouvées à un taux plus élevé dans le LBA des sujets emphysémateux.

Les modèles animaux ont souligné le rôle causal d'un excès de ces protéases dans la survenue de l'emphysème. L'instillation d'élastase dans la trachée est un modèle classique d'emphysème expérimental qui mime les effets observés pendant la phase aiguë (*Gross P, 1965*). L'invalidation du gène codant pour l'élastase du polynucléaire neutrophile chez la souris diminue de 59 % l'emphysème induit par la fumée de cigarette (*Shapiro SD, 2003*) alors que l'invalidation du gène codant pour MMP-12 les protège complètement (*Hautamaki RD, 1997*).

D'autre part, certaines études ont mis en avant le rôle d'une apoptose accrue des cellules alvéolaires dans la survenue de la maladie. En effet, des cellules alvéolaires apoptotiques ont été mises en évidence dans le poumon des sujets emphysémateux (*Yokohori N, 2004 ; Imai K, 2005*). Beaucoup d'arguments sont en faveur d'une implication directe de l'apoptose dans le

développement de l'emphysème et l'apoptose des cellules endothéliales pouvant induire une destruction des espaces aériens chez la souris (*Kasahara Y, 2000 ; Petrache I, 2006*).

Synthèse du chapitre : La BPCO

La BPCO est une maladie secondaire à l'exposition à la fumée de cigarette. Cette maladie est caractérisée par un trouble ventilatoire obstructif fixé associé à un remodelage bronchique (bronchite) et alvéolaire (emphysème). Plusieurs mécanismes physiopathologiques sont décrits dont le stress oxydatif, la dérégulation des populations lymphocytaires et la sénescence. Le tabagisme chronique chez les individus sains induit une surexpression des marqueurs du stress oxydatif restreints au poumon et au plasma sanguin (oxydation de l'ADN, lipides, taux d'ERO ; diminution des systèmes antioxydants). Contrairement aux patients atteints de la BPCO, les fumeurs sains sont capables d'activer les systèmes de détoxification dans le poumon exposé à de fortes concentrations d'oxydants. De plus, le tabagisme induit également des réponses inflammatoires initiées par les cellules de l'immunité innée mais également adaptative de type Th1/Th2/Th17 et Treg. Cependant, les réponses inflammatoires Th en particulier Th17 sont majorées chez les Fumeurs atteints de BPCO en comparaison des fumeurs sains. Cette augmentation de Th17 est compensée grâce à l'action immunosuppressive des Treg chez les fumeurs sains alors qu'elle est déficiente chez les patients atteints de BPCO en particulier au stade avancée de la maladie. Les mécanismes ne sont pas connus.

HYPOTHESE et OBJECTIFS

L'hypothèse qui détermine mon travail de thèse est que les lymphocytes Th17 ont une sensibilité accrue face aux agressions oxydatives par rapport autres lymphocytes T CD4+ conventionnels et aux lymphocytes T régulateurs, et que cette sensibilité accrue induit une susceptibilité accrue à la sénescence.

Le premier objectif de ma thèse a été de mettre au point les outils techniques, nécessaires à la réalisation du deuxième objectif dont :

- l'identification en cytométrie en flux, des sous-populations de lymphocytes T CD4+ du sang périphérique, les T conventionnels mémoires Th17 et non-Th17 (Th1 et Th2), et des lymphocytes T régulateurs (Treg), au sein d'une suspension lymphocytaire T enrichie par tri magnétique en lymphocytes T CD4+ ;

- la mesure des taux d'oxydants, à l'aide de différentes sondes métaboliques en cytométrie en flux, dans les différentes sous-populations lymphocytaires T CD4+, en réponse à différentes agressions oxydatives (THBP, condensat de fumée de cigarette, H₂O₂) ;

Le deuxième objectif a été de mesurer les niveaux d'oxydants des différentes populations lymphocytaires T CD4+, et d'identifier les mécanismes potentiellement responsables de leur production, en condition basale et après une agression oxydatif aiguë.

Le troisième objectif a été d'analyser la relation éventuelle entre l'agression oxydative et la sénescence dans la sous-population Th17 en comparaison des TCD4+ conventionnels mémoires non-Th17 et des Treg.

CHAPITRE II

Matériels et Méthodes

1. Préparation des suspensions cellulaires

1.1. Isolement des cellules mononucléées du sang périphérique

Principe

L'isolement des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) sur gradient de Ficoll repose sur les densités respectives différentes des constituants du sang (plasma, cellules mononucléées, érythrocytes et granulocytes) et du Ficoll. Après centrifugation, les cellules mononucléées sont localisées dans un anneau opaque à l'interface plasma/ Ficoll (Figure 31).

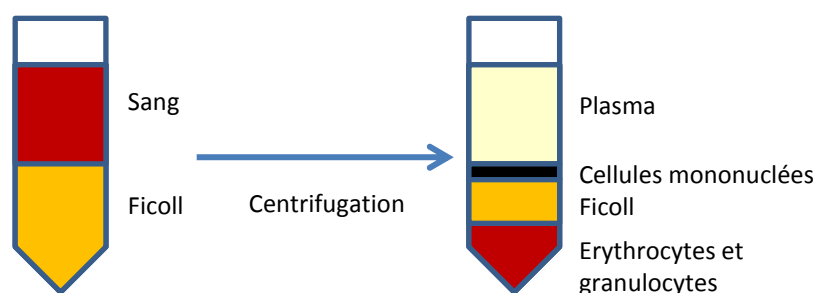


Figure 31. Séparation des cellules mononucléées sur gradient de Ficoll

Matériel et mode opératoire

Dans notre étude, l'isolement de PBMC totaux est effectué à partir de culots cellulaires riches en leucocytes, résidu de filtration de don de cytophèrese, issus de donneurs volontaires sains (D.V.S) et provenant de l'Etablissement Français du Sang (EFS) de Créteil. Le contenu du culot cellulaire (8-10 ml) après dilution au demi avec du milieu RPMI (Gibco), est déposé à volume égal dans un tube contenant du milieu de séparation des leucocytes ou Ficoll (Tube unisep), et centrifugé (2200 rpm, 15 min). Les PBMC concentrées dans un anneau à l'interface plasma / Ficoll (Figure 31) sont récupérées et lavées 1 fois dans 50ml de milieu complet (RPMI 1640 + 10% SVF + 1% de L-glutamine + 1% acide aminé non essentiel (AANE) + 1% sodium pyruvate +1% pénicilline/streptomycine) par centrifugation à 1500 rpm pendant 10 minutes, puis récupérées et diluées dans un volume approprié du même milieu.

Le nombre de PBMC et la viabilité cellulaire sont évalués dans du bleu Trypan à 0,4% (Sigma) et à l'aide d'une cellule de MALASSEZ au microscope optique (décrits plus loin). Les cellules sont ensuite congelées dans un milieu approprié (milieu complet avec 80% SVF + 20% DMSO) à -80°C puis dans l'azote liquide. Pour des raisons d'organisation, l'ensemble des travaux présentés dans ce document a été fait sur des cellules décongelées, après vérification préalable des premiers résultats obtenus faits en parallèle sur des PBMC « frais » et des PBMC décongelées.

1.2. Purification des Lymphocytes TCD4+ par tri magnétique

Principe

Le tri cellulaire magnétique consiste à sélectionner un type cellulaire marqué avec un anticorps spécifique couplé à des billes magnétiques, et l'isoler dans une colonne contenant des particules ferromagnétiques (colonne LS), grâce au champ magnétique d'un aimant. Les cellules non marquées par l'anticorps et donc dépourvues de billes magnétiques ne sont pas retenues dans la colonne et sont éluées dans une première fraction de l'éluat « la fraction négative ». Les cellules marquées positivement par l'anticorps sont retenues dans la colonne placée dans l'aimant ; elles sont récoltées, après élimination de la « fraction négative » en retirant la colonne de l'aimant, au moyen d'une seringue fixée au sommet de la colonne ; c'est ce qu'on appelle « la sélection positive ». Cette technique de sélection peut induire l'activation des cellules triées par stimulation du récepteur reconnu par l'anticorps couplé aux billes magnétiques (Figure 32).

Il existe aussi des tris magnétiques par sélection négative, qui consistent à marquer les cellules non ciblées avec un cocktail d'anticorps conjugués à de la biotine et avec des billes magnétiques conjugué avec un anticorps anti-biotine ; les cellules d'intérêt sont donc contenues dans la « fraction négative. Cette technique de déplétion est utilisée pour éviter une activation des cellules par l'anticorps de tri, ou pour garder la membrane cellulaire libre d'anticorps pour un marquage ultérieur par des anticorps d'analyse par cytométrie en flux.

Matériel et mode opératoire

L'enrichissement de PBMC en lymphocytes T CD4+ est réalisé par une déplétion négative immunomagnétique, en suivant le protocole donné par le fournisseur (Miltenyi Biotech, Human CD4+ Tcell isolation Kit). Les PBMC totaux sont reprises par 40µl/ 10⁷ cellules d'un tampon de tri (PBS 1X, 2mM EDTA, 0.5% SVF), puis marquées avec 10µl/10⁷ cellules d'un cocktail d'anticorps conjugués à de la biotine anti-CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR γ/δ, and CD235a (Glycophorin A), pendant 10 min à 4°C. Ce cocktail d'anticorps permet d'isoler toutes les cellules mononucléées du sang périphérique excepté les lymphocytes T CD4+. Puis la suspension cellulaire est incubée avec 20µl /10⁷ cellules d'un mélange de billes magnétiques conjuguées avec un anticorps anti-biotine, pendant 15 min à 4°C. Après le marquage avec les billes magnétiques, les cellules sont lavées, resuspendues dans 500µl/10⁸ cellules du tampon de tri et sont déposées sur une colonne de tri de type LS (Miltenyi Biotech), positionnée à l'intérieur d'un support aimanté (Figure 32).

Sous la force du champ magnétique, les cellules marquées autres que T CD4+ sont retenues à l'intérieur de la colonne LS. La fraction négative, contenant les cellules TCD4+ non marquées, est collectée en premier. La pureté du tri magnétique et la viabilité cellulaire sont vérifiées par cytométrie en flux (CMF), à l'aide de 2 anticorps un anti-CD3 -FITC et un anti-CD4 -l'APC efluor780 (e-Biosciences) combiné à un marquage 7-AAD (décrits plus loin). On estime que le tri est de bonne qualité lorsque 95-98 % des cellules triées sont positives pour le marqueur CD4. Les cellules triées sont ensuite mises au repos pendant la nuit dans du milieu complet, dans une étuve à 37°C et 5% CO₂. Le lendemain les cellules sont lavées et remises en suspension dans du milieu complet contenant 2,5% SVF, et sont utilisées dans les différentes expériences de caractérisation du niveau d'ERO, du stress oxydatif et les marqueurs de sénescence (décrites plus loin).

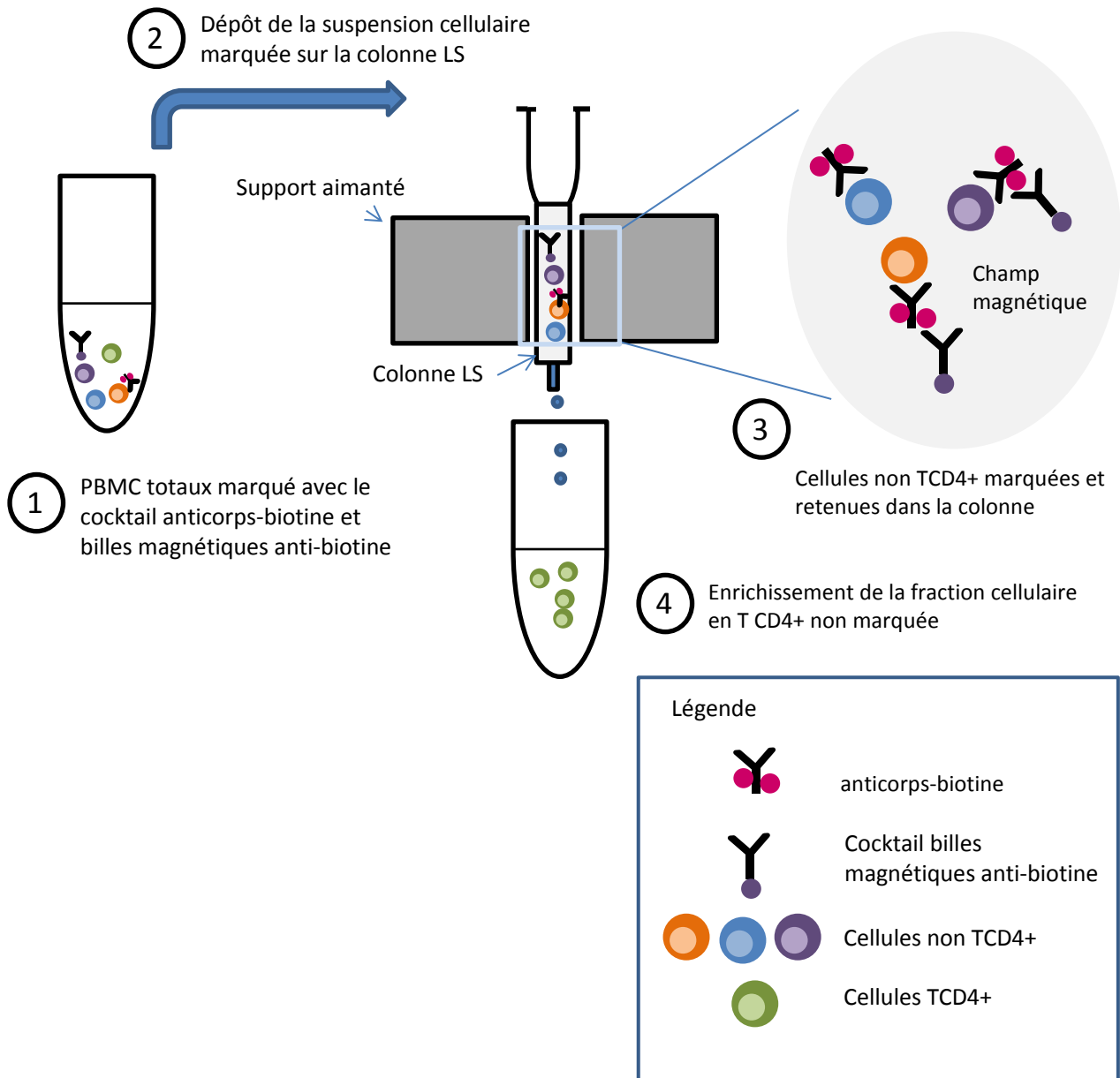


Figure 32. Purification des Lymphocytes TCD4+ par tri magnétique (sélection négative)

1.3. Evaluation de la viabilité

1.3.1. Coloration au Bleu de Trypan

Principe

La coloration au Bleu de Trypan est une méthode de coloration spécifique des cellules mortes. En effet, le bleu de trypan a tendance à s'accumuler dans le cytoplasme des cellules dont les membranes sont lésées et donc perméables au colorant, comme les cellules mortes. Au contraire, les cellules vivantes possèdent une membrane cellulaire intacte qui empêche l'entrée du colorant. La distinction se fait au microscope optique, les cellules mortes deviennent bleues et les cellules vivantes restent blanches.

Matériel et mode opératoire

Un aliquot de 20 μ l des cellules (PBMC totaux (avant et après décongélation) ou LTCD4+ triés) complété par 80 μ l de bleu trypan à 0,4% dans NaCl, est déposé sur une cellule de Malassez dont le volume est connu, pour la numération des cellules vivantes et mortes. Après numération, les cellules sont lavées et la densité cellulaire est ajustée à 10.10⁶cellules /ml (pour congélation) ou à 10.10⁶cellules /40 μ l (pour tri cellulaire) ou à 1.10⁶cellules/ml (pour mise au repos des cellules pendant la nuit).

1.3.2. Evaluation de la viabilité par cytométrie en flux (CMF)

L'estimation de la viabilité des cellules peut se faire, soit sur des cellules non marquées via les paramètres FSC/SSC (décrits plus loin), soit à l'aide de marqueur fluorescent spécifique.

1.3.2.1. Utilisation des propriétés de diffusion de la lumière

Principe

La diffusion de la lumière est sensible aux variations de taille, de structure interne de la cellule. Lorsque la membrane plasmique des cellules est endommagée, les signaux de diffusion aux petits angles (FSC) sont faibles ce qui est caractéristique des cellules mortes mais insuffisant comme critère dans une population hétérogène. La combinaison du paramètre FSC au paramètre de diffusion aux grands angles (SSC) permet d'améliorer cette discrimination entre cellules mortes et vivantes (cf. Fonctionnement d'un CMF).

Matériel et protocole opératoire

Le contrôle « cellules non marquées », important dans le réglage des paramètres FSC/SSC, utilisés pour séparer les lymphocytes des monocytes humains, permet aussi de visualiser les cellules mortes (Figure 33). En raison des problèmes de compensation de fluorescence engendrés par les différents fluorochromes utilisés dans les protocoles 5 et 6 couleurs (tri des sous-populations lymphocytaires et détection des niveaux d'ERO), cette méthode de détection de la viabilité cellulaire est privilégiée face à l'utilisation de marqueurs fluorescents.

1.3.2.2. Le 7-Aminoactinomycin D (7-AAD)

Principe

Le 7-AAD est un agent intercalant de l'ADN, dont la fluorescence est proportionnelle à l'augmentation du complexe 7-AAD/ADN. L'intégrité de la membrane des cellules est une caractéristique essentielle à l'incorporation de ce marqueur à l'intérieur des cellules. L'estimation de la viabilité cellulaire se fait donc par exclusion de la fluorescence du 7-AAD (Figure 33).

Matériel et mode opératoire

Les LTCD4+ triés non marqués ou marqués avec un anti-CD3 FITC et CD4 APCefluor780 (vérification de la pureté du tri magnétique Cf. Annexe, résultats supplémentaires) sont incubés 5 min avec 3µl de 7-AAD (eBiosciences) à température ambiante et la lecture de fluorescence se fait sur le cytomètre de flux CyAnTM ADP (Dako, Glostrup, Danemark) à une longueur d'onde d'excitation de 488 nm (longueur d'onde d'émission de 610 nm).

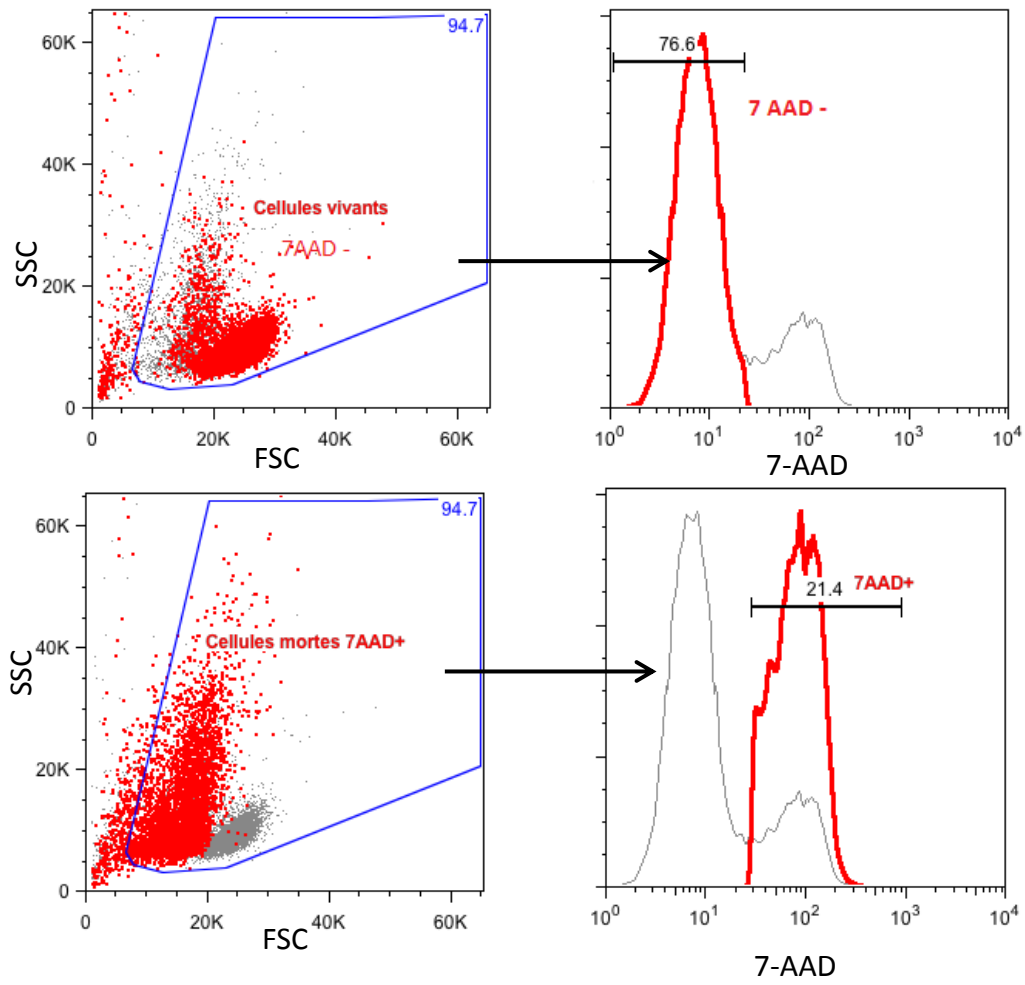


Figure 33. Identification des cellules mortes par le marquage 7-AAD et les paramètres FSC/SSC.

1.4. Isolation des populations lymphocytaires par CMF

Principe de la cytométrie en flux (CMF)

La cytométrie en flux est une technique qui permet de mesurer simultanément la réaction à un rayonnement laser de plusieurs paramètres de particules individuelles (cellules, bactéries, billes...) en suspension dans un liquide et entraînée dans un flux. Ces paramètres peuvent être physiques tels que la taille, la granularité mais aussi n'importe quel composant (protéine membranaire ou interne) ou fonction qui puisse être détecté à l'aide d'un composé fluorescent. Il est donc possible d'identifier dans une suspension cellulaire hétérogène, une sous-population rare, et /ou possédant une fonction cellulaire particulière, grâce à des marqueurs détectables par fluorescence ou via les caractéristiques physiques de la cellule, et éventuellement de la séparer physiquement des autres cellules.

1.4.1. Fonctionnement d'un analyseur et trieur de cellules

Les cellules en suspension défilent rapidement les unes derrière les autres dans un flux de liquide (liquide gaine), grâce à un système de pression. Chaque cellule va passer devant un ou plusieurs faisceaux lasers (sources lumineuses) et émet des signaux lumineux de différentes natures :

- la diffusion aux petits angles dans l'axe du laser, renseigne sur la taille des cellules (FSC)
- la déviation aux grands angles à 90°C par rapport au laser, renseigne sur la structure interne et la granularité des cellules (SSC)
- la fluorescence émise à 90°C par rapport au laser, par un anticorps couplé à un fluorochrome ou un autre composé fluorescent lié spécifiquement à la cellule

Ces signaux optiques et physiques sont dirigés vers des détecteurs (PMT) grâce au banc optique qui est constitué de miroirs, de filtres. Le rôle du banc optique est de sélectionner uniquement les longueurs d'ondes destinées à chaque type de PMT. Chaque PMT collecte une fluorescence spécifique (FL) et va la transformer en signal électrique qui sera à son tour numérisé (Figure 34). Les données numérisées recueillies se présentent sous forme de

graphiques (dot-plot) ou d'histogrammes, auxquels s'ajoutent des statistiques concernant les populations cellulaires et les paramètres étudiés (% , intensité de fluorescence, ...).

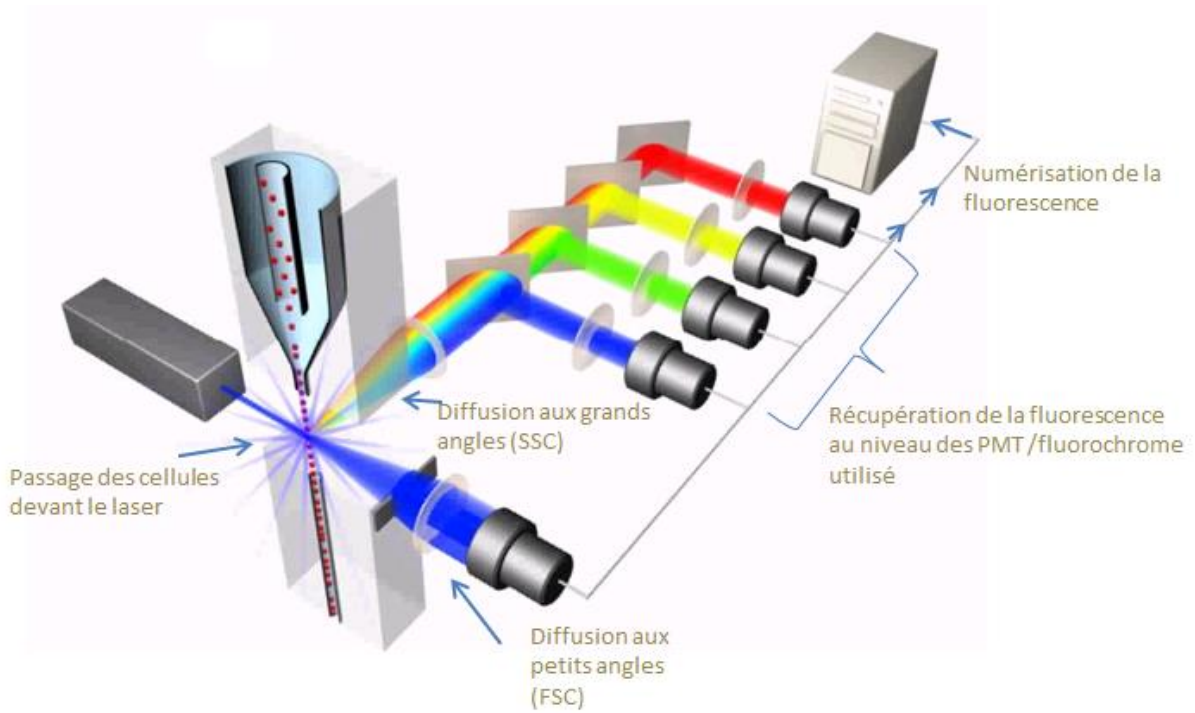


Figure 34. Principe de la cytométrie en Flux

Les données obtenues en FSC et SSC (sans anticorps couplé à un fluorochrome) permettent d'isoler les cellules en fonction de la taille et structure. Les résultats ci-dessous sont présentés sous forme de dot-plot (Figure 35).

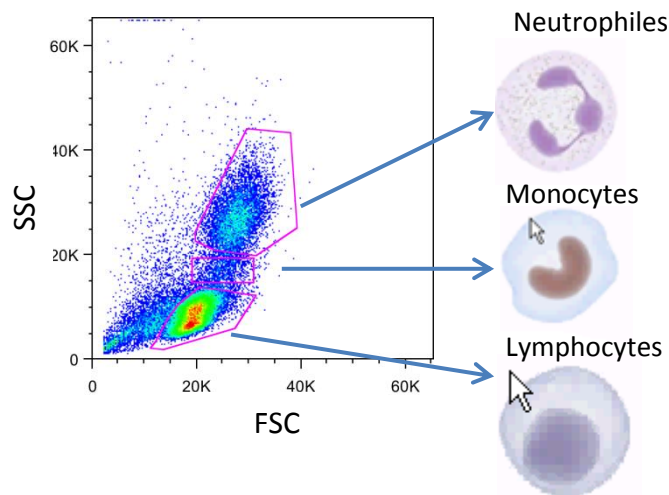


Figure 35. Identification de types cellulaires en fonction des paramètres FSC et SSC

L'analyseur permet la visualisation de populations spécifiques, grâce à un multimarquage d'anticorps couplés à des fluorochromes (Figure 36). Le trieur de cellules, quant à lui, se distingue de l'analyseur, par sa capacité supplémentaire à séparer physiquement un type cellulaire d'une population hétérogène en plus de son identification. Les cytomètres que nous avons utilisés pour notre étude, sont un analyseur avec 2 sources lumineuses (CyAnTM ADP (Beckman Coulter), et 7PMT qui peuvent analyser 7 fluorescences différentes sur une même cellule, et un trieur de cellules avec 7 PMT également (Moflow, Beckman Coulter) (trajet optique du cyan en annexe).

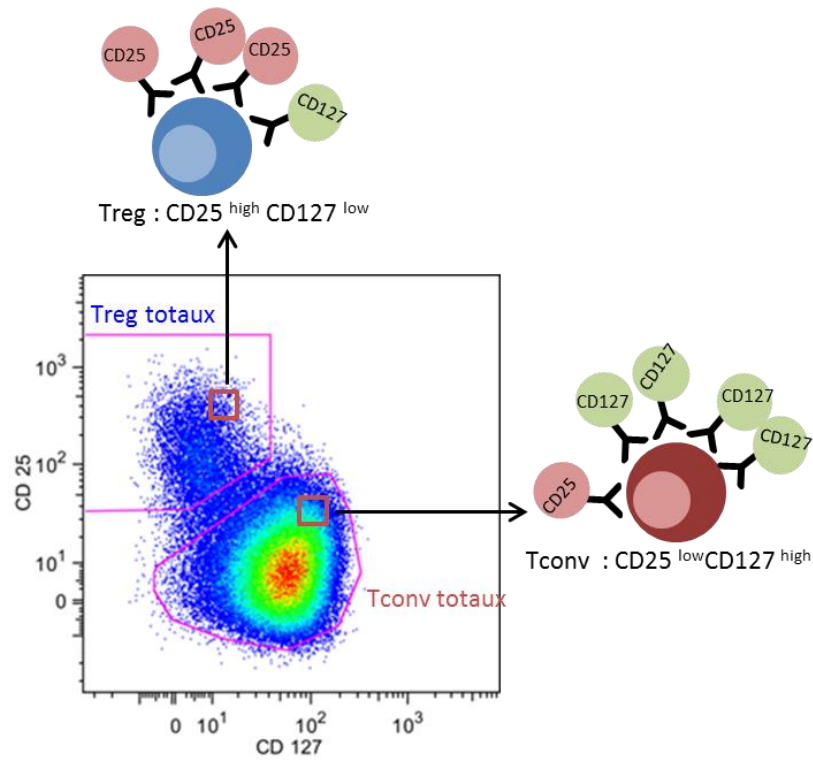


Figure 36. Données recueillies au niveau des PMT à partir de cellules marquées

1.4.2. Caractérisation des sous-populations lymphocytaires

L'isolement par un trieur de cellules de sous-populations lymphocytaires à partir d'une suspension cellulaire enrichie par tri magnétique en LTCD4+ nécessite de déterminer préalablement la stratégie de tri à adopter. Pour ce faire, il faut avoir une connaissance des différentes caractéristiques de ces sous-populations d'intérêt : % parmi la population mère, type de marqueurs membranaires ou intracellulaires spécifiques de la sous-population d'intérêt.

Choix de la combinaison d'anticorps

Dans notre projet, nous nous sommes intéressés aux sous-populations lymphocytaires :

- Treg totaux (naïfs et mémoires), identifiés par les marqueurs membranaires CD4+, CD25^{high}, CD127^{low}
- Tconv naïfs, caractérisés par les marqueurs CD4+, CD25-, CD127+, CD45RO-
- Th17, décrits comme étant CD4+, CD25-, CD127+, CD45RO+, **CCR6+**
- Non Th17, qui sont CD4+, CD25-, CD127+, CD45RO+, **CCR6-**

La connaissance de la littérature sur l'expression membranaire de ces marqueurs pour chaque sous-population, nous a permis de mettre au point un protocole 5 couleurs pour leur visualisation par cytométrie en flux.

L'association de l'immunofluorescence à la cytométrie en flux est donc un élément clé dans la caractérisation de sous-populations. En effet, dans une suspension de LTCD4+ l'utilisation d'anticorps couplés à un fluorochrome, dirigés contre des marqueurs membranaires ou intracellulaires permet d'identifier des sous-populations lymphocytaires. Le trieur, que nous utilisons, permet d'utiliser 7 anticorps de couleurs différentes.

Le point limitant est l'utilisation simultanée de plusieurs anticorps dans une même suspension cellulaire. En effet, il existe un phénomène de chevauchement des spectres d'émission de fluorescence des différents fluorochromes. Ce chevauchement peut entraîner par exemple une contamination du canal PMT2 par la fluorescence d'un fluorochrome qui se lit en PMT1 (Annexe Résultat 1), et entraîner un faux marquage. Il existe donc un système de compensation de fluorescence qui permet de corriger ce phénomène, en soustrayant la fluorescence contenue dans le canal contaminé. Une compensation supérieure à 50% peut interférer dans la détection d'une population faiblement représentée, il est donc important de tester au préalable différentes combinaisons d'anticorps et fluorochromes. Des tubes de cellules monomarquées/ anticorps (ou billes de compensations) sont nécessaires pour effectuer la compensation. La combinaison d'anticorps utilisée dans l'identification de sous-populations lymphocytaires, ainsi que les témoins de marquage utilisés, sont détaillées dans le tableau 7 et 8.

Tube	Description	CD127-PE	CD45RO ECD	CCR6-Pecy7	CD25 APC	CD4 APCeFluor780
1	Cellules non Marquées	-	-	-	-	-
2	Tube expérimental	X	X	X	X	X
3	Contrôles de compensation	X				
4			X			
5				X		
6						X
7						
8	FMO-CD127	Iso type contrôle-PE	X	X	X	X
9	FMO-CD45RO	X	Iso type contrôle-ECD	X	X	X
10	FMO-CCR6	X	X	Iso type contrôle-Pecy7	X	X
11	FMO-CD25	X	X	X	Iso type contrôle-APC	X
12	FMO-CD4	X	X	X	X	Iso type contrôle-APC eFluor780

Tableau 7 . Descriptif des témoins de marquage utilisés pour un marquage 5 couleurs

En cytométrie de flux, certains contrôles sont indispensables. En effet, l’ajustement du voltage de chaque PMT à un niveau seuil et des paramètres FSC/SSC pour la visualisation des populations cellulaires, est effectué sur un tube de cellules non marquées. D’autre part, comme nous l’avons décrit précédemment, les contrôles de compensation sont d’une importance capitale dans le contrôle du phénomène de chevauchement des spectres de fluorescence. De plus, en cytométrie en flux, les résultats sont généralement présentés sous forme d’histogrammes mono ou biparamétriques et il est alors possible de définir une région autour des cellules d’intérêts. La délimitation d’une région sur un histogramme nécessite pour certains marquages un contrôle « FMO ou Fluorescence Minus One ou Fluorescence Moins une » (« décrits dans la partie « Analyse conditionnée »). Dans chacun des contrôles FMO-

antigène X, un des anticorps anti-antigène X est remplacé par l'anticorps de contrôle isotypique correspondant (Tableau 7).

Matériel et mode opératoire

Les PBMC totaux (2.10^6 cellules/condition) ou L TCD4+ triés (1.10^6 cellules/condition) sont lavés (1400 rpm, 10 min) puis remis en suspension dans 100 μ L de tampon de tri avec 5 μ l de Fc Block (prévention du marquage non spécifique en bloquant les sites FcR des cellules), (Miltenyi Biotech), pendant 10min à 4°C. Ensuite, la suspension cellulaire est incubée avec un milieu (mix) contenant les différents anticorps (Tableau 8) pendant 20min à 4°C. En parallèle, des tubes de contrôle des compensations (Billes BD Biosciences) par anticorps, de cellules non marquées ainsi que des contrôles « FMO » sont préparés (Tableau 7). A la fin de l'incubation, les cellules sont lavées par ajout de 1 ml de PBS froid et reprise dans environ 400 μ l de tampon de tri. Les cellules sont prêtes pour la lecture de fluorescence à l'analyseur (Cyan ADP, Beckman Coulter).

Anticorps	Fluorochrome	Source d'excitation (nm)	Canal de lecture de fluorescence	Volume anticorps (µl)/réaction (Après titration des différents anticorps)	Fournisseur
Anti-CD27	FITC	488 (laser bleu)	FL-1	4	eBiosciences
Anti-CD127	PE	488 (laser bleu)	FL-2	15	Beckman coulter
Anti-CD45RO	ECD	488 (laser bleu)	FL-3	5	Beckman coulter
Anti-CCR6	Pecy7	488 (laser bleu)	FL-5	4	BD Biosciences
Anti-CD25	APC	633 (laser rouge)	FL-8	3	BD Biosciences
Anti-CD4	APC efluor780	633 (laser rouge)	FL-9	3	eBiosciences

Tableau 8. Informations relatif aux anticorps utilisés pour l'identification des populations lymphocytaires

1.4.3. Principe de l'analyse conditionnée multiparamétrique

Comme il a été mentionné plus haut, les résultats de cytométrie en flux se présentent souvent sous la forme d'histogrammes monoparamétriques (un paramètre décrivant un marqueur en abscisse ; en ordonnée le nombre d'événements ou nombre relatifs de cellules) ou encore biparamétriques (un paramètre en abscisse et un autre en ordonnée) et dans ce cas, le nombre d'évènements est représenté sous-forme de nuage de points (un point = une cellule ou un événement) (Figure 37). Pour un marquage ou une combinaison de marquages, l'analyse peut révéler plusieurs sous-populations, il est alors possible de tracer une région autour d'elles et de limiter la suite des analyses à l'une ou chacune d'entre elles. C'est ce qu'on appelle l'analyse conditionnée ou encore « stratégie de gating ».

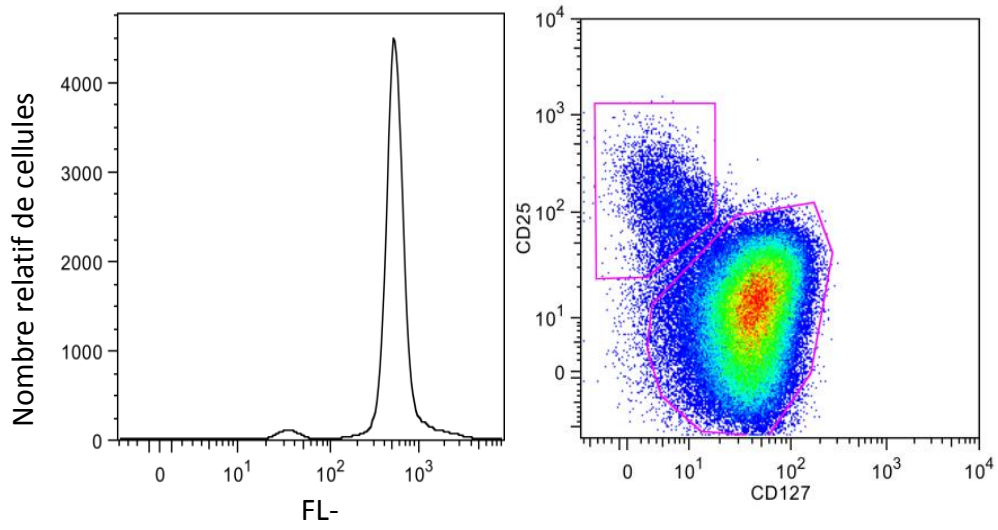


Figure 37. Type d'histogrammes en CMF monoparamétrique (gauche) et bi-paramétrique (à droite)

1.4.3.1. L'analyse conditionnée du projet

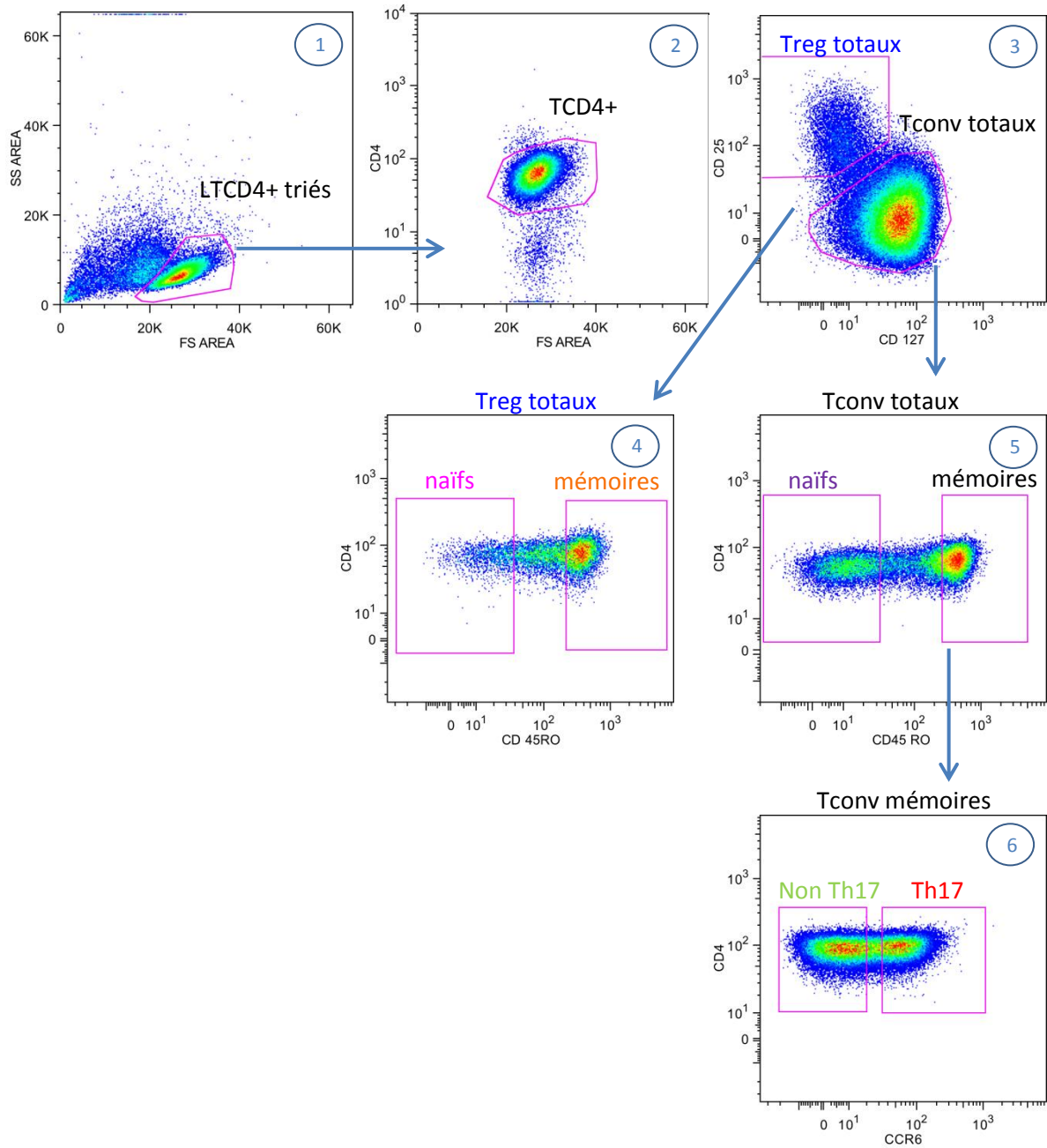


Figure 38. Stratégie de tri adoptée pour l'isolation des 3 sous-populations d'intérêts à partir de LTCD4+ triés

En 1, les lymphocytes ainsi que la viabilité sont identifiées sur les paramètres FSC (taille) /SSC (structure), sur un histogramme bi-paramétrique (appelé « dotblot »). Puis en 2, la fenêtre (conditionnée sur les lymphocytes) est sélectionnée sur les paramètres CD4 et FSC, ce sont les lymphocytes TCD4+ (LT CD4+) (Figure 38).

En 3, deux populations sont visibles et des régions sont tracées autour d'elles, l'une contient des LT CD4+ qui sont CD25^{high}CD127⁻, ce sont les Treg totaux ; l'autre contient les Tconv totaux de phénotype CD4+CD25⁻CD127⁺.

En 4, la fenêtre est conditionnée sur les Treg totaux et analysés sur les paramètres CD4 / CD45RO. Le dot-blot présente deux populations CD4+, l'une négative pour le marqueur CD45RO- les Treg naïfs, et l'autre positive pour CD45RO+, les Treg mémoires.

En 5, les Tconv naïfs (CD4+CD45RO-) sont différenciés des mémoires (CD4+ CD45RO+) parmi les Tconv totaux au moyen du marqueur CD45RO.

Pour conclure sur cette description d'analyse, en 6 l'histogramme sélectionné sur le marqueur CCR6 se présente sous la forme d'un dot blot, chaque région représente une population parmi les Tconv mémoires. La délimitation de chaque région est faite à l'aide du tube FMO-CCR6, les cellules CCR6- identifient les non Th17 et les CCR6+ les Th17. L'analyse de ces sous-populations dans chaque fenêtre, nécessite au minimum 3000 événements, ce qui donne une précision suffisante statistiquement pour des populations représentant plus de 1% des LTCD4+.

Une stratégie d'identification des sous-populations représentée dans la Figure 38 similaire permet la séparation physique des Treg totaux, Th17 et non Th17 par le trieur de cellules. Les sous-populations cellulaires ainsi isolées, sont utilisées pour des analyses d'Immunocytochimie ou de RT-PCR quantitative (décrites plus loin).

1.5. Vérification du tri cellulaire

La vérification du tri cellulaire peut se faire à la fois par une nouvelle analyse en CMF et par un marquage additionnel spécifique de la population.

1.5.1. CMF

La pureté du tri est contrôlée par prélèvement d'une petite fraction de la suspension triée suivie d'une analyse en CMF à nouveau. La vérification repose sur l'identification des marquages dans les fenêtres correspondants à chaque sous-population (Annexe, résultats supplémentaires).

1.5.2. Marquage intracellulaire de Foxp3

De plus, la population « Treg totaux » est contrôlée par CMF, par la positivité d'un marquage supplémentaire intracellulaire de Foxp3, un facteur de transcription spécifique de cette population (décrit dans l'introduction) (Annexe, résultats supplémentaires).

Matériel et mode opératoire

Le marquage FOXP3, est réalisé à l'aide d'un kit de marquage spécifique Foxp3 (Foxp3/Transcription Factor Staining buffer set, eBiosciences). Les Treg totaux triées (minimum de $50 \cdot 10^3$ cellules/tube), sont lavées (5min, 1500rpm) dans du tampon de tri puis les cellules sont fixées dans une solution de fixation/perméabilisation pendant 30min à température ambiante. Les cellules sont ensuite lavées dans 2ml de la solution de perméabilisation 1X puis incubées avec 5 μ l de l'anticorps Foxp3 FITC (eBiosciences) pendant 30min à température ambiante, à l'abri de la lumière. Le marquage est stoppé par deux lavages avec une solution de perméabilisation 1X, et la reprise des cellules s'effectue dans 300 μ l de PBS. Le marquage Foxp3 est visualisé par CMF (Cyan ADP).

1.6. Analyse de l'expression du marqueur d'activation CD27

Mode opératoire

Les LTCD4⁺ soumis à une agression oxydante aiguë ou chronique exogène, ou mis en culture dans des conditions de prolifération (2µg/ml d'anti-CD3 +/- CFC +/-NAC) pendant 72h, sont marqués à l'aide de 6 anticorps membranaires différents dans du PBS pendant 20min à 4°C selon le protocole de marquage membranaire (cf. caractérisation des sous-populations lymphocytaires). Le multimarquage 5 couleurs (Tableau 8), utilisé dans l'identification des sous-populations lymphocytaires est combiné au marquage membranaire anti-CD27 FITC. La lecture de la fluorescence, les concentrations des anticorps et l'analyse des résultats sont indiquées dans les tableaux 7 et 8.

2. Modèles *in vitro* d'agression oxydatif aigue

Principe

Le stress oxydatif est la réponse cellulaire à une rupture de l'équilibre des systèmes oxydants/anti-oxydants en faveur des oxydants. Un stress oxydatif peut être induit par une agression oxydante, et se traduire par une augmentation des niveaux cellulaires d'ERO.

2.1. Traitement par des inducteurs de stress oxydatif

Les LTCD4⁺ triés sont traitées avec du Tert -butyl hydroperoxide (THBP), un inducteur de stress oxydant. Une concentration non toxique a été déterminée par le test des effets de différentes concentrations du THBP sur des LTCD4⁺ marquées avec des sondes métaboliques que l'oxydation rend fluorescentes. Une augmentation significative de la fluorescence (reflétant le niveau d'ERO libérés) des sondes après traitement des TCD4⁺ avec le THBP par rapport aux cellules non traitées, indique un stress oxydatif (Ghosh M 2011 ; Labiós M 2008). Ces conditions sont atteintes pour 250µM (THBP) pendant un temps déterminé. Le contrôle de la viabilité cellulaire est déterminé en CMF par un multimarquage CD3/CD4/7-AAD. Les cellules ont également été traitées par une dose d'H₂O₂ (125µM) connue pour induire un stress oxydatif. Ces conditions constituent les témoins positifs de nos expériences.

2.2. Exposition *in vitro* au condensat de fumée de cigarette

La préparation de condensat de fumée de cigarette (CFC) se fait par un système de « bullage d'air » qui consiste à dissoudre les particules solubles de la fumée de cigarette (FC) dans un milieu (Tsuji T,2004 ; Jason Adamson 2011). La FC est aspirée au moyen du piston d'une seringue de 50ml contenant 10ml de milieu complet sans serum, et reliée à une tubulure qui est elle-même liée à un filtre directement fixé à un porte-cigarette. A chaque aspiration, le milieu est mélangé avec la FC pendant 30 secondes puis la fumée est relarguée à l'extérieur. Ce procédé est répété plusieurs fois jusqu'à consommation de la cigarette (Research Cigarette University of Kentucky) jusqu'à légèrement avant le filtre (Figure 39) (Tsuji T,2004 ; Jason Adamson 2011).

Le CFC obtenu est complété à 2,5% de SVF puis filtré sur une membrane 0,45µM, la concentration de CFC obtenue est la référence « 100% ». Ce dispositif reproduit les conditions de consommation d'une cigarette (aspiration de la fumée) chez l'homme. Le niveau d'augmentation de fluorescence de la sonde déterminant un stress oxydatif décrit précédemment, est obtenu par exposition des LTCD4+ à 5% ou 10% de CFC dilué dans du milieu complet 2,5% SVF, pendant un temps déterminé. Les doses toxiques de CFC ont été déterminées préalablement par une courbe-test dose/réponse évaluée par un multimarquage CD3/CD4 et 7-AAD (décrit précédemment) des LTCD4+.

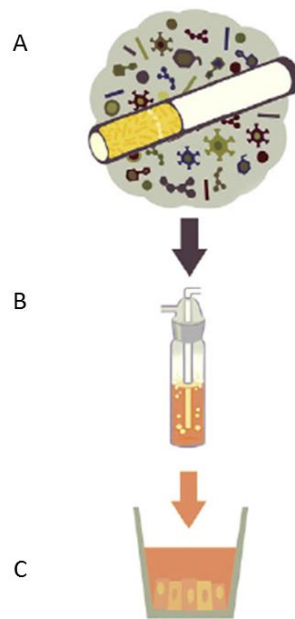


Figure 39. Schéma décrivant la préparation du condensat de fumée de cigarette. A. La fumée de cigarette est aspirée au moyen d'un piston ; B. La fumée est mélangée au milieu de culture ; C. le mélange est filtré.

Matériels et protocole opératoire

Les LT CD4+ triés magnétiquement sont traités pendant 30min à 37°C avec un milieu contenant : +/- 250µM THBP ou H₂O₂ ou 10% CFC. L'induction de stress oxydatif est mesurée par CMF au moyen de la fluorescence émise par les sondes métaboliques DHE ou H₂DCF-DA (décrites plus loin) pré-incubés avec les LTCD4+.

L'effet des inhibiteurs d'oxydants est testé par traitement des LTCD4+ avant le marquage avec les sondes, puis rajoutés durant la phase de stimulation par CFC ou THBP (cf. plus loin).

2.3. Exposition prolongée aux inducteurs de stress oxydatif

L'augmentation des ERO dans les LTCD4+ a été analysée de deux façons, l'une induite par l'exposition exogène au CFC, et l'autre après stimulation du complexe CD3/TCR des LTCD4+ (Cf. intro TCR et production d'ERO).

2.3.1. Condensat de fumée de cigarette

Les LT CD4+ ou les différentes sous-populations triées de LT CD4+, sont mises en culture dans un milieu complet à 1.10^6 cellules/ml, dans des plaques 96 puits à fond rond pendant 72h à 37°C, après stimulation ou non par 5% CFC. Le niveau d'ERO est mesuré par CMF via l'oxydation de la sonde H₂DCF-DA (décrit plus loin) après isolement des cellules (J0) et après 72h de culture.

2.3.2. Stimulation du complexe antigénique Tcr/CD3

Les LT CD4+ isolés magnétiquement, sont mises en culture dans un milieu complet à 1.10^6 cellules/ml, dans des plaques 96 puits à fond rond recouvert avec un anticorps anti-CD3 (2µg/ml), pendant 72h à 37°C. Les cellules sont lavées après 72h de culture puis sont incubées dans un milieu complet en présence de la sonde H₂DCF-DA pendant 30min à 4°C. Le niveau de d'ERO est mesuré par CMF via l'oxydation de la sonde H₂DCF-DA (décrit plus loin) à J0 et après 72h de culture.

3. Analyse qualitative du métabolisme oxydatif par CMF

3.1. Les sondes métaboliques : H₂DCF-DA et DHE

Principe

La sonde H₂DCF-DA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate), composé non fluorescent lipophile, traverse la membrane plasmique des cellules et se retrouve au niveau des régions lipidiques hydrophobes. Les estérases cellulaires hydrolysent les groupements acétates, libérant ainsi la molécule non fluorescente H₂DCF. Ce composé a la particularité de rester

dans la cellule contrairement au composé parent, à cause de sa polarité. Une fois piégée dans la cellule après la désacétylation, la sonde H_2DCF non fluorescente s'oxyde en présence d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de peroxydases ou Fe^{2+} ou cytochrome c, pour former le DCF qui est fluorescent. Aussi l'intensité de fluorescence est directement proportionnelle à la quantité d'ERO présents dans la cellule (Tsuchiya M, 1994 ; LeBel CP, 1992 ; Rothe G, 1990). Le composé non fluorescent a l'avantage d'être perméable aux membranes cellulaires, la fluorescence est donc détectée à l'intérieur de la cellule dans les différents compartiments cellulaires (cytosol, espace intermembranaire mitochondrial...) (Karlsson M, 2010) (Figure 40). Plusieurs données indiquent que cette oxydation est le fait préférentiellement du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), en conséquence, le niveau d' H_2O_2 d'une cellule spécifique peut être déterminé.

Suivant le même principe, la sonde DHE (Dihydroéthidium) non fluorescente, pénètre facilement dans les cellules, et est ensuite oxydée en présence d' O_2^- en BET, un agent intercalant de l'ADN (Stowe DF, 2009).

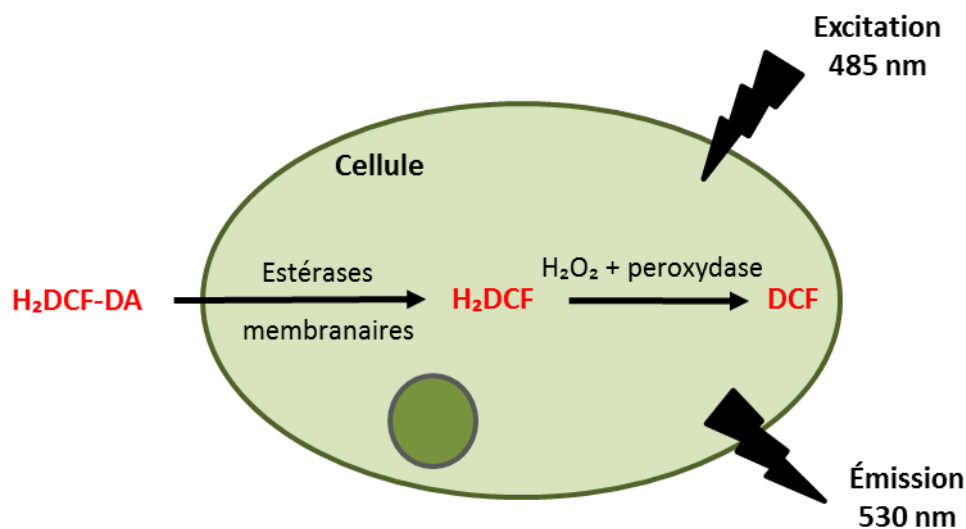


Figure 40. Principe de la sonde $H_2DCF-DA$

L'association du multimarquage des sous-populations lymphocytaires T parmi les $LTCD4^+$ (décrit dans « Analyse conditionnée multiparamétrique ») avec le marquage par des sondes métaboliques va permettre la mesure qualitative (en fonction de la sonde utilisée) et quantitative (via la MFI) des ERO pour chacune d'entre elles. A l'instar du multimarquage membranaire avec 5 couleurs, la principale difficulté de cette technique réside dans le

contrôle de la fuite de fluorescence des sondes oxydées dans les PMT voisins. L'utilisation de faibles concentrations de la sonde à une basse température a permis de mettre au point ce protocole 6 couleurs, permettant l'analyse des ERO dans des lymphocytes (*Kwon J, 2003 ; Devadas S, 2002*).

Matériel et mode opératoire

Les LTCD4⁺ triés magnétiquement et mis au repos pendant la nuit, sont mis en suspension dans du milieu complet comportant 2,5% SVF, dans des tubes de 5ml à fond rond (Falcon). Une pré-incubation des cellules (1.10⁶ cellules/ml) avec 0,25 µM de sonde H₂DCF-DA (Life technologies, C3168) ou 1µM de DHE (Life technologies), est réalisée pendant 30 min dans du milieu complet comportant 2,5% SVF à 4°C. Les traitements pharmacologiques avec la NAC (1h30 d'incubation) ou avec le FCCP (30min d'incubation) sont faits juste avant la phase d'incubation avec la sonde. Les expériences sont réalisées en prenant soin d'exposer le moins possible la sonde métabolique à la lumière.

L'agression oxydante aigüe est induite soit par l'addition de 250µM THBP (contrôle positif) soit par l'addition de 10% de CFC, pendant 30min à 37°C, dans des cellules préalablement incubées avec 0,25µM de la sonde H₂DCF-DA ou 1µM de DHE. Cette étape est critique, les cellules doivent être bien homogénéisées ; ceci permet d'obtenir un marquage homogène des LTCD4⁺ avec les différentes sondes. Puis le milieu pro-oxydant est retiré, et les cellules sont lavées deux fois avec du PBS froid. Les cellules sont finalement reprises dans 100 µL de PBS et marquées avec les 5 différents anticorps pour l'identification des sous-populations lymphocytaires T (décrit dans la partie « Préparation des suspensions cellulaires »).

Concernant les expériences d'analyse de l'effet d'une agression oxydante prolongée, le marquage des cellules avec les sondes est pratiqué à J0 et 72h selon le même mode opératoire que précédemment décrit, excepté en ce qui concerne les concentrations de CFC (Cf. agression oxydante chronique). La vérification de l'absence de toxicité des oxydants (THBP, CFC) est évaluée à chaque fois par CMF via l'analyse des paramètres FSC/SSC, au moment de la lecture de fluorescence émise par la sonde utilisée. La fluorescence émise par les sondes

est lue immédiatement au CMF après une absorption de la lumière à 488 nm (laser1), celle de DCF dans le PMT1 (ou FL-1), et celle du BET dans le PMT4 (ou FL-4). Le traitement des résultats dans ce projet est fait au moyen du logiciel d'analyse FLOW JOW (BD Biosciences).

De plus, l'analyse des résultats en CMF permet d'extraire des données de statistiques comme le pourcentage que représente une sous-population cellulaire donnée au sein de la population mère analysée. Les intensités de fluorescence (MFI) émises par les sondes par une population particulière, permettent une évaluation quantitative de son taux d'ERO. L'augmentation du % d'oxydation d'une sonde après une agression oxydante aigüe ou chronique peut être calculée par cette formule :

$$\% \text{ OXYDATION} = \frac{[\text{MFI (condition d'agression)} - \text{MFI (condition non stimulée)}]}{\text{MFI (condition non stimulée)}}$$

Les problèmes de variation dans le marquage ou de dé-estérification de la sonde sont évalués, par l'utilisation d'une forme oxydée de la sonde, la Carboxy-DCFDA (Life technologies) à 0,25µM (*Harlin H, 2007 ; Mougiakakos D, 2009*).

3.2. Mesure d'ERO des populations de TCD4+ par CMF

Nous avons utilisé la stratégie de tri des populations lymphocytaires T (décrite dans « Analyse conditionnée multiparamétrique) en la combinant à l'analyse du marquage par des sondes métaboliques.

Un histogramme mono-paramétrique conditionné sur chacune des sous-populations lymphocytaires T est sélectionné en abscisse sur l'une des sondes. Un pic uniforme (ou plusieurs selon les marquages) de distribution gaussienne, indique le niveau de fluorescence d'une population pour la sonde utilisée. Puis les histogrammes spécifiques de chaque population sont superposés (« overlay ») afin de comparer les pics de fluorescence entre eux et donc les niveaux d'ERO via les valeurs de MFI (Figure 41).

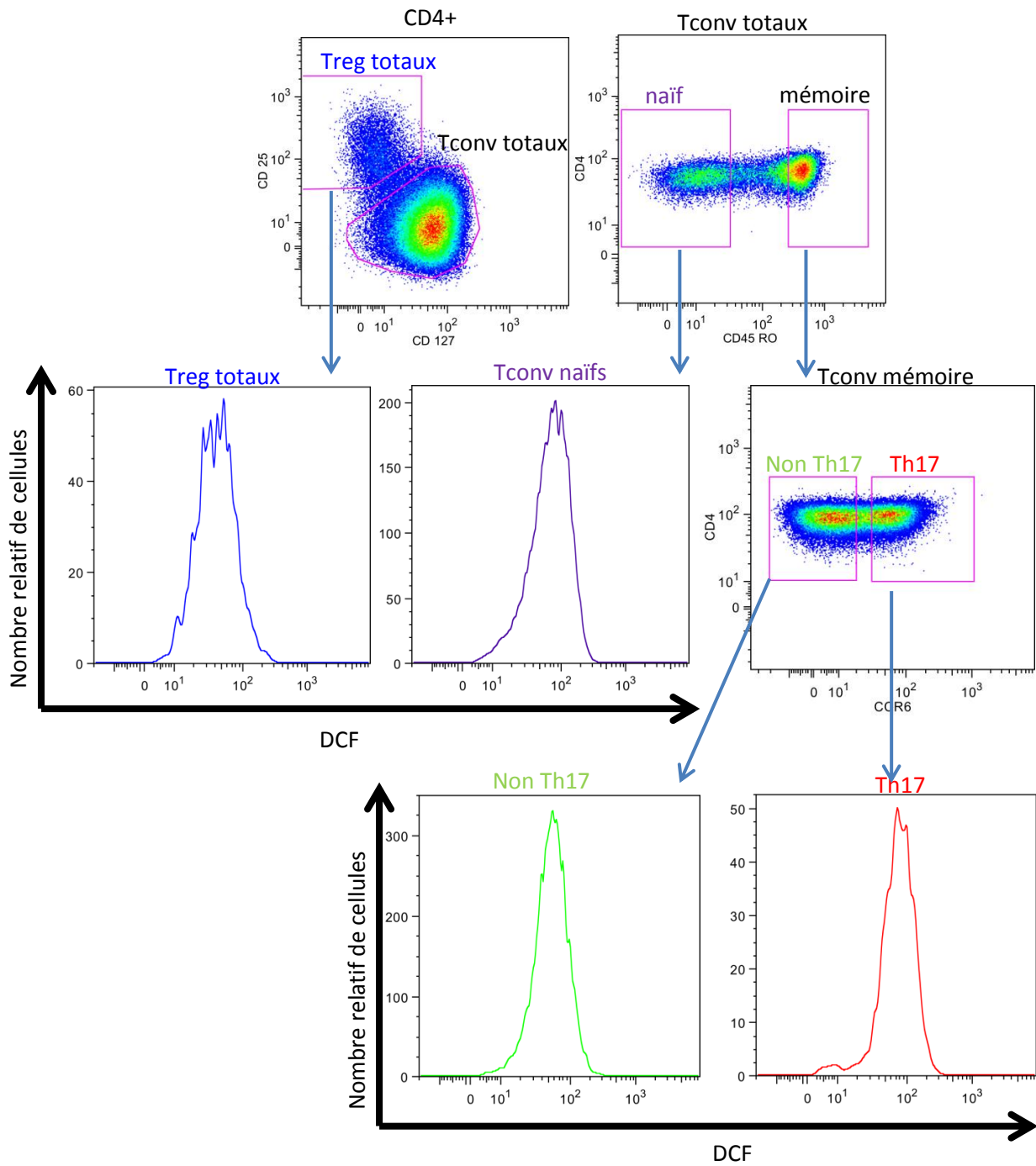


Figure 41. Caractérisation des ERO de chaque sous-population lymphocytaire

4. Traitements par des inhibiteurs d'ERO

Principe

La N-acétylcystéine (NAC) est un précurseur du glutathion, un antioxydant puissant.

La concentration optimale d'utilisation de la NAC a été déterminée par des tests d'effet dose de la NAC sur le niveau d'ERO des LTCD4+ marqués avec le H₂DCF-DA, en présence ou non de CFC. Des tests de toxicité utilisant le 7-AAD ont préalablement été réalisés. La concentration choisie à l'issue de ces tests est de 3mM de NAC.

Le FCCP est un agent découplant du gradient de protons de la chaîne respiratoire mitochondriale (cf. introduction). Les conditions optimales de son emploi ont été obtenues par des tests d'effet dose comme décrit pour la NAC. La concentration choisie à l'issue de ces tests est 2μM.

Matériels et mode opératoire

Les LTCD4+ ou les sous-populations de LTCD4+ triées ont pré-traités pendant 1h30 avec 3mM de NAC (solution stock 610mM diluée dans de l'eau distillée) à 37°C puis lavées. Selon les expériences, les cellules sont incubées dans un milieu complet-2.5%SVF contenant à nouveau de la NAC pendant 30min (+/- CFC pour analyse du niveau d'ERO) ou 24h (+/- CFC pour analyse en ICC des marqueurs de sénescence) ou 72h (+/- CFC ou anti-CD3) à 37°C. La procédure d'utilisation du FCCP est identique à celle de la NAC : les cellules ont été incubées pendant 30min avec 2μM de FCCP (solution stock à 10mM diluée dans du DMSO) et puis le FCCP a été ajouté aux milieux de stimulation. De plus, l'effet du DMSO seul sur les différentes conditions expérimentales a été contrôlé.

5. Détection des marqueurs de sénescence par microscopie

Principe de l'immunocytochimie (ICC)

C'est une technique qui permet d'identifier une protéine ou un antigène particulier dans des cellules et de le révéler par immunofluorescence. Un anticorps primaire reconnaît l'antigène d'intérêt puis dans un second temps un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome (ou une enzyme) et spécifique de l'anticorps primaire est utilisé pour la révélation de la réaction. C'est une méthode de détection indirecte qui présente une plus grande sensibilité pour l'ICC que la méthode directe où l'anticorps primaire est directement couplé à un fluorochrome (Figure 42).

Matériels et mode opératoire

Les sous-populations lymphocytaires Treg, Th17 et non Th17 isolées par le trieur de cellules (Mo Flow), sont mises au repos pendant la nuit (1.10^6 cellules/ml) dans une plaque 96 puits à fond rond, dans un milieu complet comportant 10% SVF à 37°C. Le lendemain les cellules sont lavées puis reprises dans un milieu complet comportant 2,5% SVF et mises en culture à 1.10^6 cellules/ml dans une plaque 96 puits à 37°C pendant 24h en présence ou non de 5% CFC avec ou non de la NAC. Le lendemain, les cellules sont lavées dans du PBS1X et reprises dans du PBS à 1.10^5 cellules/5 μ l.

La suspension cellulaire est déposée sur une lame « Superfrost Ultra plus » sous forme de spot (un spot par condition analysée). Les spots sont laissés à sécher à température ambiante, puis les cellules sont fixées par dépôt de 50µl d'une solution de PFA à 4% pendant 10min. Après 3 lavages de 5 min au PBS, les cellules sont incubées pendant 1h à température ambiante dans 100µl d'un milieu de perméabilisation (PBS1X + 0.3% triton+ 5% sérum de l'espèce dont l'anticorps secondaire est originaire). Puis les cellules sont incubées sur la nuit à 4°C en présence de l'anticorps primaire p21 ou p16 (Santa Cruz) dilué au 1/50 dans un milieu (PBS1X+ 0.3% triton+ 0.1% BSA). Le lendemain les spots cellulaires sont lavés 3 fois en PBS1X puis sont incubés pendant 1h à température ambiante avec l'anticorps secondaire marqué à l'AlexaFluor 594 dilué au 1/200 dans un milieu (PBS1X+ 0.3% triton+ 0.1% BSA). Les spots cellulaires sont lavés, et la lame est montée par dépôt de 3µl du milieu de montage Prolong + avec addition de Dapi pour marquage des noyaux sur chaque spot cellulaire, la lamelle est déposée. La fluorescence peut être lue au microscope à fluorescence par une source dont la longueur d'onde d'excitation de 594 nm et une longueur d'onde d'émission de 610 nm.

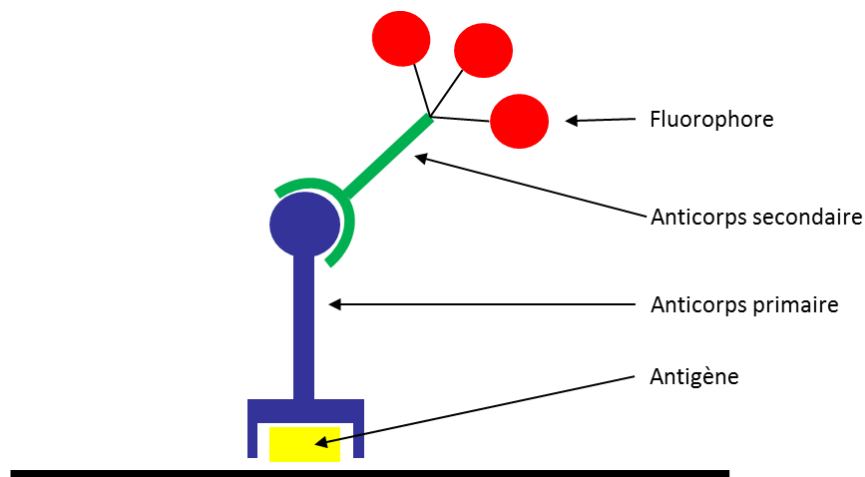


Figure 42. Principe de l'immunocytochimie

6. Analyse de l'expression des gènes impliqués dans le système oxydant/antioxydant

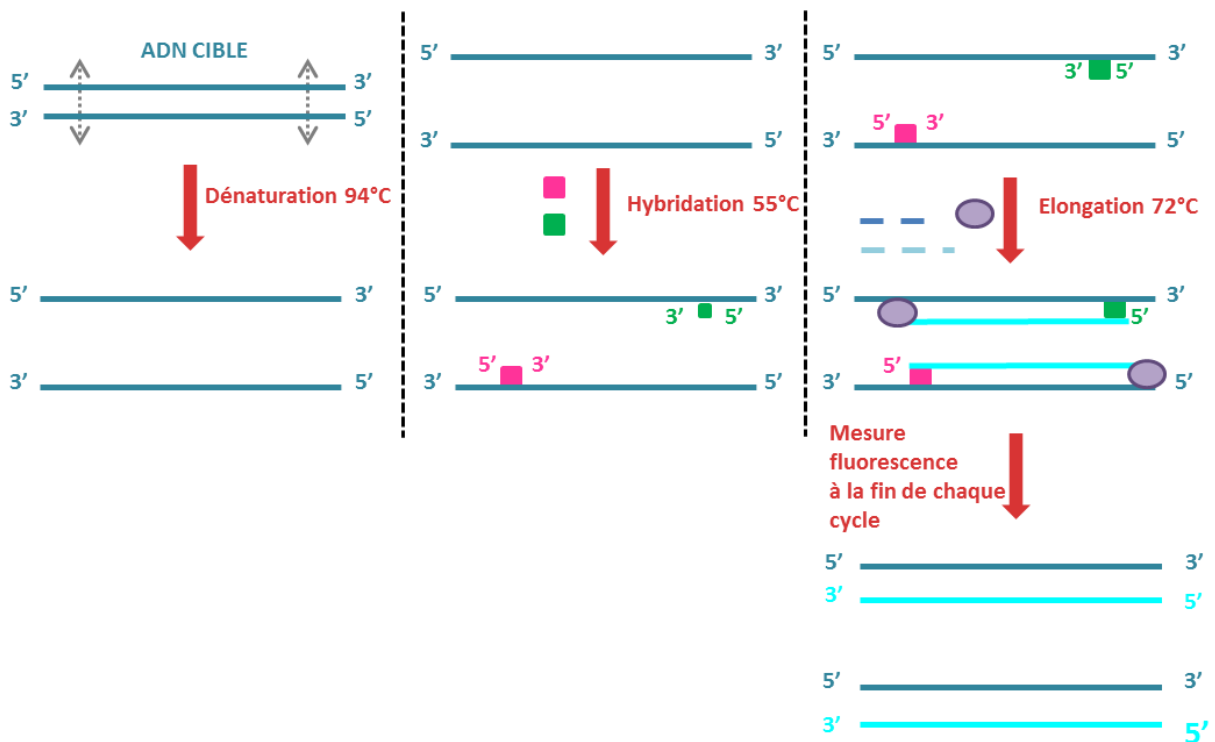
6.1. PCR quantitative : principe

La PCR classique est un système d'amplification en chaîne de l'ADN, mimant *in vitro* le mécanisme de répllication cellulaire et tirant profit des propriétés de l'ADN polymérase, capable de synthétiser un brin d'ADN à partir d'une amorce nucléotidique. Le processus d'amplification nécessite :

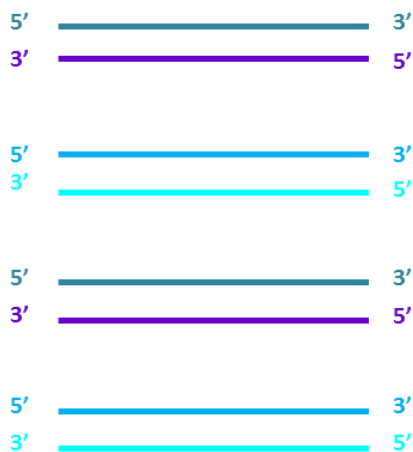
- une matrice d'ADN double brin contenant la région à amplifier
- un couple d'amorces sens et anti-sens spécifiques de la séquence d'intérêt
- l'enzyme Taq Polymérase (ADN polymérase), thermorésistante aux variations de températures importantes imposées à chaque cycle
- des désoxyribonucléotides (dNTP), qui sont les éléments de base utilisés par la Taq Polymérase pour synthétiser les brins d'ADN complémentaires

Une réaction de PCR correspond à une succession de cycles comportant chacun une étape de dénaturation, d'hybridation et d'élongation. A chaque cycle, la séquence d'ADN nouvellement synthétisée servira de matrice cible au cycle suivant (Figure 43).

1^{er} cycle



2^{ème} cycle



n cycles...

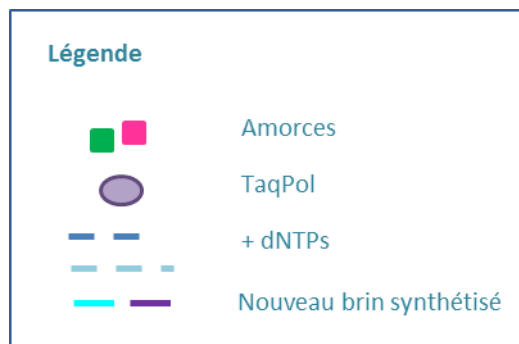


Figure 43. Déroulement d'une réaction de PCR classique

A la fin de la réaction, les amplicons ou produits d'amplifications (en théorie 2^n) sont détectables sur gel d'agarose.

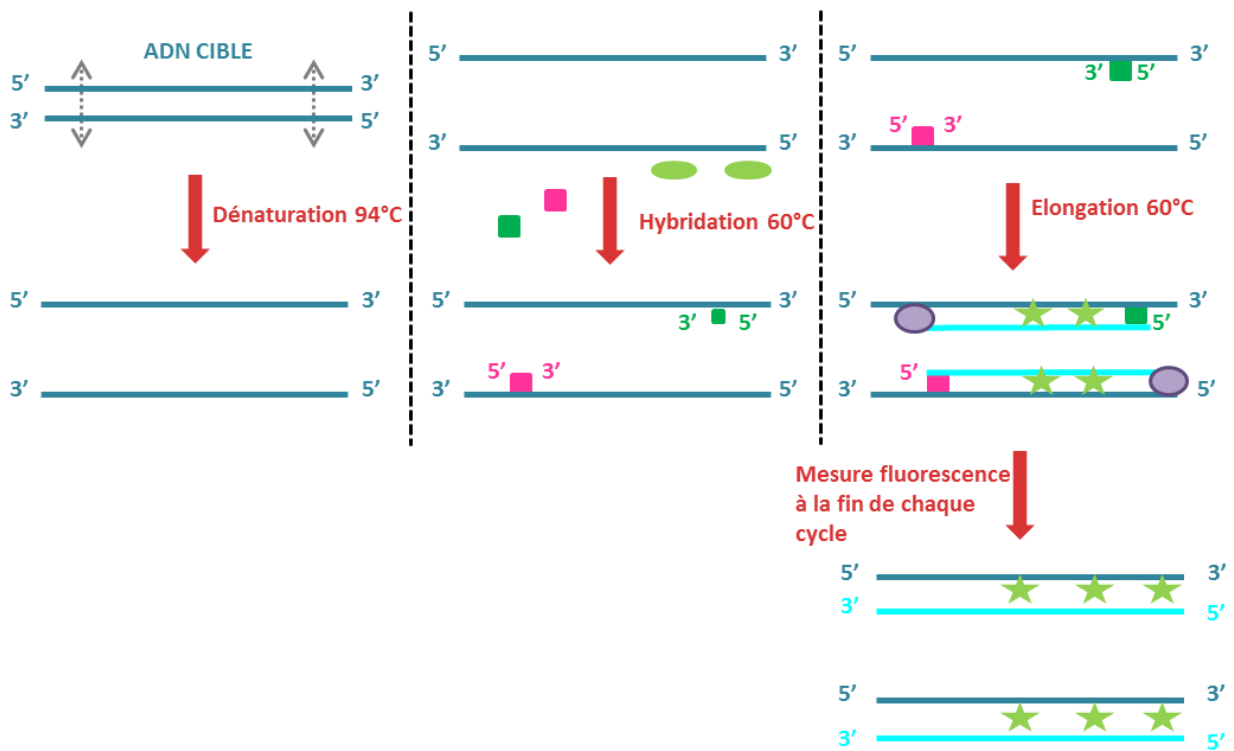
PCR quantitative en « temps réel »

Principe de la technique :

La PCR en « temps réel » ou encore PCR quantitative est une application de la PCR traditionnelle. Elle consiste à suivre en continu l'amplification des produits de PCR néo formés, via la détection de la fluorescence émise par ces dernières. En effet, la différence avec la PCR classique réside dans la mesure des produits d'amplification à la fin de chaque cycle. Cette mesure est possible grâce à l'utilisation d'un marqueur fluorescent (exemple : Syber Green) dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits (Figure 44). Ainsi une cinétique de la réaction est effectuée et donc une quantification de l'ADN or la PCR classique ne donne qu'une indication de la présence ou non de la séquence nucléotidique d'intérêt.

Dans notre étude, nous avons quantifié l'expression de gènes d'intérêt donc la quantité d'ARN. Une étape de rétro-transcription des ARN extraits à partir des homogénats cellulaires a donc été faite avant la PCR quantitative afin d'obtenir de la matrice d'ADNc issu d'ARNm. La quantification des gènes d'intérêt a été faite par rapport à celle d'un ARN de gène de référence d'expression stable dans les cellules, ce qui permet de s'affranchir des variations de rendement d'extraction d'ARN. Les comparaisons des quantifications des différents gènes entre les échantillons sont rendues possibles par comparaison des résultats de chaque échantillon à un échantillon calibrateur (« PCR quantitative relative »).

1^{er} cycle



2^{ème} cycle

n cycles...

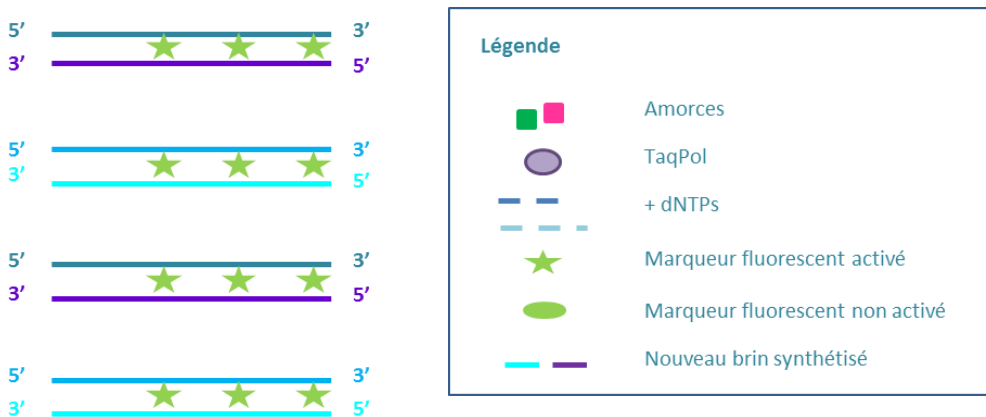


Figure 44. Déroulement d'une réaction de PCR quantitative

6.2. Extraction d'ARN totaux et synthèse d'ADNc

6.2.1. Mode opératoire

Les ARN totaux des différentes sous-populations lymphocytaires triées sont extraits sur colonne d'affinité à l'aide du kit d'extraction RNeasy Mini Kit (QIAGEN). Les cellules (1.10^6 cellules/condition) sont lysées par ajout de 350 μ L de tampon RLT contenant 1 % (v/v) de β -mercaptoéthanol (SIGMA). Après homogénéisation, 350 μ L d'éthanol à 70 % sont ajoutés puis la totalité de l'échantillon est déposée sur une colonne « RNeasy mini spin » placée sur un tube collecteur de 2 mL. Le culot cellulaire récupéré est lavé deux fois dans 350 μ L de tampon RW1 (10000 rpm, 30 secondes) et deux fois avec 500 μ L de tampon RPE (10000 rpm, 2 min). Les ARNs totaux sont ensuite élués dans des tubes de 1,5 mL par ajout de deux fois 30 μ L d'eau ne contenant pas de RNase (10000RPM, 1 min) et congelés à -80°C avant leur dosage et vérification de leur pureté.

6.2.2. Contrôle qualité et dosage des ARN totaux

La qualité des ARN est contrôlée par électrophorèse sur gel d'Agarose 1% (Life technologies), dans du TBE 0,5X (Life technologies), avec 3 μ l de SYBER SAFE 10000X (Life technologies), qui est un agent intercalant de l'ADN non toxique, après addition de glycérol aux échantillons (100 à 500ng). La migration s'effectue pendant 50 minutes à 100 V. Lors de la révélation sous ultra-violets (UV), l'absence de dégradation des ARN ribosomiaux majoritaires (18S et 28S) est attestée par la présence de deux bandes nettes et distinctes. Puis les ARN sont dosés par une méthode fluorimétrique (kit Quant-iT RNA, life technologies réf Q10211), par un fluorimètre Qubit (Life technologies).

6.2.3. Transcription inverse (Reverse transcription - RT)

Les ARN totaux (500ng d'ARN totaux dans un volume de 25µl (20ng/µl)) sont ensuite rétro transcrits en ADNc à l'aide d'une transcriptase inverse MMLV (Life technologies), d'une amorce nucléotidique et des désoxyribonucléotides vérifier (10mM final) sont indispensables (GE HEALTHCARE). Nous savons que les ARNm à amplifier sont polyadénylés en 3', l'amorce choisie pour la reverse transcription peut simplement être une séquence polyT (50µM final), constituée d'une succession de désoxythymidines (Life technologies). Dans ce cas, tous les ARNm sont *a priori* copiés en ADNc. L'étape d'hybridation avec l'amorce se fait à 65°C durant 5 minutes puis l'étape d'élongation avec les désoxyribonucléotides (dTTP, dATP, dGTP et dCTP) et la Reverse transcriptase pour la synthèse d'ADNc dure 50 min à 37°C puis la réaction de RT est finalisée par une incubation de 15min à 70°C. Les échantillons sont dilués au 1/10 pour les réactions de qPCR (2ng/µl) et conservés à -20°C avant la PCR. La Figure 45 illustre le déroulement d'une réaction de RT.

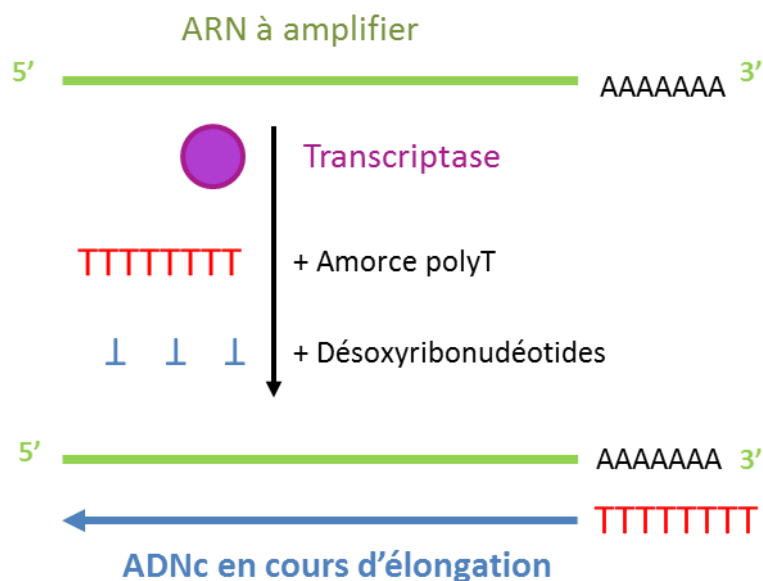


Figure 45 : Une réaction de reverse transcription de l'ARNm en ADNc

6.3. Déroulement de la réaction de qPCR

Pour la réalisation d'une qPCR, nous avons utilisé un volume réactionnel (« mix ») qui comporte de l'ADNc synthétisé par RT, auquel sont ajoutés un couple d'amorces spécifiques de la séquence des gènes à amplifier (annexes), des dNTPs, une TAQ polymérase, et un marqueur fluorescent, le Sybr Green, un agent intercalant de l'ADN double brin. La particularité de cet agent repose sur sa faible fluorescence à l'état libre, et son accroissement de fluorescence lorsqu'il est lié à l'ADN double brin. L'augmentation de la fluorescence mesurée pendant l'étape de polymérisation est donc proportionnelle au nombre de produits amplifiés formés (Figure 44). Le SYBR® Green PCR Master Mix (contenant l'Ampli Fast DNA polymérase, SYBR GREEN DYE, Uracil-DNA Glycosylase (UDG), les dNTPs) est utilisé pour nos expériences de qPCR (Applied Biosystems). Les qPCR sont pratiquées dans des plaques 384 puits FAST (Applied Biosystems), après répartition des différents éléments nécessaires à la réaction par un automate (Hamilton). Le mix de la réaction comprend : 1µl d'ADNc, 5µL du Master Mix, 0.3µL du couple d'amorces nucléotidiques (10µM) et 3.4µl d'eau RNASE free. La PCR est réalisée sur un thermocycleur (Applied Biosystems 7900HT) selon le protocole suivant : une phase de dénaturation à 96°C qui dure 20 puis 1 seconde, suivie d'une phase d'hybridation et d'élongation qui dure 20 secondes (40 cycles) et une étape de dissociation par une augmentation progressive de la température de 60°C à 95°C.

6.4. Analyse d'une PCR quantitative relative

Le profil détecté en temps réel d'une réaction de PCR classique et quantitative comporte 3 étapes (Figure. 46) :

- le bruit de fond
- la phase exponentielle
- le plateau

Le bruit de fond correspond à une quantité d'amplicons et donc ici une fluorescence indétectable par l'appareil utilisé. Lorsque que ce niveau de fluorescence est supérieur au seuil de détection de l'appareil, la fonction exponentielle de l'amplification par PCR est détectable. La valeur de CT est le nombre de cycles de PCR nécessaires pour que le début de la phase exponentielle soit détecté, c'est-à-dire le point où le seuil de détection est atteint. Cette ligne de seuil est placée au niveau de la phase exponentielle, de façon à se distinguer clairement du bruit de fond .Le plateau indique que l'un ou des composants de la réaction sont limitants ce qui empêche la PCR d'avoir une efficacité maximale. Au final, le profil de la PCR quantitative est donc une augmentation de la fluorescence (augmentation des produits de PCR) au cours du temps. Par conséquent, plus l'échantillon est concentré en molécules cibles (séquences d'intérêts) et moins de cycles sont nécessaires pour parvenir au Ct.

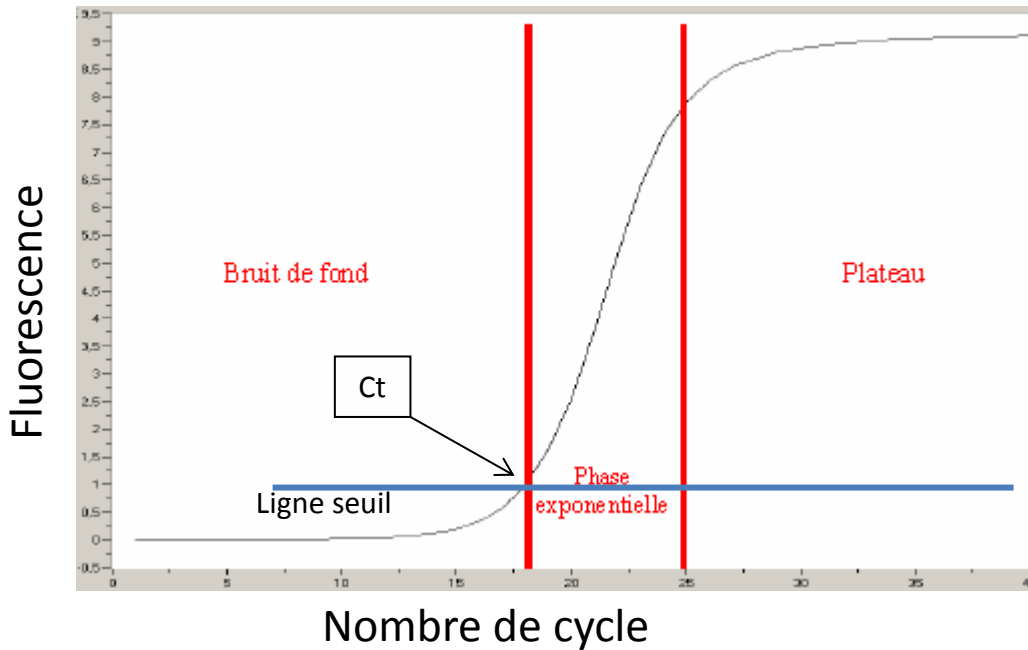


Figure 46 : Profil d'amplification d'une réaction de PCR et Ct

Cette valeur de Ct va permettre de calculer le ratio d'expression d'un gène cible en normalisant par l'expression d'un gène de référence via une formule arithmétique, le $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Pour ce faire, l'expression des gènes cibles est normalisée par rapport à celle d'un gène de référence dont l'expression est stable (« housekeeping gene » ou gène de ménage) pour les différentes conditions expérimentales (ΔCT). Les gènes de ménage sont un groupe de gènes qui codent pour des protéines dont la fonction est essentielle à la viabilité de la cellule. L'utilisation de ce contrôle endogène permet en théorie de contrôler toutes les étapes du protocole expérimental, son expression reflétant la quantité et la qualité de l'ARN utilisé. Dans notre étude, le gène SF3A1 a été sélectionné pour sa stabilité d'expression dans les différentes conditions expérimentales. L'étape précédente est finalisée en rapportant le ΔCT à celui d'un calibrateur (échantillon de référence). Il s'agit d'un échantillon utilisé comme base pour comparer les résultats des différents échantillons. Le ratio normalisé de chaque échantillon est divisé par le ratio normalisé du calibrateur. Ainsi, le calibrateur devient la référence 1x, et tous les autres échantillons sont exprimés sous forme de ratio par rapport au calibrateur. Donc, la ligne seuil des CT est fixée par rapport au calibrateur pour chaque gène d'intérêt ainsi que pour le gène de référence. La valeur de CT obtenu pour le calibrateur sera toujours identique pour le même gène dans les différents échantillons, ce qui permettra de comparer les résultats des différents échantillons entre eux.

Méthode de calcul de l'expression d'un gène d'intérêt par rapport à un gène de référence :

ΔCT (éch) = CT (gène intérêt) échantillon - CT (gène référence) échantillon

ΔCT (calibrateur) = CT (gène intérêt) calibrateur - CT (gène référence) calibrateur

Ensuite, le $\Delta\Delta CT$ entre le contrôle et l'échantillon est calculé:

$\Delta\Delta CT = \Delta CT$ (éch) - ΔCT (calibrateur)

Quantification relative de l'expression du gène d'intérêt /gène de référence :

$$2^{-\Delta\Delta CT}$$

Résultats

Les figures de cette partie se trouvent dans les Annexes

Mise au point de la mesure d'ERO des sous-populations
lymphocytaires par CMF

Les figures de la partie « Résultats » se trouvent dans les Annexes.

Les sondes non fluorescentes diacétate de dihydrodichlorofluorescéine (H₂DCF-DA) et dihydroéthidine (DHE) dont la fluorescence dépend de l'oxydation par des espèces réactives de l'oxygène (ERO), respectivement, l'H₂O₂ et l'anion superoxyde O₂⁻ ont été utilisées. La principale difficulté de cette mise-au-point en cytométrie en flux a résidé dans le fait d'avoir à combiner des marquages membranaires à l'aide d'anticorps couplés à des fluorochromes particuliers, et spécifiques des Treg et Tconv à un marquage intracellulaire par des sondes. En effet, en cytométrie en flux, les longueurs d'ondes d'émission des principaux fluorochromes couplés à des anticorps sont bien connues contrairement à celles des sondes oxydées qui sont peu connues et dépendent fortement des conditions de l'expérience. La forte fluorescence des sondes oxydées entraîne une « contamination » des canaux adjacents de lecture de fluorescence et complique voire empêche ainsi l'utilisation de ces derniers, malgré l'existence de système de compensation de lecture numérique de fluorescence qui revient à soustraire la fluorescence de la sonde du canal contaminé.

1. Marquage par les sondes métaboliques

Différentes conditions de marquage des cellules par les sondes intra-cytoplasmique ont été testées (températures et durées d'incubation des cellules avec les sondes ; concentrations variés des sondes) en s'appuyant sur la littérature. Un marquage effectué à 37°C avec la sonde H₂DCF-DA rend impossible la compensation en FL-2 (Résultat 1). Les conditions optimales se situent à 4°C pour une concentration de la sonde à 0,25µM.

L'autre difficulté technique que j'ai eu à résoudre a été la sélection des clones d'anticorps membranaires CD4/CD25/CD127 associés à des fluorochromes qui soient compatibles avec les sondes rendues fluorescentes par leur oxydation, afin d'obtenir un multi-marquage optimal pour distinguer la population Treg des Tconv, et la quantité d'oxydation des sondes par les ERO dans ces deux sous-populations.

2. Caractérisation des sous-populations

Dans le sang périphérique des D.V.S, la proportion de Treg varie entre 1-6% des LT CD4+ ; avec la combinaison n°2 d'anticorps, les résultats présentés indiquent que nous sommes dans les bonnes conditions d'évaluation (Résultat 2).

La combinaison n°2 d'anticorps est compatible avec un marquage par la sonde DCF à 4°C pour visualiser la susceptibilité ou non d'une population à une agression oxydative. Ces conditions expérimentales permettent d'analyser la sensibilité à une agression oxydative des sous-populations de lymphocytes Treg, Th17, non Th17 au sein de la population mononucléée totale ou d'une population pré-enrichie en TCD4+.

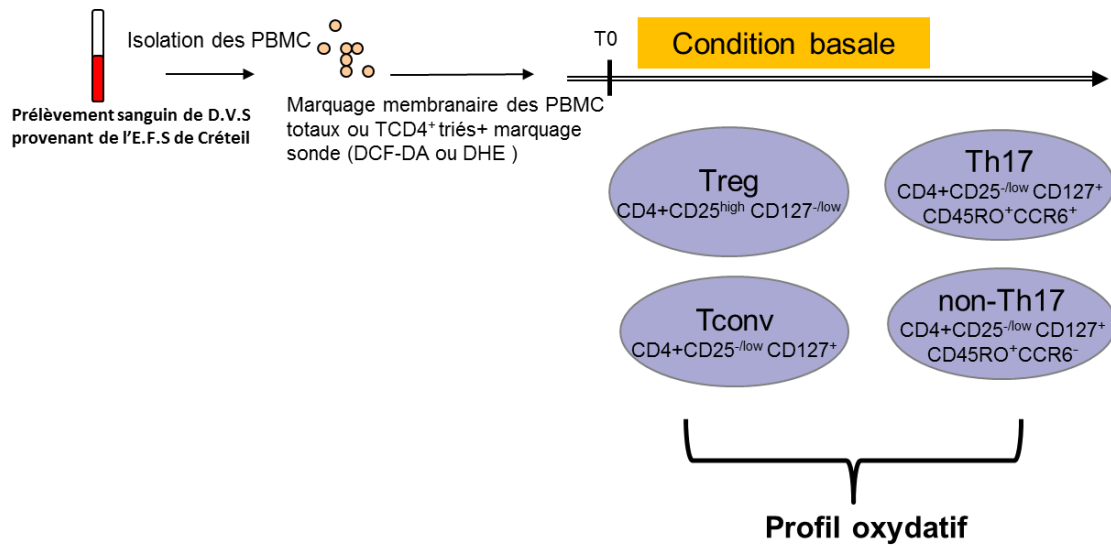
3. Caractérisation des ERO des sous-populations

D'autre part, des mises au point additionnelles ont été nécessaires pour la visualisation du marqueur CCR6. En effet, les marquages membranaires ont été effectués après le marquage des cellules par la sonde. D'après le Résultat 3, les marquages CCR6 sont optimales post marquage par la sonde.

Production normale d'ERO dans les sous-populations
lymphocytaires

Méthodologie :

La figure ci-dessous illustre la démarche expérimentale adoptée pour évaluer la production normale d'ERO des sous-populations de TCD4⁺.



- Niveau d' H₂O₂ : marquage CM-DCFH-DA (CMF)
- Niveau d'O₂⁻ : marquage DHE (CMF)

Les figures de la partie « Résultats » se trouvent dans les Annexes.

1. Dosage des ERO en condition basale

L'analyse des niveaux d'ERO des sous-populations de TCD4+, Treg totaux et Tconv totaux, est réalisée en CMF à l'aide des sondes H₂DCF-DA ou HE. *Rappel : ces sondes deviennent fluorescentes en présence des ERO, BET (forme oxydée de l'HE) pour l'O₂⁻, et DCF (forme oxydée de l'H₂DCF-DA) pour l'H₂O₂. Les moyennes de fluorescence (MFI) des sondes traduisent leur niveau d'oxydation par les ERO.*

1.1. Analyse au sein des PBMC totaux

Le niveau d'oxydation de l' H₂DCF-DA par les Tconv totaux est plus important que les Treg au sein des PBMC totaux, cette différence est significative. Nous en déduisons que les Tconv disposent d'un niveau basal d'H₂O₂ plus important que les Treg, en l'absence de toute stimulation exogène (Résultat 5. A).

D'après le Résultat 5.B, l'analyse de l'oxydation de la sonde DHE dont la fluorescence est dépendante de la présence de l'anion superoxyde (O₂⁻), ne montre aucune différence entre ces 2 sous-populations. Ces populations lymphocytaires ont donc des taux équivalents d'O₂⁻.

Les PBMC totaux contiennent principalement des lymphocytes totaux, monocytes et neutrophiles. L'analyse sur une population hétérogène permet de se rapprocher des conditions physiologiques, mais la présence de populations monocytaires et neutrophiles peut interférer dans les différentes conditions expérimentales. En effet, l'H₂O₂ est aussi identifiée dans les monocytes/neutrophiles (Résultat 4) à des niveaux plus élevées que dans les lymphocytes totaux. *Rappel : L' H₂O₂ contrairement à l'O₂⁻, diffuse à travers la membrane plasmique des cellules et peut passer d'un type cellulaire à un autre dans le but d'activer les cellules (1-3).* La suite des expériences est effectuée sur des lymphocytes TCD4+ (TCD4+) préalablement triés magnétiquement parmi les PBMCs totaux. Ainsi les TCD4+ sont isolées des monocytes ainsi que des autres populations lymphocytaires telles que les lymphocytes TCD8+, NK, B ...

1.2. Analyse au sein des TCD4+ triés magnétiquement

Comme dans l'analyse faite sur les PBMC totaux, nous observons également des niveaux de MFI du DCF des Tconv supérieurs à ceux des Treg issus de lymphocytes TCD4+ triés (Résultat 6. A). Cette différence de MFI entre les Treg et Tconv totaux est significative. Ceci montre que les Tconv totaux disposent naturellement de niveaux plus élevés en H₂O₂ que les Treg totaux.

D'autre part, les niveaux de MFI du BET quasi-identiques entre les Treg et Tconv totaux issus des TCD4+ triés (Résultat 6. B) dans les différentes conditions indiquent des taux d'O₂-équivalents. A l'instar de ce qui a été trouvé avec les PBMC totaux, les Treg et Tconv issus de TCD4+ triés ont des niveaux équivalents d'O₂-. En raison de l'absence de différence avec la sonde DHE, nous nous sommes focalisés sur le niveau d'H₂O₂ au sein de populations particulières de Tconv totaux, les Th17 et non Th17. L'identification de telles populations en CMF est possible, grâce à des marquages membranaires spécifiques à l'aide de l'anti-CD45RO (populations mémoires) et de l'anti-CCR6 (Résultat 7.A). Les Th17 sont des Tconv mémoires exprimant le marqueur CCR6+ alors que les non Th17 en sont dépourvus (Résultat 7.A).

Les Treg mémoires sont plus fonctionnels dans l'inhibition des autres cellules, en comparaison des naïves. De ce fait, nous avons comparé les MFI du DCF des sous-populations de Treg afin de mettre en évidence une différence. Le Résultat 7.B montre une oxydation similaire de la sonde entre les divers Treg. Par conséquent, la suite des expériences considèrera les Treg dans leur ensemble (Treg totaux).

Comme précédemment, les Treg présentent une capacité d'oxydation de la sonde inférieure aux différentes populations T conventionnelles (Résultat 8.A). La comparaison des LT conventionnelles entre elles révèle que les Tconv naïfs oxydent plus la sonde que les Th17 et non Th17. Ces différences sont significatives (Résultat 8.B). En conclusion, au sein des Tconv mémoires, les Th17 oxydent significativement plus la sonde que les non-Th17, Treg (Résultat 8.B).

Synthèse du chapitre IV

Production normale d'ERO dans les sous-populations lymphocytaires

- Les Tconv totaux disposent de plus d'ERO que les Treg totaux.
- Nous montrons également que cette différence des niveaux basals d'ERO entre les sous-populations est spécifique de l' H_2O_2 et non l' O_2^- .
- Pour la première fois, il est montré que la capacité d'oxydation de la sonde $H_2DCF-DA$ par les Th17 est plus importante que celle des Treg et des non-Th17. Ceci indique que les Th17 (et Tconv naïfs) ont des taux basals d' H_2O_2 significativement supérieurs aux Treg et non-Th17.

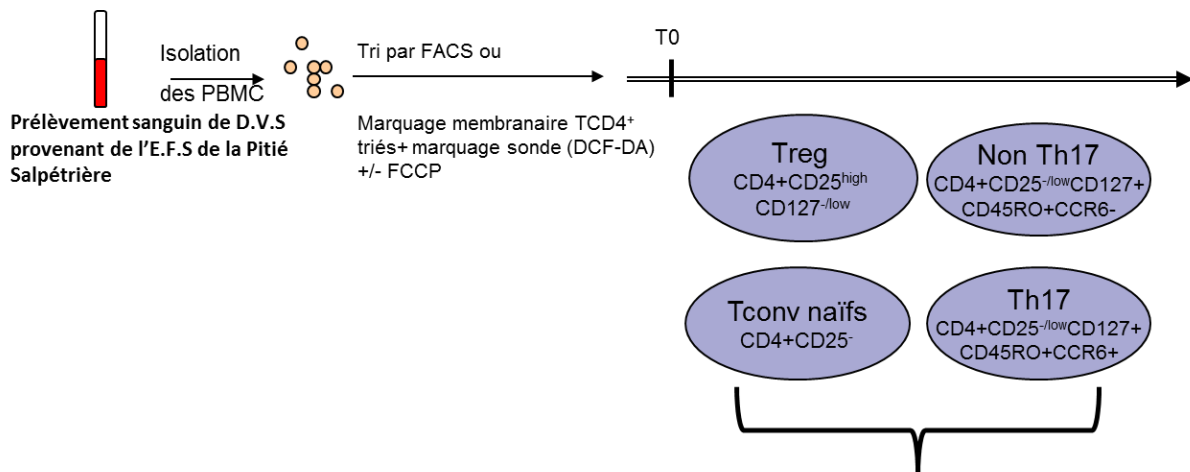
Dès lors, nous pouvons nous interroger sur les mécanismes responsables de ces différences.

Pour répondre à cette question, nous avons analysé l'expression des systèmes producteurs d'ERO ainsi que des systèmes antioxydants de détoxification enzymatiques et non enzymatiques.

Mécanismes à l'origine de la production d'ERO en
condition basale

Méthodologie :

La figure ci-dessous illustre la démarche expérimentale adoptée pour analyser les mécanismes à l'origine de la production normale d'ERO des sous-populations de TCD4⁺.



Capacité anti-oxydante :

- Quantification de l'expression par RT-qPCR

Capacité oxydante (systèmes générateurs d'ERO) :

- Quantification de l'expression par RT-qPCR
- Marquage DCF-DA et traitement par le FCCP (mitochondrie)
- Marquage Mitosox (mitochondrie)

Les figures de la partie « Résultats » se trouvent dans les Annexes.

Afin de mieux comprendre les différences de taux basales d'ERO observés entre les sous-populations lymphocytaires, notamment l'H₂O₂, une analyse de l'expression des principaux systèmes de synthèse d'ERO et de détoxification est réalisée.

1. Analyse de l'expression des systèmes synthétisant des ERO

De nombreuses sources endogènes sont à l'origine des EROs dont les NOX, L-acide aminé oxydases et la mitochondrie.

1.1. Les NADPH oxydases (NOX)

Le Résultat 9 ne montre aucune différence d'expression des sous-unités (p22phox, p47phox, p40phox) formant NOX, dans les différentes sous-populations de LT. DUOX-1, une isoforme de NOX est difficilement détectée (résultat non montré). Nous avons également quantifié l'expression de NOX2 qui est uniquement exprimée dans les Tconv naïfs (résultats non montrés). En résumé, ces enzymes ne seraient pas à l'origine du taux d'ERO oxydante (sonde) plus important des Th17 par rapport aux non-Th17 et Treg.

1.2. La mitochondrie

La mitochondrie est une des principales sources d'ERO dans la cellule. Une anomalie fonctionnelle de la chaîne respiratoire mitochondriale inhiberait la production d'ERO (cf. introduction). Pour ce faire, le FCCP, un agent découplant du gradient de protons de la chaîne respiratoire, est utilisé. Cette expérience permettra de montrer ou non un lien causal entre la mitochondrie et la production plus importante d'ERO par les Th17 versus Treg/non Th17.

1.2.1. Le p-trifluoromethoxy-carbonyl-cyanide-phenyl hydrazone (FCCP)

D'après le Résultat 10. A, les MFI du DCF des sous-populations de TCD4+ traités au FCCP semblent diminuer par rapport aux contrôles. De ce fait, l'agent découplant aurait une action inhibitrice sur la production physiologique d'ERO intra cellulaires mitochondriales des différentes sous-populations. En revanche, le Résultat 10. B montre que les pourcentages d'oxydation de la sonde, après traitement au FCCP, sont quasiment identiques. Ceci indique que le FCCP provoquerait une réduction d'ERO similaire dans les différentes populations lymphocytaires, à l'exception des Tconv naïfs. Nous en concluons que la plus grande fraction d'ERO physiologiques, dans les sous-populations de TCD4+, serait produite par la mitochondrie mais qu'elle n'est pas responsable des différences de niveaux observées. De plus, ces résultats semblent être confirmés par l'utilisation de la sonde MITOSOX, spécifique de l'O₂⁻ de la mitochondrie, qui semble montrer des oxydations de la sonde identique entre les sous-populations (Résultat 10.C).

1.2.2. L-phénylalanine oxydase : IL-4I1 ou Fig1

Rappel : L'IL4I1 est une enzyme impliquée dans le catabolisme de la L-phénylalanine, générant de l' H_2O_2 et du phénylpyruvate.

1.2.2.1. Expression en ARNm

Il apparaît que l'expression basale d'IL-4I1 pourrait être plus importante dans les Th17 que les autres populations. Afin de renforcer ces données, nous avons mesuré l'activité de l'enzyme dans les mêmes sous-populations que celles étudiées précédemment (Résultat 11.A).

1.2.2.2. Mesure de l'activité enzymatique de l'IL-4I1

Le Résultat 11.B présente une activité enzymatique basale d'IL-4I1 des Th17 qui semble supérieure aux autres populations. De plus, dans des conditions d'activation mitogénique (anti-CD3 + anti-CD28+ IL-2) et dans le milieu de culture, l'activité enzymatique de l'IL4I1 des Th17 semble majorée, tout en conservant sa supériorité face aux autres sous-populations lymphocytaires (Résultat 11.C, D). Alors l'importante production homéostatique d' H_2O_2 des Th17 serait potentiellement liée à une expression et une forte activité de l'IL-4I1.

1.3. Analyse de l'expression des systèmes de détoxification non enzymatiques

Nous avons analysé l'expression des enzymes impliquées dans le métabolisme du glutathion (GSH) et de la thioredoxine (Trx).

1.3.1. Le métabolisme du Glutathion

Le Résultat 12 montre que l'expression de GPX 1 est semblable entre les différentes sous-populations lymphocytaires. Nous avons également analysé l'expression des sous-unités de l'enzyme Glutamyl cystéine ligase (GCL, non montré), de GCLM (sous-unité régulatrice), et GCLC (sous-unité catalytique, non montré), qui n'ont montré aucune différence. Il semble que les systèmes liés à la synthèse du glutathion ne soient pas responsables des différences de niveaux physiologiques d'ERO entre les sous-populations étudiées. Cependant, GPX2 semble plus exprimé dans les Treg par rapport aux Th17 et non Th17.

1.3.2. Le métabolisme de la thiorédoxine

L'expression en ARN de la Trx est quasi-identique entre les différentes sous-populations lymphocytaires (Résultat 13). En revanche, la thiorédoxine réductase 1 (TrxR1-2-3), impliquée dans le renouvellement de la Trx, tend à être plus exprimée dans les Treg que dans les autres sous-populations, en particulier les Th17. De plus, TrxR3 semble plus exprimé dans les non-Th17 que les Th17. Ces différents résultats expliqueraient les faibles niveaux basaux d'H₂O₂ des Treg, non Th17 ainsi que ceux des Th17 qui sont nettement supérieurs.

1.4. Analyse de l'expression des Systèmes de détoxification enzymatiques

Rappel : Nrf2 est un facteur de transcription sensible aux modifications oxydatives dans la cellule. Il est impliqué dans la synthèse d'enzymes anti-oxydantes, lors d'une agression oxydative. L'expression des molécules et enzymes anti-oxydantes, dépendantes de Nrf2, est étudiée par RT-qPCR.

1.4.1. Le système Nrf2

D'après le Résultat 14, aucune différence d'expression de Nrf2 n'est constatée entre les différentes sous-populations. De même, l'expression de DJ1 est similaire dans les populations lymphocytaires. Le profil d'expression des molécules Keap1, ATF3 et BACH1, empêchant la synthèse d'enzymes anti-oxydantes par Nrf2, n'est pas comparable. En effet, Keap1 ne montre pas de différence d'expression entre les différentes populations, alors qu'ATF3 et BACH1 paraissent respectivement plus exprimés dans les Th17 et Treg. Nous pouvons en déduire que les Th17 disposeraient de plus d'oxydants que les Treg, en raison d'une expression plus marquée en ATF3, en condition basale.

1.4.2. Les enzymes anti-oxydantes dépendantes de Nrf2

Le Résultat 15 ne montre aucune différence d'expression des enzymes, catalase et SOD1-2, dans les différentes populations lymphocytaires. Les seules différences observées concernent HO-1 qui semble plus exprimée dans les Treg par rapport aux Th17. En un mot, en raison d'une expression plus élevée en HO-1, les Treg possèderaient moins d'oxydants basales que les Th17.

Synthèse du chapitre V

Mécanismes à l'origine de la production d'ERO en condition basale

Les Th17 et Tconv naïfs ont des niveaux basaux d' H_2O_2 supérieurs aux Treg et non Th17. La recherche parmi les systèmes producteurs d'ERO nous révèle une production équivalente basale d'oxydants par les sous-populations LTCD4+ qui proviendrait de la mitochondrie. Nos résultats indiquent également que l'excès d' H_2O_2 dans les Th17 par rapport aux non-Th17 et Treg pourrait provenir soit d'une surexpression de l'IL-411, soit d'une faible expression de TrxR3 ou HO-1.

En introduction, nous avons décrit l'importance des Th17 dans de nombreuses pathologies inflammatoires chroniques dont la BPCO, où un environnement pro-oxydant élevé induit par le tabagisme est à l'origine des dégâts tissulaires pouvant se propager au niveau systémique. Afin de mieux comprendre le comportement des Th17 circulants de D.V.S dans un environnement pro-oxydant, nous les avons étudiés dans un modèle *in vitro* d'exposition au condensat de fumée de cigarette (CFC) en comparaison des Treg et non-Th17. En effet, un stress oxydant (élévation du niveau d'ERO) est souvent mis en évidence lorsque les cellules sont exposées au CFC.

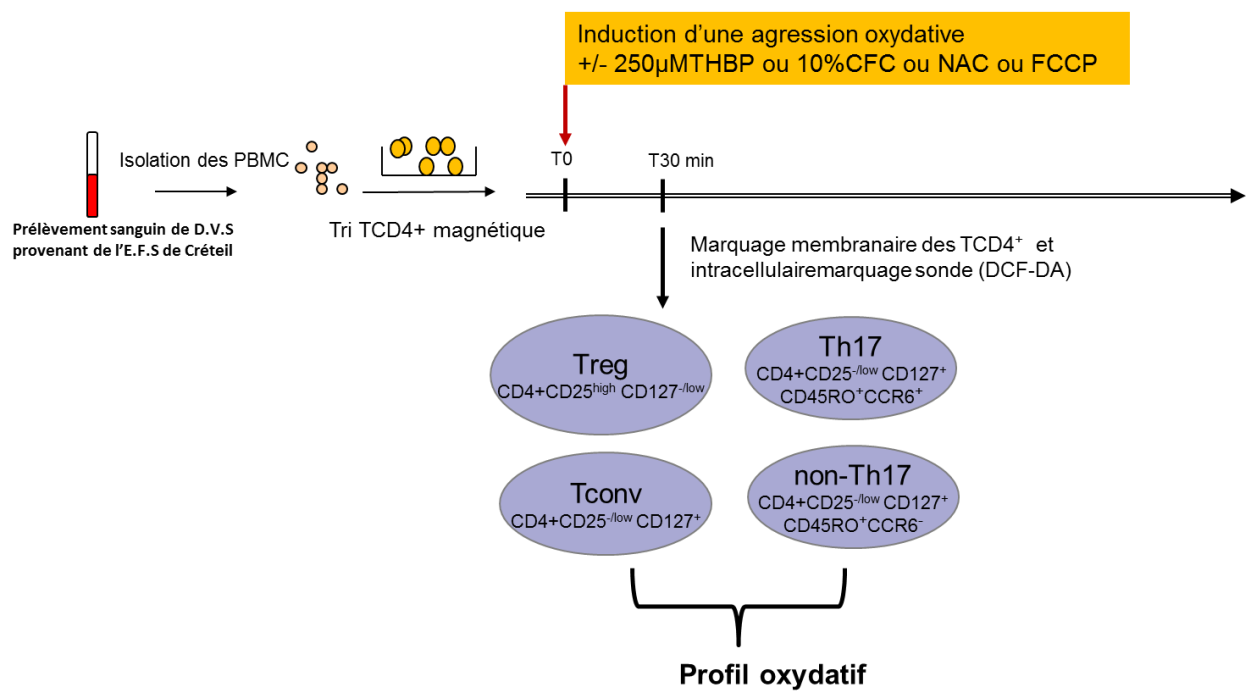
Nous allons donc étudier dans le chapitre VI, la réponse des sous-populations lymphocytaires T, à l'exposition au condensat de fumée de cigarette.

CHAPITRE VI

Caractérisation de la réponse des sous-populations de
TCD4+ à une agression oxydative

Méthodologie :

La figure ci-dessous illustre la démarche expérimentale adoptée pour caractériser la production d'ERO des sous-populations de TCD4⁺, après une agression oxydative.



- Niveau d' H₂O₂ : marquage CM-DCFH-DA (CFM)

Dans les différentes sous-populations traitées ou non, nous avons analysé les niveaux d'ERO intracellulaires, par DCF.

1. Caractérisation des ERO intracellulaires de sous-populations lymphocytaires T

1.1. Exposition aigüe au CFC, THBP

Les cellules TCD4+ sont traitées par 10% CFC et 250 μ M THBP (Contrôle positif), pendant 30min.

Une exposition à un inducteur de stress oxydant, le THBP, augmente l'oxydation de la sonde H₂-DCF-DA des cellules de façon significative, par rapport à la condition basale (Résultat 16.C et D); ce qui indique qu'un stress oxydatif serait induit (A confirmer par d'autres expériences, cf. discussion). L'ajout de 10% de CFC induit également une augmentation significative de la MFI du DCF dans les différentes sous-populations, en comparaison de la situation non traitée (Résultat 16. B et D). Nous en déduisons que l'exposition aigüe des cellules TCD4+ à du CFC génèrerait également un stress oxydatif. Cependant, l'existence du stress oxydatif n'a pas été démontré (oxydation de l'ADN, peroxydation lipidique...), donc il serait plus correcte d'utiliser le terme agression oxydative.

Les différences d'oxydation de la sonde entre les sous-populations de LT, observées en condition basale, sont maintenues en situation de stress oxydatif (Résultat 16. D). Cette différence entre les sous-populations est significative. Nous en déduisons que les Th17 et Tconv naïfs maintiennent des taux d'ERO supérieurs à ceux des Treg et une tendance apparaît par rapport aux non-Th17, après une agression oxydative.

Cependant, le Résultat 17 montre que cette agression oxydative (CFC ou THBP) est identique dans les différentes populations. En effet, les pourcentages d'oxydation de la sonde sont quasi-identiques entre les sous-populations, dans les différentes conditions. Nous concluons que l'agression oxydative, induite par l'exposition au CFC ou au THBP, agit de façon identique sur les Treg totaux, Tconv naïfs, Th17 et non Th17.

1.2. Agression oxydative aigue et traitement anti-oxydant

Le rôle causal du stress oxydatif, induit par le CFC ou THBP, dans l'augmentation de la MFI de la sonde est démontré grâce au traitement par un anti-oxydant, la N-acétylcystéine (NAC).

Le Résultat 18.A récapitule les données précédentes en situation basale et d'agression oxydative oxydatif (CFC ou THBP), où les Tconv naïfs et en particulier les Th17 ont une capacité oxydante plus importante de la sonde que les Treg et non-Th17.

Le traitement par la NAC diminue la capacité d'oxydation de la sonde DCF-DA, des différentes sous-populations de lymphocytes T, en comparaison des conditions sans NAC. Cette diminution est significative après une agression oxydative induite par le CFC ou le THBP (Résultat 18. B). D'autre part, la réduction d'ERO par l'antioxydant maintient les différences de MFI du DCF entre les Tconv naïfs et surtout les Th17 versus Treg avec une tendance qui semble s'exprimer par rapport aux non-Th17.

Le résultat 19. A permet de montrer que la NAC a le même effet sur les différentes populations lymphocytaires. En effet, le traitement par la NAC n'induit pas de différence d'oxydation de la sonde entre les populations de LT. Ceci est attesté par des pourcentages d'oxydation de la sonde équivalents entre elles, dans les différentes conditions expérimentales.

D'après le Résultat 19.B, la NAC réduit de 20% les taux de base d'ERO des LT. En revanche, en condition d'agression oxydatif induit par l'exposition au CFC ou au THBP, les niveaux d'ERO sont respectivement diminués de 40 et 50%.

Au total, la NAC diminue les ERO intracellulaires, produits après l'exposition au CFC mais cette diminution est identique dans les différentes populations. Le CFC est bien responsable de l'augmentation similaire des niveaux d'ERO intracellulaires dans les LT.

1.3. Agression oxydative aigue et traitement au FCCP

L'implication de la mitochondrie dans la production d'ERO induite par le CFC, est étudiée par le traitement au FCCP.

Il a été précédemment montré que la mitochondrie est la principale source physiologique d'ERO, mais qu'elle n'est pas responsable des différences de MFI des sondes oxydées entre les sous-populations de LT. De la même manière, le FCCP réduit aussi de manière significative les MFI du DCF dans chaque sous-population lymphocytaire, après l'induction d'un stress oxydatif par le CFC ou THBP (Résultat 20. A et B).

De plus, cette diminution de MFI se fait en conservant les différences entre Th17 versus Treg/non Th17, alors que la diminution de MFI des Tconv naïfs traités par le THBP en présence de FCCP est plus importante et modifie l'écart relatif entre les Tconv naïfs et les autres sous-populations de LT. (Résultat 21.A). Il réduit de 80% les niveaux d'ERO produits par les LT, lors de l'exposition par le CFC (Résultat 21.B). L'effet du FCCP est majoré en présence de CFC

Le FCCP diminue à l'identique dans l'ensemble des lymphocytes, les niveaux d'ERO produits à l'issue de la stimulation exogène par le CFC. Nous concluons que le CFC induit une production égale d'ERO mitochondriales entre les sous-populations de LTCD4+.

Synthèse du Chapitre VI

Caractérisation de la réponse des sous-populations de TCD4+ à une agression oxydative

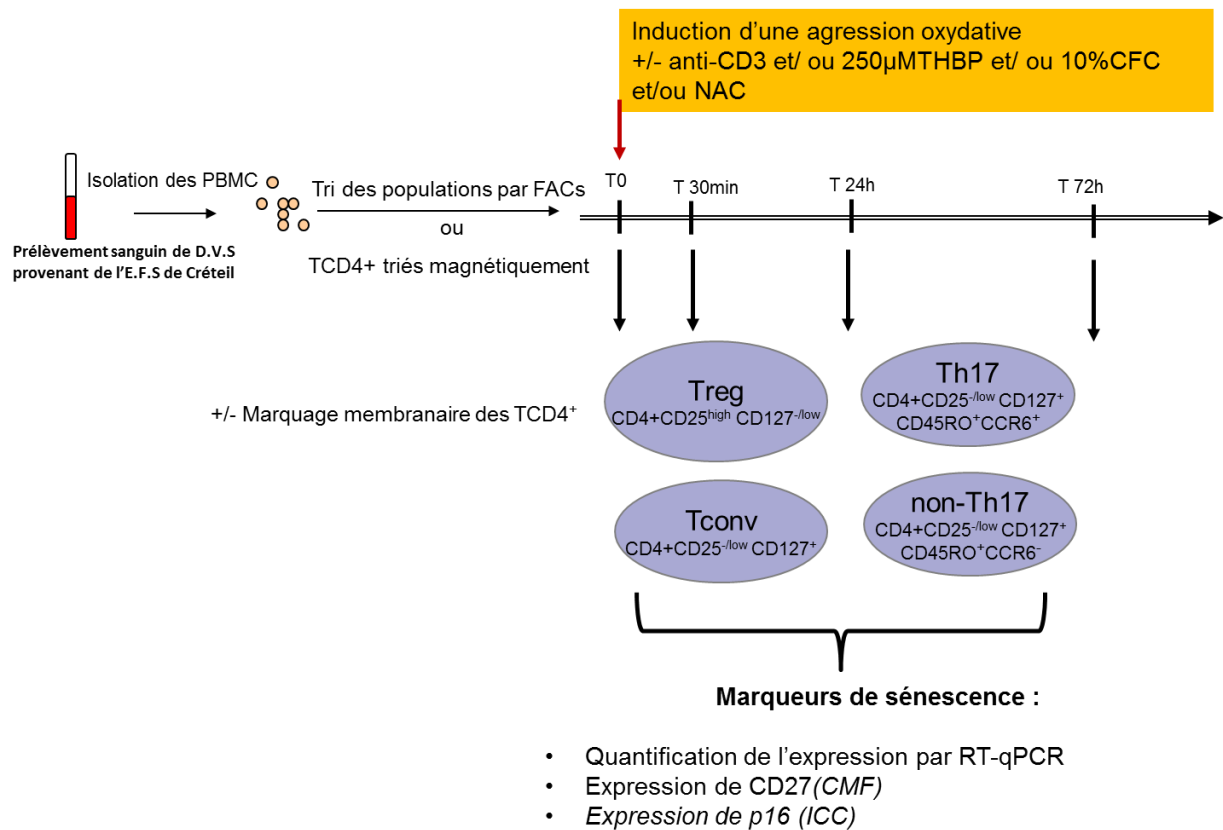
L'exposition au CFC induit un taux plus élevé d'ERO intracellulaires par les différentes sous-populations lymphocytaires. En comparant au THBP, un inducteur du stress oxydatif, cette augmentation peut être assimilée à un stress oxydatif aigu. De plus, cette production d'ERO est identique dans chaque population de LT, car leur pourcentage d'oxydation sont quasi-identique. L'antioxydant NAC diminue le taux d'ERO intracellulaires induits après le traitement au CFC, et prouve que ce dernier est bien responsable du stress oxydatif des différents LT. De la même manière, le FCCP diminue le taux d'ERO induit après l'agression au CFC, ce qui suggère que cette augmentation se fait par l'intermédiaire de la mitochondrie. Dans les deux cas, les inhibiteurs ont le même effet sur leurs cibles (ERO et mitochondrie) issues des différents LT. En résumé, les taux supérieurs d'oxydants des Th17/Tconv naïfs sont toujours maintenus par rapport aux Treg et il semble qu'ils le soient aussi pour les non-Th17 dans les différentes conditions.

CHAPITRE VII

Corrélation entre une agression oxydative et la
sénescence lymphocytaire

Méthodologie :

La figure ci-dessous illustre la démarche expérimentale adoptée pour établir une éventuelle relation entre l'agression oxydative et la sénescence des sous-populations de TCD4⁺.



Les figures rattachées à la partie « Résultats » se trouvent dans les Annexes.

La sénescence cellulaire peut être une des conséquences du stress oxydatif induit par le CFC. Pour tester cette hypothèse, la population mixte lymphocytaire TCD4⁺ est traitée par une dose unique de CFC, puis les marqueurs associés à la sénescence sont mesurés sur des temps courts et longs. Au préalable, l'expression des marqueurs liés à la sénescence sont mesurés à l'état basal, dans chaque population lymphocytaire isolée des autres par un tri cellulaire réalisé à l'aide d'un cytomètre en flux.

1. Condition basale

D'après les Résultats 22 et 23, les Th17 semblent exprimer plus de p21 et moins de CD27 par rapport aux Treg, Tconv naïfs et non-Th17 ; ceci suggère un phénotype pré-sénescence à l'état basal des Th17 par rapport aux autres lymphocytes en particulier les Treg. En revanche, nous n'observons aucune différence pour les marqueurs p16, p19, CD28 et CD57. Nous avons ensuite analysé l'expression de ces différents marqueurs dans une situation d'agression oxydative aigue.

2. Sénescence et exposition aigue au CFC

D'après le Résultat 24.A, l'expression de CD27 serait plus faible dans les Th17 et les non-Th17, par rapport aux Treg et Tconv naïfs ; ceci est confirmé par des MFI de CD27 (Résultat 24.B), en condition basale et après traitement au CFC. En revanche, en termes de pourcentage de populations exprimant CD27, les Th17 sont celles qui possèderaient l'expression la plus faible (78%) dans les différentes conditions (Résultat 25.A et B).

A la suite des traitements par le CFC (ou THBP) l'expression de CD27 n'est pas modifiée, à la fois en MFI et en pourcentage dans les sous-populations (Résultats 24 et 25). Les temps d'exposition courts (30min) n'ont aucun effet sur l'expression de CD27. Nous avons donc regardé l'effet d'une exposition unique au CFC obtenu après 72h. Les conditions expérimentales sont optimisées (concentration et toxicité) pour cette période.

D'après le Résultat 26, les conditions optimales se situent entre les concentrations 2,5 et 5% de CFC. Au-delà, la mortalité des cellules est évaluée à plus de 20%, par rapport à la condition non stimulée.

La suite des expériences sont effectués à partir des conditions optimales : 5% de CFC.

3. Exposition prolongée au CFC et sénescence

D'après le Résultat 27.A et B, les MFI du DCF des sous-populations lymphocytaires, traitées pendant 72h par le CFC, sont légèrement augmentées par rapport aux conditions sans traitement. Les cellules ne sont plus soumises à une agression oxydative. De façon remarquable, à 72h la NAC diminue l'oxydation de la sonde dans les différentes sous-populations en condition stimulée ou non. Les différents traitements (CFC et NAC) ont les mêmes effets sur les différentes sous-populations. Cependant, les différences d'oxydation de la sonde entre les Th17 et Treg sont maintenues (Résultat 27.B).

Les Résultats 28.A et B indiquent que l'expression du marqueur CD27 n'est pas diminuée, après une exposition de 72h au CFC, en comparaison des cellules non stimulées. De plus, le traitement avec l'antioxydant diminue l'expression de CD27 (MFI et pourcentage). Cependant, les différences d'expression du marqueur entre les Th17 et Treg sont maintenues. Une exposition prolongée des LT à une dose unique de CFC n'a aucune conséquence sur l'expression de CD27.

4. Exposition prolongée au CFC en condition mitogénique et sénescence

La baisse d'expression du CD27 a été associée à l'activation chronique des LT. L'expression de CD27 a donc été analysée dans les LT soumises aux conditions mitogéniques (*Huan Y, 2011*) (anti-CD3 2µg/ml), en présence de CFC. Nous avons préalablement analysé l'effet de la stimulation par l'anti-CD3 sur le taux d'ERO intracellulaires des différentes sous-populations de LT.

D'après les Résultats 29.A et B, une stimulation du TCR des sous-populations lymphocytaires par l'anti-CD3 est responsable d'une augmentation significative de l'oxydation de la sonde, par les sous-populations Th17, non-Th17 et Treg ; l'augmentation de l'oxydation de la sonde induite par la stimulation via CD3 est plus importante dans les non-Th17 que dans les Th17. Par ailleurs, la NAC diminue de manière significative les ERO produites par l'activation du TCR. L'exposition des cellules au CFC exogène, augmente légèrement le taux d'ERO. De plus, l'oxydation de la sonde est majorée dans les non-Th17 par rapport aux autres sous-populations (CD3 +/- CFC +/- NAC) ; ceci suggère que les non-Th17 sont plus sensibles à l'activation du TCR (Résultat 29.C).

D'après le résultat 29.B, la NAC diminue de manière significative les MFI du DCF des LT qui conservent les niveaux basaux d'ERO. La NAC agit de la même façon sur les différentes sous-populations.

D'après le Résultat 30.A, l'expression de CD27 est augmentée en MFI et pas en pourcentage de cellules CD27+ dans les Treg, les non-Th17 et Th17, en condition de stimulation par l'anti-CD3 ; l'induction de l'expression de CD27 via le TCR est significative (Résultat 30.B). Ceci indique que ces cellules sont plus activées. En revanche, seulement 45% des Th17 activées expriment CD27, cette valeur est diminuée d'environ 35%, par rapport à la condition basale (Résultat 30.C et D). Cette diminution est significative par rapport à la condition non stimulée (Résultat 30.D) Cette dernière observation suggère que seule une fraction des Th17 répond à l'activation du TCR, alors que les Treg et non Th17 sont pour la plupart activées. L'exposition du CFC augmente modérément l'expression de CD27 dans tous les LT activés. De plus, la diminution du pourcentage de Th17 qui expriment CD27 n'est pas modifiée en présence de CFC. Le traitement par la NAC diminue l'expression de CD27 (MFI) de l'ensemble des LT, les cellules sont moins activées.

Nous dirons que le CFC n'augmente pas la production d'ERO et ne modifie pas l'expression de CD27 des sous-populations, en condition mitogénique. Le phénomène à la fois responsable, de la diminution du pourcentage de Th17 qui exprime CD27, et de l'augmentation d'ERO peut être alors attribué à la stimulation du TCR et non au CFC.

5. Exposition prolongée au CFC et sénescence : expression de p16

Le résultat 31 montre que l'expression de p16 augmente dans les différentes populations, par rapport à la condition basale après traitement au CFC. Cependant, l'induction de p16 est plus importante dans les Th17 que dans les non-Th17 et les Treg. De plus, l'augmentation de p16 n'est pas significative dans les Treg traités au CFC, ce qui suggère qu'ils sont résistants à la sénescence. D'autre part, la NAC semble prévenir l'expression de p16 induite par le CFC. Ceci suggère que le CFC est responsable de l'expression de p16, dans les différentes sous-populations, en particulier les Th17, via l'augmentation du taux d'ERO intracellulaires.

Afin de conclure ce chapitre, nous dirons que le CFC semble avoir un effet direct sur l'induction de la sénescence des Th17 isolées via la surexpression de p16.

Synthèse du Chapitre VII

Corrélation entre une agression oxydative et la sénescence lymphocytaire

En condition basale, les Th17 semblent présenter des caractéristiques proches des cellules sénescents par rapport aux autres sous-populations : une expression de p21 qui tend à être plus importante ainsi qu'une expression du marqueur d'activation CD27 qui paraît plus faible. Une agression oxydative aigue et une exposition prolongée à une dose unique de CFC ne semblent pas avoir d'effet sur le marqueur d'activation CD27 en présence ou non d'anti-CD3. En revanche, le traitement par le CFC pendant 24h augmente de manière significative l'expression du marqueur de sénescence p16 chez les Th17 par rapport aux non-Th17 et Treg. Cette augmentation semble être inhibée par le traitement par un anti-oxydant. Il semble qu'il y ait une relation entre l'agression oxydative et l'induction du marqueur de sénescence prématurée des Th17.

CHAPITRE VIII

Discussion

Le tabagisme chronique est un facteur de risque majeur pour le développement de différents cancers, et est associé à une plus grande incidence de différentes maladies inflammatoires chroniques, l'athérosclérose, la maladie de Crohn, l'arthrite rhumatoïde, ainsi que la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) dont il est le principal facteur étiologique. Différentes études tendent à montrer que la sénescence participe à la genèse et au développement de la BPCO, en rapport avec le stress oxydatif induit par le tabagisme chronique au niveau des cellules du parenchyme pulmonaire.

Les lymphocytes Th17 sont un sous-type de lymphocytes T CD4⁺ pro-inflammatoires impliqués dans la pathogénèse de différentes maladies inflammatoires chroniques au cours desquelles les Th17 qui infiltrent le tissu-cible, deviennent délétères. Une augmentation pulmonaire et systémique des lymphocytes T CD4⁺ Th17 est observée chez les patients atteints de BPCO post-tabagique, en rapport avec la sévérité de la maladie, mais les mécanismes par lesquels ils interviennent dans la BPCO sont peu connus. Par ailleurs, des données de la littérature montrent l'induction de marqueurs de sénescence au niveau des lymphocytes T circulants chez des sujets avec BPCO par rapport aux non-fumeurs. Cependant, la relation entre la réponse oxydative à la fumée de cigarette et l'induction d'une sénescence des lymphocytes Th17 susceptible de modifier leurs caractéristiques fonctionnelles, n'a jamais été établie, que ce soit chez le sujet sain ou chez les patients atteints de BPCO.

Nos résultats montrent pour la première fois l'existence d'une capacité oxydante des lymphocytes Th17 plus importante que celle des autres lymphocytes CD4⁺ T conventionnels et T régulateurs chez le sujet sain. De plus, les lymphocytes Th17 sont plus sensibles à la fumée de cigarette qui induit l'augmentation de l'expression du marqueur de sénescence p16, qui est inhibée par les anti-oxydants. L'expression d'enzymes productrices d'H₂O₂ comme l'IL4I1, pourrait contribuer à la capacité oxydante plus importante des lymphocytes Th17, et à l'induction de leur sénescence. Au total, nos résultats suggèrent un lien entre l'augmentation des ERO induite par la fumée de cigarette et la sénescence des Th17, et contribuent à une meilleure compréhension des mécanismes par lesquels le tabagisme module les réponses des lymphocytes T.

Discussion méthodologique

1. Modèle in vitro de l'exposition au condensat de fumée de cigarette

Dans notre étude, nous traitons des populations hétérogènes lymphocytaires de lymphocytes T CD4+ provenant de leucocytes mononucléés périphériques (PBMC) de donneurs volontaires sains (D.V.S.), avec du condensat de fumée de cigarette (CFC), milieu de culture contenant des oxydants stables et des particules solubles de la fumée de cigarette. Puis nous comparons l'effet rapide (30min) et à long terme du CFC (72h) sur le niveau d'ERO intracellulaires et sur des marqueurs associés au vieillissement cellulaire, dans les lymphocytes Th17 par rapport aux autres lymphocytes T CD4+ conventionnels mémoires (« non-Th17 »), aux lymphocytes T régulateurs (Treg) et aux lymphocytes T conventionnels naïfs (« T conv naïfs ») de D.V.S. Cette procédure correspond d'un point de vue physiologique, à l'analyse de l'effet direct des composants du CFC sur les sous-populations de lymphocytes T CD4+ circulants chez un individu sain ayant fumé une cigarette. Le fait que la fumée de cigarette est capable d'atteindre la circulation sanguine et que ses constituants (oxydants stables entre autres...) peuvent se retrouver dans le sang et agir sur les leucocytes circulants est attesté par différentes études. Une étude chez le rat, a montré que le stress oxydatif engendré par la fumée de cigarette mais également par le CFC est détectable dans le plasma sanguin. De même, des données chez l'homme ont montré que le plasma sanguin des fumeurs contient plus de biomarqueurs liés à un stress oxydatif (8-Hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OH-dG) et peroxydation lipidique) ou nitrosatif (nitrosylation des tyrosines), mais également des oxydants, tels que le peroxy-nitrite, en comparaison avec les non-fumeurs. Certaines études ont regardé les effets induits, 2h après la consommation d'une cigarette, et décelé la présence d'un stress oxydatif via l'identification de biomarqueurs spécifiques. En ce qui concerne les expériences *in vitro* avec du CFC, une équipe a récemment montré qu'après 2h d'exposition à une dose de 5% de CFC, il y a une augmentation significative des niveaux d'ERO dans des lymphocytes T (*Hernandez CP, 2013*). Nous avons utilisé la même concentration de CFC pour des temps d'expositions longs, mais utilisé 10% de CFC pour les temps courts ; la concentration de 10% de CFC est non toxique aux instants t, comme il a été présenté dans la partie « Résultats ». Nous avons vérifié que la dose de 5% induit également une augmentation significative d'ERO (résultats non montrés) sur des temps courts dans notre système expérimental. Dans notre étude, le temps d'exposition des sous-populations de

lymphocytes T CD4⁺ au CFC est court (30 min) par rapport aux données rapportées par (Hernandez CP, 2013). Nous avons montré que l'exposition à 5 et 10% de CFC induit une augmentation significative d'ERO, à différents temps d'exposition 30min, 6h, 18h; la production d'ERO est constante entre 0 et 6h, et s'abaisse jusqu'au niveau basal à partir de 18h (résultats non montrés). Enfin, à la différence de l'étude de C. Hernandez et coll. dans laquelle 10% de SVF est utilisé pour les cultures, nous avons minimisé la concentration de SVF dans nos milieux de culture à 2.5%, car le sérum contient beaucoup d'éléments pouvant activer les cellules et constituer un biais.

2. *Suspensions cellulaires utilisées*

Il a été antérieurement montré que les cellules d'origine myéloïde, issues de PBMC totaux, produisent des quantités d'H₂O₂, nettement supérieures à celles produites par les populations lymphocytaires. Cet oxydant est un composé stable pouvant diffuser à travers les membranes cellulaires et agir sur les populations cellulaires environnantes. Bien que l'analyse des taux d'ERO faites sur des PBMC totaux se rapproche des conditions physiologiques, il serait impossible d'en déduire l'effet direct de la fumée de cigarette sur les sous-populations de lymphocytes T CD4⁺. Effectivement, le CFC peut agir directement sur la production d'ERO, de cytokines et de chimiokines monocytaires pouvant majorer ou diminuer les effets de l'agression oxydative sur les lymphocytes T. C'est la raison pour laquelle nous avons isolé les populations lymphocytaires T CD4⁺ des populations monocytaires, afin d'analyser le comportement lymphocytaire T dans un environnement oxydatif maîtrisé.

D'autre part, dans cette étude les expériences sont effectuées sur une population lymphocytaire hétérogène de lymphocytes T CD4⁺ ; les populations de Treg, Tconv naïfs et mémoires (Th17 et non-Th17) sont réunis dans la même suspension cellulaire, dans des proportions spécifiques du sang périphérique les lymphocytes Th17 ne représentant que 3-6% des lymphocytes T CD4⁺. Nous sommes conscients que la production d'ERO et l'expression de différentes molécules par les populations représentées dans notre travail sont le résultat d'interactions entre ces populations cellulaires, en particulier que les Treg peuvent inhiber les Teff via une privation en GSH ou par un autre un mécanisme de suppression. Cette communication entre les lymphocytes T est pourtant nécessaire pour leur survie, et c'est la raison du choix de faire nos analyses sur cette population hétérogène circulante dans le but de mieux comprendre l'effet du CFC. Cette remarque ne s'applique pas aux analyses de

quantification de l'expression des systèmes synthétisant les ERO et des systèmes anti-oxydants, ainsi que celles d'ICC. En effet, dans ces expériences, les analyses sont faites sur les populations d'intérêt isolées des autres sous-populations. Cette différence méthodologique pourrait expliquer à la fois le recours à l'utilisation d'une concentration élevée d' H_2O_2 (250 μ M) par rapport à la littérature, et l'induction de p16 dans les Th17 après seulement 24h d'exposition au CFC. Dans la littérature, une concentration d' H_2O_2 comprise entre 5-20 μ M est suffisante pour augmenter de manière significative l'oxydation de la sonde H_2 -DCF-DA dans les Treg isolés, par rapport à la condition basale. Or, dans notre cas ces doses n'ont aucun effet sur l'oxydation de la sonde dans les Treg présents parmi une population hétérogène de lymphocytes T CD4⁺ (résultats non montrés). L'isolement des Treg des autres lymphocytes T circulants les rend probablement plus sensibles à de faibles concentrations d' H_2O_2 tandis que dans une population hétérogène de lymphocytes T CD4⁺ périphériques au sein desquels ils sont faiblement représentés, l'effet de cette dose n'est pas détectable. De même, le CFC ne montre pas d'effet sur l'expression de CD27 sur les Th17 analysés au sein d'une population hétérogène de lymphocytes T CD4⁺, alors que les mêmes cellules isolées expriment plus de p16, un autre marqueur de sénescence, après seulement 24h d'exposition. Ceci pourrait être expliqué par l'induction de la sénescence par le CFC, via un mécanisme indépendant du marqueur CD27, ou encore par un effet protecteur de la population hétérogène, au travers de communications intercellulaires.

3. Combinaison d'anticorps utilisée dans l'identification des sous-populations lymphocytaires présentes dans le sang périphérique

Lors des analyses réalisées concernant le métabolisme oxydatif des lymphocytes T CD4⁺, les différentes sous-populations de lymphocytes T sont identifiées sur la base de l'expression de marqueurs membranaires, de manière non exhaustive. Les nTreg sont identifiés sur la base de l'expression de 3 marqueurs membranaires CD4, CD25 et CD127 ; leur phénotype est CD4⁺CD25^{high}CD127^{-/low}. En introduction, nous avons décrit la caractérisation des nTreg, au moyen des marqueurs cités ci-dessus, mais également par le facteur de transcription Foxp3 qui est essentiel pour la fonction immunosuppressive des Treg. Le marquage simultané par des sondes métaboliques et du facteur de transcription intracellulaire est impossible, en raison du risque de perte de la sonde et de son importante fluorescence ; les compensations sur le cytomètre en flux seraient impossibles. Nous avons donc vérifié séparément l'expression de

Foxp3 dans les cellules de phénotype CD4+CD25^{high}CD127^{-/low} (cf. dans « matériels et méthodes »). Les populations de lymphocytes T effectrices sont des populations mémoires ayant déjà rencontré un antigène ; elles expriment le marqueur CD45RO+ alors que les cellules naïves sont CD45RO- (ou CD45RA+) car elles n'ont pas été stimulées par un antigène. Dans notre projet, la visualisation du métabolisme oxydatif des lymphocytes T naïfs est justifiée par la présence accrue de lymphocytes mémoires, chez les personnes âgées versus jeunes ; rendant ainsi impossible de répondre à de nouveaux antigènes.

Dans notre travail, nous focalisons nos analyses sur les Th17 identifiés comme ayant un phénotype de surface CD4+CD25-CD127+CD45RO+CCR6+. Des études montrent que les cellules possédant ce phénotype sécrètent de l'IL-17. Attention IL-17 seul ne permet pas d'identifier les Th17. Une caractérisation plus fine de cette sous-population nécessite le recours à des marqueurs membranaires supplémentaires, tels que le CXCR3, absent des Th17, ainsi que le CCR4. Le marqueur CD161 est également préconisé pour l'identification des Th17, notamment issus du thymus. La restriction à la détection simultanée de 7 paramètres imposée par le cytomètre en flux disponible dans notre unité INSERM, nous empêche d'utiliser les marqueurs membranaires supplémentaires évoqués. En conséquence également, les « non-Th17 » qui regroupent les Th1 et les Th2 sont caractérisés par défaut dans notre étude car ni le marqueur CXCR3 (membranaire) et ni le marquage intracellulaire de l'IL-4 qui permettraient de les identifier n'ont pu être utilisés.

Enfin, l'utilisation du marqueur d'activation CD27 pour la détection de cellules sénescents est justifiée par des études réalisées chez l'homme, montrant l'accumulation des populations TCD4+CD45RO+CD27- chez des personnes âgées ou atteintes de maladies inflammatoires liées au vieillissement tel que l'arthrite rhumatoïde (*Kovaiou RD, 2006 ; Di Mitri D, 2011 ; Papagno L, 2004 ; Brenchley JM, 2003*). De plus, la perte de l'expression de CD27 est liée à un raccourcissement de la longueur des télomères, dans les populations de lymphocytes T CD4+effecteurs mémoires arrivés à un stade terminal de différenciation.

4. *Les sondes métaboliques*

Les résultats concernant la sonde H₂DCF-DA peuvent être discutés en ce qui concerne la spécificité de la sonde vis-à-vis des différentes ERO produites. En effet, dans les expériences utilisant l'H₂O₂ comme stimulus exogène, l'augmentation de la MFI du DCF est spécifique de l'oxydant. En ce qui concerne les expériences utilisant le THBP et le CFC, la spécificité de la sonde est mise en doute. L'émission de fluorescence de cette sonde est majoritairement due à son oxydation par l'H₂O₂, mais des études ont montré que l'ion HO⁻ ou des dérivés de l'azote comme le peroxinitrite peuvent également induire une fluorescence de la sonde. D'autre part, des précautions particulières ont été prises vis-à-vis de cette sonde car une autofluorescence est possible en présence de lumière. Nous avons également vérifié qu'une différence d'estérification de la sonde n'est pas à l'origine de la différence de son oxydation entre les sous-populations. Pour ce faire, nous avons vérifié sur des populations isolées de Treg, Th17 et non-Th17 les différences de MFI, à l'aide d'une sonde-contrôle déjà oxydée montrant que la MFI était identique entre les différents lymphocytes, ce qui indique que l'oxydation de la sonde H₂-DCF-DA résulte de la présence d'oxydants et non d'une variation de pH. D'autre part, il est important de mesurer la fluorescence dans les cellules vivantes, car les cellules mortes peuvent montrer une MFI plus élevée. L'utilisation de la sonde en CFM nous permet de s'affranchir de ce problème, car les analyses et tris cellulaires sont toujours faits après présélection des populations cellulaires vivantes. Les résultats concernant la spécificité de la sonde DHE ne posent pas de problème, car sa spécificité par rapport à l'anion superoxyde a été prouvée dans des études.

5. *Concentration des différents réactifs utilisés pour le traitement des cellules*

Les concentrations de THBP et d'H₂O₂ utilisées dans notre étude, sont celles décrites dans la littérature, pour induire un stress oxydatif, dans des macrophages ou des fibroblastes (*Furukawa A, 2007 ; Zdanov S, 2006*). Nous avons procédé de la même manière pour les concentrations de CFC (*Baglole CJ, 2008 ; Nyunoya T, 2006 ; Hernandez CP, 2013*), de NAC (*Efimova O, 2011*) et de FCCP (*Sena LA, 2013*).

Discussion générale et perspectives

Synthèse

Nos résultats montrent d'une part que les lymphocytes Tconv naïfs présentent en condition basale, des taux de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) supérieurs à ceux des populations lymphocytaires mémoires conventionnelles Th17, non Th17, et des Treg.

De plus, un taux d' H_2O_2 supérieur en condition basale dans les populations lymphocytaires T mémoires conventionnelles par rapport aux Treg est également rapporté ; de plus nos résultats montrent pour la première fois que la différence de taux d'ERO basal observée entre lymphocytes T conventionnels et Treg incombe aux lymphocytes Th17.

En revanche, aucune différence du taux d'anion superoxyde (O_2^-) n'est constatée entre les différentes sous-populations lymphocytaires. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature (*Mougiakakos D, 2009*) qui attribuent cette différence entre lymphocytes T mémoires conventionnels et Treg, à une capacité anti-oxydante vis-à-vis de l' H_2O_2 supérieure des Treg, en raison d'un système anti-oxydant dépendant de la thioredoxine plus performant (*Mougiakakos D, 2011*).

Nos résultats de quantification de l'expression des systèmes de détoxification d'ERO semblent confirmer que les lymphocytes T mémoires conventionnels, Th17 et non-Th17, exprimeraient moins de thioredoxine réductases TXRD1 et TXRD2 que les Treg en condition basale. En revanche, nos résultats semblent montrer pour la première fois que les Th17 exprimeraient moins d'enzyme anti-oxydante HO-1 que les Treg, ce qui pourrait contribuer au taux basal d' H_2O_2 plus important observé en condition basale dans les Th17.

Le traitement par l'anti-oxydant NAC diminue de façon équivalente les MFI du DCF dans les différents lymphocytes T $CD4^+$ tout en maintenant un taux d'ERO plus important dans les Th17 par rapport aux non-Th17, ce qui pourrait suggérer que le système anti-oxydant dépendant de la thioredoxine, régulant également le niveau de glutathion, dont le niveau d'expression est similaire dans les Th17 et les non-Th17, n'est pas responsable du taux d'ERO plus important dans les Th17. Enfin, les résultats préliminaires du traitement par le FCCP des lymphocytes T $CD4^+$ triés montrent que les taux d' H_2O_2 sont fortement diminués pour toutes les sous-populations de lymphocytes T $CD4^+$ analysées, et qu'en particulier le pourcentage d'oxydation de la sonde des Tconv naïfs est considérablement atténué. Ce

résultat doit être confirmé par l'analyse de DVS supplémentaires permettant une analyse statistique des résultats. Nos résultats montrant que la production basale d'ERO par les lymphocytes T serait majoritairement mitochondriale sont en accord avec les résultats d'études récentes réalisées sur des souris déficientes pour un gène régulant la production d'oxydants mitochondriaux (*Sena LA, 2013*), et également sur une lignée cellulaire de Jurkat (*Gill T, 2013*). L'effet du FCCP est semblable sur la production d' H_2O_2 mitochondriale ; ceci implique que l' H_2O_2 résiduel provient d'une autre source.

1. Constituants du CFC

L'addition de CFC ou de THBP (production d' H_2O_2 exogène) pendant un temps court augmente de manière significative les taux d' H_2O_2 dans toutes les sous-populations lymphocytaires T analysées.

Le traitement par la NAC induit une forte diminution des taux d' H_2O_2 dans toutes les sous-populations de lymphocytes T CD4+ traitées par du CFC, et supprime les différences de taux d' H_2O_2 entre les Th17 et les Treg observés à l'état basal. La persistance d'un taux résiduel d'ERO dans les cellules stimulées par du CFC en présence de NAC suggère une source d'ERO indépendante du glutathion qui reste à déterminer. Afin de discriminer l'effet potentiel de l' H_2O_2 diffusible contenu dans le CFC d'une production endogène d' H_2O_2 consécutive à la stimulation des lymphocytes T par d'autres composants du CFC, ces expériences seront reproduites en présence de catalase.

2. La stimulation du TCR et l'exposition unique au CFC

Nos résultats confirment ceux d'une autre équipe qui a récemment montré qu'après 2h d'exposition à une dose de 5% de CFC, il y a une augmentation significative des niveaux d'ERO dans des lymphocytes T. Cependant, dans cette étude, l'exposition au CFC ralentit la prolifération des lymphocytes T en association avec une diminution du potentiel membranaire mitochondriale et une apoptose cellulaire, ce qui n'est pas ce que nous observons dans nos cellules (*Hernandez CP, 2013*). L'utilisation de lymphocytes T activés de façon mitogénique par un cocktail d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28 dans cette étude, pourrait expliquer la différence en terme d'effet fonctionnel de l'exposition au CFC des lymphocytes T.

Enfin, les données concernant les expositions de longue durée au CFC (72h), avec ou stimulation du TCR, supposent que la génération d'ERO intracellulaires par le CFC est transitoire. Ceci peut être expliqué par le fait que nous travaillons sur des D.V.S et que les systèmes antioxydants sont recrutés. De plus, une exposition unique ne suffit peut-être pas à maintenir des niveaux élevés d'ERO ; des expositions chroniques seraient plus adaptées ; les études sur les maladies respiratoires liées au tabagisme montrent un lien entre une exposition chronique et le stress oxydatif.

3. Cibles biologiques du CFC

Nos résultats concernant l'effet de l'agent découplant de la mitochondrie, le FCCP, montrent pour la première fois que l'exposition d'une population lymphocytaire T CD4+ hétérogène, au CFC induirait une production d'ERO, par la mitochondrie. Cette production est transitoire et revient au niveau basal, au bout de 18h (non montrés). Différentes études montrent qu'il existe un lien entre la fumée de cigarette et un stress oxydatif mitochondrial (*Anbarasi K, 2005 ; Gairola C, 1973*). La fumée de cigarette contient de nombreuses substances chimiques et le CFC contient 5% des particules solubles de la fumée dont le peroxy-nitrite et l'acroléine. Ces constituants sont capables d'induire une production d'ERO intracellulaires via la mitochondrie (*Jia L, 2007*). Cependant, la sonde DCFDA utilisée ne nous permet pas d'affirmer la provenance mitochondriale des ERO produits par les lymphocytes T activés par le CFC. Nos résultats préliminaires sur la sonde MitoSOX ciblant préférentiellement la mitochondrie semble le confirmer.

4. Immunosénescence et CD27

Les lymphocytes T CD4+ mémoires en stade de différenciation terminale présentent une perte de l'expression de marqueurs de co-stimulation, tels que CD27 et CD28, un raccourcissement de la longueur des télomères, un défaut de prolifération et une augmentation de la production molécules inflammatoires (IFN γ , perforine...). Ces caractéristiques définissent la sénescence cellulaire et en particulier celles des lymphocytes.

Concernant l'analyse des marqueurs de la sénescence, la comparaison des profils d'expression de p21 et CD27, entre les sous-populations lymphocytaires isolées, propose un profil pré-

sénescent des Th17, à l'état basal. Des données dans la littérature indiquent que les Th17 présentent des caractéristiques propres aux lymphocytes T effecteurs mémoires, à un stade de différenciation terminale avec une expression diminuée de CD27 sur les Th17, par rapport aux autres sous-populations de lymphocytes T (*Kryczek I, 2011 ; Muranski P, 2011*). Les lymphocytes Th17 sont également décrits comme des cellules avec un phénotype pro-inflammatoire, et comme possédant une faible capacité de prolifération. De plus, les Th17 sont souvent retrouvées en proportions importantes chez les personnes âgées, et chez les personnes atteintes de maladies liés au vieillissement cellulaire (infections virales chroniques, maladies chroniques inflammatoires) (*Kovaiou RD, 2005 ; Kovaiou RD, 2006*). En accord avec les données de la littérature qui montrent que les Th17 ont une expression de CD27 plus faible que les autres sous-populations, nous avons montré qu'une stimulation du TCR diminue la proportion de Th7 exprimant CD27 d'environ 35% ; ceci pourrait indiquer que les Th17 sont à un stade de différenciation terminale (*Schiött A, 2004*).

De surcroît, nous montrons que les Th17 à l'état basal, exprimeraient plus de p21 que les Treg, les « non Th17 » et les Tconv naïfs, ce qui est cohérent avec un état pré-sénescent des Th17. Cependant, le traitement par le CFC ne montre aucun effet sur l'expression de CD27 des différents types de lymphocytes T après une exposition aigüe, et longue, ou en association avec une stimulation via le complexe TCR/CD3.

En revanche, la stimulation du TCR/CD3 engendre une synthèse accrue d'ERO intracellulaires et une diminution de l'expression de CD27 dans les Th17, en comparaison de la condition non stimulée. Cette production d'ERO par l'anti-CD3 est inhibée de manière significative par la NAC.

5. Sénescence et p16

De plus, après une exposition de 24h au CFC, l'expression du marqueur de sénescence p16 dans les Th17 triés est nettement supérieure aux autres sous-populations de lymphocytes ; le traitement par la NAC préviendrait cette induction. Nos résultats montrent donc que les lymphocytes Th17 sont plus sensibles à l'induction de la sénescence, et que cette induction serait dépendante de la production d'ERO issues du CFC. En effet, la présence des oxydants contenues dans le CFC et ceux induits par la mitochondrie favorisent un environnement très oxydatif qui favorise probablement l'expression de p16 dans les Th17. Cependant, l'expression de p16 pourrait également résulter d'un dommage au niveau de l'ADN, que nous n'avons pas démontré.

La voie des MAPK a un rôle important dans la production d'oxydants endogènes des lymphocytes T, suite à une stimulation du TCR (*Devadas S, 2002*). De plus, le rôle de cette voie a également été incriminé dans l'induction de sénescence dans les lymphocytes T effecteurs. Nos résultats montrent que le CFC ne majore pas la production d'ERO des lymphocytes T CD4+ stimulés par l'anti-CD3. De plus, l'induction d'ERO par la stimulation du CD3/TCR en présence de CFC est d'une amplitude similaire dans les Th17 et les non-Th17 ; seule la stimulation via le CD3/TCR est responsable de cette production d'ERO ce qui suggère que la voie des MAPK n'est pas recrutée par le CFC pour la production d'ERO et ne peut expliquer la différence d'expression de p16 induite par le CFC de façon plus importante dans les Th17 par rapport aux autres sous-populations de lymphocytes T CD4+.

6. IL-4i1 et Th17

L'IL4i1 est une L-amino -oxydase dont l'activité génère de l' H_2O_2 par dégradation de l'acide aminé L-phénylalanine. Il a été décrit que l'IL4I1 est surexprimée dans les Th17 et qu'elle est à l'origine de leur incapacité à proliférer en réponse à une stimulation du TCR. La production d' H_2O_2 par l'IL4I1 diminue l'expression de CD3 (chaîne zeta) inhibant ainsi la voie de signalisation liée au TCR et donc l'activation (production d'IL-2) et la prolifération des Th17 (*Santarlaschi V, 2012*). Ces données indiquent qu'en plus d'une production plus importante en oxydants, ces cellules présentent naturellement une anomalie des voies de signalisation du TCR les empêchant de proliférer. L'augmentation de sénescence des Th17, induite par le CFC et attestée par l'augmentation de p16 dans les Th17 traitée par du CFC qui pourrait être la résultante de ce défaut de prolifération intrinsèque des Th17, majoré par les niveaux élevés d'oxydants, induits par le CFC en plus de ceux produits par l'IL-4i1. Le CFC pourrait également majorer l'activité de l'IL-4i1 afin d'accentuer la production d'oxydants ; ceci pourrait favoriser l'induction de sénescence. La mesure de l'activité de l'IL-4i1 en présence de CFC pourrait éclaircir ce point.

L'ensemble de ces données semblent indiquer qu'il existe une susceptibilité accrue des Th17 à la sénescence, en réponse à une production élevée en oxydants intracellulaires via le CFC et l'IL-4i1.

Perspectives

Dans ce travail de Thèse, j'ai pu mettre en évidence pour la première fois l'existence d'une différence de production basale d'oxydants entre les Th17 versus les non-Th17 et Treg. Par ailleurs, l'IL-4i1 pourrait être à l'origine de cette différence d'oxydation de la sonde entre les différentes sous-populations. Cependant, son rôle dans cette différence de production basale n'a pas été étudié. Mes résultats indiquent également qu'en présence d'un environnement pro oxydant, comme l'exposition au condensat de fumée de cigarette, les lymphocytes issus d'une population hétérogène répondent de la même manière. Néanmoins, j'ai montré que l'exposition au CFC des Th17 induit une surexpression du marqueur de sénescence p16, en comparaison des autres sous-populations. Le traitement des Th17 et des autres populations par la NAC inhibe complètement l'expression de p16, indiquant que le CFC est responsable de l'induction de sénescence.

Les perspectives à court terme de ce projet seraient atteintes par la validation du phénotype sénéscent des Th17 exposés au CFC. Pour ce faire, l'expression de différents marqueurs associés à la sénescence serait analysée dans les Th17 traités par le CFC en comparaison des autres sous-populations lymphocytaires TCD4+, tels que :

- p21
- β -galactosidase
- éventuelle anomalie de prolifération en comparaison de la condition basale
- cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF- α , IFN γ)

Il faudrait également mesurer l'activité enzymatique de l'IL-4i1, HO-1 ou TrxR3 des sous-populations lymphocytaires exposées au CFC ; ceci permettrait dans un premier temps d'identifier la molécule impliquée dans l'induction de sénescence. Dans un second temps, son rôle dans la sénescence serait déterminé par une stratégie d'inhibition d'expression de la molécule, au moyen d'inhibiteurs pharmacologiques ou encore par des outils moléculaires (siRNA).

Etant donné l'implication de l'IL-4i1 dans la production d'H₂O₂, il serait intéressant d'établir un lien entre l'H₂O₂ contenu dans le CFC et l'induction de sénescence. Pour cela, les différentes sous-populations de lymphocytes TCD4+ seraient préalablement traitées par de la catalase, un antioxydant spécifique de l'H₂O₂.

Concernant les perspectives à moyen terme, la pertinence des résultats obtenus pourrait être évaluée chez des patients atteints de BPCO (stade sévère et modérée) en comparaison de sujets sains fumeurs et non-fumeurs. En effet, la comparaison des profils d'expression des marqueurs de sénescence et la mesure de l'activité enzymatique des différentes cibles pourraient révéler une éventuelle majoration chez les patients atteints de BPCO en comparaison des sujets sains fumeurs et non-fumeurs.

Par ailleurs, le rôle physiopathologique des Th17 rendus sénescents par le CFC pourrait être exploré dans l'emphysème pulmonaire *in vivo* sur des modèles murins exposés ou non à la fumée de cigarette. Les Th17 rendus sénescents pourraient induire les symptômes observés durant l'emphysème pulmonaire, tels que la destruction des cloisons inter alvéolaires et l'augmentation du phénotype inflammatoire, chez des souris saines ou être majorés chez des souris exposées à la fumée de cigarette.

Pour aller encore plus loin dans ces perspectives, il serait intéressant d'évaluer ces effets à partir de Th17 déficientes pour le gène de l'IL-4i1 ou les autres cibles (HO-1 ou TrxR3), en fonction de leur implication dans la sénescence.

Bibliographie

Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F (2007). **Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17 producing human T helper cells.** *Nat Immunol* 8(9):942-9.

Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, Jarrossay D, Gattorno M, Lanzavecchia A, Sallusto F, Napolitani G (2007). **Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells.** *Nat Immunol* 8(6):639-46.

Adler V, Yin Z, Tew KD, Ronai Z (1999). **Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling.** *Oncogene* 18 6104–6111.

Afkarian M, Sedy JR, Yang J, Jacobson NG, Cereb N, Yang SY, Murphy TL, Murphy KM (2002). **T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells.** *Nat Immunol* 3(549–57).

Agarwal S, Rao A (1998). **Modulation of chromatin structure regulates cytokine gene expression during T cell differentiation.** *Immunity* 9: 765–775.

Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, de Sauvage FJ, Gurney AL (2003). **Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17.** *J Biol Chem* 278(3):1910-4.

Alcorta DA, Xiong Y, Phelps D, Hannon G, Beach D, Barrett JC (1996). **Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13742-7.

Alder JK, Guo N, Kembou F, Parry EM, Anderson CJ, Gorgy AI, Walsh MF, Sussan T, Biswal S, Mitzner W, Tuder RM, Armanios M (2011). **Telomere length is a determinant of emphysema susceptibility.** *Am J Respir Crit Care Med* 184(8):904-12.

Allison JP, Lanier LL (1987). **Structure, function, and serology of the T-cell antigen receptor complex.** *Annu Rev Immunol* 5 :503.

Amara N, Bachoual R, Desmard M, Golda S, Guichard C, Lanone S, Aubier M, Ogier-Denis E, Boczkowski J (2007). **Diesel exhaust particles induce matrix metalloprotease-1 in human lung epithelial cells via a nadp(h) oxidase/nox4 redox-dependent mechanism.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293:L170-181.

Amsellem V, Gary-Bobo G, Marcos E, Maitre B, Chaar V, Validire P, Stern JB, Nouredine H, Sapin E, Rideau D, Hue S, Le Corvoisier P, Le Gouvello S, Dubois-Randé JL, Boczkowski J, Adnot S (2011). **Telomere dysfunction causes sustained inflammation in chronic obstructive pulmonary disease.** *Am J Respir Crit Care Med* 184(12):1358-66.

Anbarasi K, Vani G, Devi CS (2005). **Protective effect of bacoside A on cigarette smoking-induced brain mitochondrial dysfunction in rats.** *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 24(3):225-34.

Andersen JN, Mortensen OH, Peters GH, Drake PG, Iversen LF, Olsen OH, Jansen PG, Andersen HS, Tonks NK, Møller NP (2001). **Structural and evolutionary relationships among protein tyrosine phosphatase domains.** *Mol Cell Biol* 21, 7117–7136.

Ando T, Mimura K, Johansson CC, Hanson MG, Mougiakakos D, Larsson C, Martins da Palma T, Sakurai D, Norell H, Li M, Nishimura MI, Kiessling R (2008). **Transduction with the antioxidant enzyme catalase protects human T cells against oxidative stress.** *J Immunol* 181(12):8382-90.

Annacker O, Pimenta-Araujo R, Burlen-Defranoux O, Barbosa TC, Cumano A, Bandeira A (2001). **CD25+ CD4+ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10.** *Immunol* 166(5): 3008-18.

Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, Maggi L, Liotta F, Mazzinghi B, Parente E, Filì L, Ferri S, Frosali F, Giudici F, Romagnani P, Parronchi P, Tonelli F, Maggi E, Romagnani S (2007). **Phenotypic and functional features of human Th17 cells.** *J Exp Med* 204(8):1849-61.

Aoshiha K, Koinuma M, Yokohori N, Nagai A (2003). **Immunohistochemical evaluation of oxidative stress in murine lungs after cigarette smoke exposure.** *Inhal Toxicol* 15(10):1029-38.

Aoshiha K, Zhou F, Tsuji T, Nagai A (2012). **DNA damage as a molecular link in the pathogenesis of COPD in smokers.** *Eur Respir J* 39(6):1368-76.

Archer SL, Huang JM, Hampl V, Nelson DP, Shultz PJ, Weir EK (1994). **Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase.** *Proc Natl Acad Sci USA* 91(16):7583-7.

Arnér ES (2009). **Focus on mammalian thioredoxin reductases--important selenoproteins with versatile functions.** *Biochim Biophys Acta* 1790(6):495-526.

Arnold RS, Shi J, Murad E, Whalen AM, Sun CQ, Polavarapu R, Parthasarathy S, Petros JA, Lambeth JD (2001). **Hydrogen peroxide mediates the cell growth and transformation caused by the mitogenic oxidase Nox1.** *Proc Natl Acad Sci USA* 98:5550–5555.

Arsenijevic D, Onuma H, Pecqueur C, Raimbault S, Manning BS, Miroux B, Couplan E, Alves-Guerra MC, Goubern M, Surwit R et al. (2000). **Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production.** *Nat Genet* 26(4): 435-439.

Arthur JR (2000). **The glutathione peroxidases.** *Cell Mol Life Sci* 57(13-14): 1825-35.

Atadja P, Wong H, Garkavtsev I, Veillette C, Riabowol K (1995). **Increased activity of p53 in senescing fibroblasts.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(18):8348-52.

Aujla SJ, Chan YR, Zheng M, Fei M, Askew DJ, Pociask DA, Reinhart TA, McAllister F, Edeal J, Gaus K et al. (2008). **IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia.** *Nat Med* 14(3):275-81.

Aujla SJ, Dubin PJ, Kolls JK (2007). **Interleukin-17 in pulmonary host defense.** *Exp Lung Res* 33:507-18.

Awasthi A, Carrier Y, Peron JP, Bettelli E, Kamanaka M, Flavell RA, Kuchroo VK, Oukka M, Weiner HL (2007). **A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells.** *Nat Immunol* 8(12):1380-9.

Azuma T, Takahashi T, Kunisato A, Kitamura T, Hirai H (2003). **Human CD4+CD25+ regulatory T cells suppress NKT cell functions.** *Cancer Res* 63(15): 4516-20.

Bacchetta R, Gambineri E, Roncarolo MG (2007). **Role of regulatory T cells and FOXP3 in human diseases.** *J Allergy Clin Immunol* 120(2):227-35.

Baglole CJ, Sime PJ, Phipps RP (2008). **Cigarette smoke-induced expression of heme oxygenase-1 in human lung fibroblasts is regulated by intracellular glutathione.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 295(4):L624-36.

Balint B, Donnelly LE, Hanazawa T, Kharitonov SA, Barnes PJ (2001). **Increased nitric oxide metabolites in exhaled breath condensate after exposure to tobacco smoke.** *Thorax* 56(6):456-61.

Bánfi B, Malgrange B, Knisz J, Steger K, Dubois-Dauphin M, Krause KH (2004). **NOX3, a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear.** *J Biol Chem* 279(44):46065-72.

Bánfi B, Molnár G, Maturana A, Steger K, Hegedûs B, Demaurex N, Krause KH (2001). **A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes.** *J Biol Chem* 276(40):37594-601.

Barceló B, Pons J, Ferrer JM, Sauleda J, Fuster A, Agustí AG (2008). **Phenotypic characterisation of T-lymphocytes in COPD: abnormal CD4+CD25+ regulatory T-lymphocyte response to tobacco smoking.** *Eur Respir J* 31(3):555-62.

Barja G (1999). **Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity.** *Biomembr* 31: 347-366.

Barnes PJ (2004). **Mediators of chronic obstructive pulmonary disease.** *Pharmacol Rev* 56(4):515-48.

Barouki R, Morel Y (2001). **Repression of cytochrome P450 1A1 gene expression by oxidative stress : mechanisms and biological implications.** *Biochem Pharmacol* 61 : 511-6.

Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, Cho JH, Duerr RH, Rioux JD, Brant SR, Silverberg MS, Taylor KD, Barmada MM, Bitton A, Dassopoulos T, Datta LW, Green T, Griffiths AM, Kistner EO (2008). **Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease.** *Nat Genet* 40(8):955-62.

Batten M, Li J, Yi S, Kljavin NM, Danilenko DM, Lucas S, Lee J, de Sauvage FJ, Ghilardi N (2006). **Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells.** *Nat Immunol* 7(9):929-36.

Beckman JS, Koppenol WH (1996). **Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly.** *Am J Physiol* 271(5 Pt 1):C1424-37.

Bedard K, Krause KH (2007). **The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology.** *Physiol Rev* 87(1):245-313.

Ben-Porath I, Weinberg RA (2005). **The signals and pathways activating cellular senescence.** *Int J Biochem Cell Biol* 37(5):961-76.

Beriou G, Costantino CM, Ashley CW, Yang L, Kuchroo VK, Baecher-Allan C, Hafler DA (2009). **IL-17-producing human peripheral regulatory T cells retain suppressive function.** *Blood* 113(18):4240-9.

Berrebi D, Besnard M, Fromont-Hankard G, Paris R, Mougnot JF, De Lagausie P, Emilie D, Cezard JP, Navarro J, Peuchmaur M (1998). **Interleukin-12 expression is focally enhanced in the gastric mucosa of pediatric patients with Crohn's disease.** *Am J Pathol* 152(3):667-72.

Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK (2008). **Induction and effector functions of T(H)17 cells.** *Nature* 453(7198):1051-7.

Bettelli E, Sullivan B, Szabo SJ, Sobel RA, Glimcher LH, Kuchroo VK (2004). **Loss of T-bet, but not STAT1, prevents the development of experimental autoimmune encephalomyelitis.** *J Exp Med* 200(1):79-87.

Bettini ML, Vignali DA (2010). **Development of thymically derived natural regulatory T cells.** *Ann N Y Acad Sci* 1183:1-12.

Bilimoria MH, Ecobichon DJ (1992). **Protective antioxidant mechanisms in rat and guinea pig tissues challenged by acute exposure to cigarette smoke.** *Toxicology* 72(2):131-44.

Bobyleva V, Bellei M, Paziienza TL, Muscatello U (1997). **Effect of cardiolipin on functional properties of isolated rat liver mitochondria.** *Biochem Mol Biol Int* 41(3): 469-480.

Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE (1998). **Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells.** *Science* 279(5349):349-52.

Bond JA, Wyllie FS, Wynford-Thomas D (1994). **Escape from senescence in human diploid fibroblasts induced directly by mutant p53.** *Oncogene* 9(7):1885-9.

Boniface K, Bak-Jensen KS, Li Y, Blumenschein WM, McGeachy MJ, McClanahan TK, McKenzie BS, Kastelein RA, Cua DJ, de Waal Malefyt R (2009). **Prostaglandin E2**

regulates Th17 cell differentiation and function through cyclic AMP and EP2/EP4 receptor signaling. *J Exp Med* 206(3):535-48.

Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, Sternjak A, Diamantini A, Giometto R, Höpner S, Centonze D, Bernardi G, Dell'Acqua ML, Rossini PM, Battistini L, Röttschke O, Falk K (2007). **Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression.** *Blood* 110(4):1225-32.

Boss O, Samec S, Paoloni-Giacobino A, Rossier C, Dulloo A, Seydoux J, Muzzin P, Giacobino JP (1997). **Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression.** *FEBS Lett* 408(1): 39-42.

Botelho FM, Nikota JK, Bauer CM, Morissette MC, Iwakura Y, Kolbeck R, Finch D, Humbles AA, Stämpfli MR (2012). **Cigarette smoke-induced accumulation of lung dendritic cells is interleukin-1 α -dependent in mice.** *Respir Res* 13:81.

Boulland ML, Marquet J, Molinier-Frenkel V, Möller P, Guiter C, Lasoudris F, Copie-Bergman C, Baia M, Gaulard P, Leroy K, Castellano F (2007). **Human IL4I1 is a secreted L-phenylalanine oxidase expressed by mature dendritic cells that inhibits T-lymphocyte proliferation.** *Blood* 110(1):220-7.

Boutten A, Goven D, Boczkowski J, Bonay M (2010). **Oxidative stress targets in pulmonary emphysema: focus on the Nrf2 pathway.** *Expert Opin Ther Targets* 14(3):329-46.

Boveris A, Oshino N, Chance B (1972). **The cellular production of hydrogen peroxide.** *Biochem J* 128: 617-630.

Boyton RJ, Altmann DM (2002). **Is selection for TCR affinity a factor in cytokine polarization?** *Trends Immunol* 23(11):526-9.

Bracke KR, D'hulst AI, Maes T, Moerloose KB, Demedts IK, Lebecque S, Joos GF, Brusselle GG (2006). **Cigarette smoke-induced pulmonary inflammation and emphysema are attenuated in CCR6-deficient mice.** *J Immunol* 177(7):4350-9.

Brand MD, Steverding D, Kadenbach B, Stevenson PM, Hafner RP (1992). **The mechanism of the increase in mitochondrial proton permeability induced by thyroid hormones.** *Eur J Biochem* 206(3): 775-781.

Brand S (2009). **Crohn's disease: Th1, Th17 or both? The change of a paradigm: new immunological and genetic insights implicate Th17 cells in the pathogenesis of Crohn's disease.** *Gut* 58(8):1152-67.

Brenchley JM, Karandikar NJ, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Crotty LE, Casazza JP, Kuruppu J, Migueles SA, Connors M et al. (2003). **Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8+ T cells.** *Blood* 101: 2711–2720.

Brière JJ, Favier J, El Ghouzzi V, Djouadi F, Bénit P, Gimenez AP, Rustin P (2005). **Succinate dehydrogenase deficiency in human.** *Cell Mol Life Sci* 62(19-20):2317-2324.

Brugarolas J, Chandrasekaran C, Gordon JI, Beach D, Jacks T, Hannon GJ (1995). **Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency.** *Nature* 377(6549):552-7.

Brüstle A, Heink S, Huber M, Rosenplänter C, Stadelmann C, Yu P, Arpaia E, Mak TW, Kamradt T, Lohoff M (2007). **The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4.** *Nat Immunol* 8(9):958-66.

Burgler S, Ouaked N, Bassin C, Basinski TM, Mantel PY, Siegmund K, Meyer N, Akdis CA, Schmidt-Weber CB (2009). **Differentiation and functional analysis of human T(H)17 cells.** *J Allergy Clin Immunol* 123(3):588-95, 595.e1-7.

Buttke TM, Sandstrom PA (1995). **Redox regulation of programmed cell death in lymphocytes.** *FreeRadical Res* 22,389–397.

Cadet J, Bellon S, Berger M, Bourdat AG, Douki T, Duarte V, Frelon S, Gasparutto D, Muller E, Ravanat JL, Sauvaigo S (2002). **Recent aspects of oxidative DNA damage: guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases.** *Biol Chem* 383(6):933-43.

Cadet J, Delatour T, Douki T, Gasparutto D, Pouget JP, Ravanat JL, Sauvaigo S (1999). **Hydroxyl radicals and DNA base damage.** *Mutat Res* 424(1-2):9-21.

Cai H, Harrison DG (2000). **Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress.** *Circ Res* 87(10):840-4.

Calverley PM, Anderson JA, Celli B, Ferguson GT, Jenkins C, Jones PW, Yates JC, Vestbo J (2007). **Salmeterol and fluticasone propionate and survival in chronic obstructive pulmonary disease.** *N Engl J Med* 356:775-789.

Carbonnelle-Puscian A, Copie-Bergman C, Baia M, Martin-Garcia N, Allory Y, Haioun C, Crémades A, Abd-Alsamad I, Farcet JP, Gaulard P, Castellano F, Molinier-Frenkel V (2009). **The novel immunosuppressive enzyme IL4I1 is expressed by neoplastic cells of several B-cell lymphomas and by tumor-associated macrophages.** *Leukemia* 23(5):952-60.

Carnevali S, Petruzzelli S, Longoni B, Vanacore R, Barale R, Cipollini M, Scatena F, Paggiaro P, Celi A, Giuntini C (2003). **Cigarette smoke extract induces oxidative stress and apoptosis in human lung fibroblasts.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284(6):L955-63.

Casagrande S, Bonetto V, Fratelli M, Gianazza E, Eberini I, Massigna T, Salmona M, Chang G, Holmgren A, Ghezzi P (2000). **Glutathiolation of human thioredoxin: a possible crosstalk between the glutathione and thioredoxin systems.** *Cell Mol Biol* 16, 162–170.

Celli B, Decramer M, Kesten S, Liu D, Mehra S, Tashkin DP (2009). **Mortality in the 4-year trial of tiotropium (uplift) in patients with chronic obstructive pulmonary disease.** *Am J Respir Crit Care Med* 180:948-955.

Celli BR, MacNee W (2004). **Standards for the diagnosis and treatment of patients with copd: A summary of the ats/ers position paper.** *Eur Respir J* 23:932-946.

- Ceylan E, Kocyigit A, Gencer M, Aksoy N, Selek S (2006). **Increased DNA damage in patients with chronic obstructive pulmonary disease who had once smoked or been exposed to biomass.** *Respir Med* 100(7):1270-6.
- Chabaud M, Fossiez F, Taupin JL, Miossec P (1998). **Enhancing effect of IL-17 on IL-1-induced IL-6 and leukemia inhibitory factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes and its regulation by Th2 cytokines.** *J Immunol* 161(1):409-14.
- Chainiaux F, Magalhaes JP, Eliaers F, Remacle J, Toussaint O (2002). **UVB-induced premature senescence of human diploid skin fibroblasts.** *Int J Biochem Cell Biol* 34(11):1331-9.
- Chang SH, Dong C (2007). **A novel heterodimeric cytokine consisting of IL-17 and IL-17F regulates inflammatory responses.** *Cell Res* 17(5):435-40.
- Chapman KE, Sinclair SE, Zhuang D, Hassid A, Desai LP, Waters CM (2005). **Cyclic mechanical strain increases reactive oxygen species production in pulmonary epithelial cells.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289(5):L834-41.
- Chatila TA (2005). **Role of regulatory T cells in human diseases.** *J Allergy Clin Immunol* 116(5):949-59 quiz 60.
- Chavan SS, Tian W, Hsueh K, Jawaheer D, Gregersen PK, Chu CC (2002). **Characterization of the human homolog of the IL-4 induced gene-1 (Fig1).** *Biochim Biophys Acta* 1576(1-2):70-80.
- Chen K, Pociask DA, McAleer JP, Chan YR, Alcorn JF, Kreindler JL, Keyser MR, Shapiro SD, Houghton AM, Kolls JK, Zheng M (2011). **IL-17RA is required for CCL2 expression, macrophage recruitment, and emphysema in response to cigarette smoke.** *PLoS One* 6(5):e20333.
- Chen Q, Olashaw N, Wu J (1995). **Participation of reactive oxygen species in the lysophosphatidic acid-stimulated mitogen-activated protein kinase kinase activation pathway.** *J Biol Chem* 270(48):28499-502.
- Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ (2003). **Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III.** *J Biol Chem* 278:36027-36031.
- Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM (2003). **Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3.** *J Exp Med* 198: 1875–1886.
- Cheng G, Ritsick D, Lambeth JD (2004). **Nox3 regulation by NOXO1, p47phox, and p67phox.** *J Biol Chem* 279(33):34250-5.
- Chitnis T, Najafian N, Benou C, Salama AD, Grusby MJ, Sayegh MH, Khoury SJ (2001). **Effect of targeted disruption of STAT4 and STAT6 on the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis.** *J Clin Invest* 108(5):739-47.

Chizzolini C, Chicheportiche R, Alvarez M, de Rham C, Roux-Lombard P, Ferrari-Lacraz S, Dayer JM (2008). **Prostaglandin E2 synergistically with interleukin-23 favors human Th17 expansion.** *Blood* 112(9):3696-703.

Cho HY, Reddy SP, Kleeberger SR (2006). **Nrf2 defends the lung from oxidative stress.** *Antioxid Redox Signal* 8:76-87.

Chowdhury PK, Halder M, Choudhury PK, Kraus GA, Desai MJ, Armstrong DW, Casey TA, Rasmussen MA, Petrich JW (2004). **Generation of fluorescent adducts of malondialdehyde and amino acids: toward an understanding of lipofuscin.** *Photochem Photobiol* 79(1):21-5.

Chu CC, Paul WE (1997). **Fig1, an interleukin 4-induced mouse B cell gene isolated by cDNA representational difference analysis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(6):2507-12.

Chung DR, Kasper DL, Panzo RJ, Chitnis T, Grusby MJ, Sayegh MH, Tzianabos AO (2003). **CD4+ T cells mediate abscess formation in intra-abdominal sepsis by an IL-17-dependent mechanism.** *J Immunol* 170: 1958-63.

Chung Y, Yang X, Chang SH, Ma L, Tian Q, Dong C (2006). **Expression and regulation of IL-22 in the IL-17-producing CD4+ T lymphocytes.** *Cell Res* 16(11):902-7.

Church DF, Pryor WA (1985). **Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications.** *Environ Health Perspect* 64:111-126.

Ciofani M, Madar A, Galan C, Sellars M, Mace K, Pauli F, Agarwal A, Huang W, Parkurst CN, Muratet M, Newberry KM, Meadows S, Greenfield A, Yang Y, Jain P, Kirigin FK, Birchmeier C, Wagner EF, Murphy KM, Myers RM, Bonneau R, Littman DR (2012). **A validated regulatory network for Th17 cell specification.** *Cell* 151(2):289-303.

Clunes LA, Bridges A, Alexis N, Tarran R (2008). **In vivo versus in vitro airway surface liquid nicotine levels following cigarette smoke exposure.** *J Anal Toxicol* 32(3):201-7.

Codarri L, Gyölvézi G, Tosevski V, Hesske L, Fontana A, Magnenat L, Suter T, Becher B (2011). **ROR γ t drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation.** *Nat Immunol* 12, 560–567.

Collado M, Blasco MA, Serrano M (2007). **Cellular senescence in cancer and aging.** *Cell* 130:223-233.

Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, Cross R, Sehy D, Blumberg RS, Vignali DA (2007). **The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function.** *Nature* 450(7169):566-9.

Copie-Bergman C, Boulland ML, Dehouille C, Möller P, Farcet JP, Dyer MJ, Haioun C, Roméo PH, Gaulard P, Leroy K (2003). **Interleukin 4-induced gene 1 is activated in primary mediastinal large B-cell lymphoma.** *Blood* 101(7):2756-61.

Coppé JP, Patil CK, Rodier F, Krtolica A, Beauséjour CM, Parrinello S, Hodgson JG, Chin K, Desprez PY, Campisi J (2010). **A human-like senescence-associated secretory phenotype is conserved in mouse cells dependent on physiological oxygen.** *PLoS One* 5(2):e9188.

Coppé JP, Patil CK, Rodier F, Sun Y, Muñoz DP, Goldstein J, Nelson PS, Desprez PY, Campisi J (2008). **Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor.** *PLoS Biol* 6(12):2853-68.

Cosmi L, De Palma R, Santarlasci V, Maggi L, Capone M, Frosali F, Rodolico G, Querci V, Abbate G, Angeli R et al. (2008). **Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor.** *J Exp Med* 205, 1903–1916.

Cosmi L, Maggi L, Santarlasci V, Capone M, Cardilicchia E, Frosali F, Querci V, Angeli R, Matucci A, Fambrini M et al. (2010). **Identification of a novel subset of human circulating memory CD4(+) T cells that produce both IL-17A and IL-4.** *J Allergy Clin Immunol* 125, 222–230.

Counts ME, Morton MJ, Laffoon SW, Cox RH, Lipowicz PJ (2005). **Smoke composition and predicting relationships for international commercial cigarettes smoked with three machine-smoking conditions.** *Regul Toxicol Pharmacol* 41(3):185-227.

Covey MV, Murphy MP, Hobbs CE, Smith RA, Oorschot DE (2006). **Effect of the mitochondrial antioxidant, Mito Vitamin E, on hypoxic ischemic striatal injury in neonatal rats: a dose-response and stereological study.** *Exp Neurol* 199(2):513-9.

Crome SQ, Wang AY, Kang CY, Levings MK (2009). **The role of retinoic acid-related orphan receptor variant 2 and IL-17 in the development and function of human CD4+ T cells.** *Eur J Immunol* 39, 1480–1493.

Csiszar A, Smith KE, Koller A, Kaley G, Edwards JG, Ungvari Z (2005). **Regulation of bone morphogenetic protein-2 expression in endothelial cells: role of nuclear factor-kappaB activation by tumor necrosis factor-alpha, H2O2, and high intravascular pressure.** *Circulation* 111(18):2364-72.

Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, Lucian L, To W, Kwan S, Churakova T et al. (2003). **Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain.** *Nature* 421: 744-8.

Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Evdemon-Hogan M, Conejo-Garcia JR, Zhang L, Burow M (2004). **Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival.** *Nat Med* 10(9):942-9.

Czernin J, Sun K, Brunken R, Böttcher M, Phelps M, Schelbert H (1995). **Effect of acute and long-term smoking on myocardial blood flow and flow reserve.** *Circulation* 91(12):2891-7.

d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, Von Zglinicki T, Saretzki G, Carter NP, Jackson SP (2003). **A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence.** *Nature* 426, 194-8.

Dagouassat M, Gagliolo JM, Chrusciel S, Bourin MC, Duprez C, Caramelle P, Boyer L, Hue S, Stern JB, Validire P, Longrois D, Norel X, Dubois-Randé JL, Le Gouvello S, Adnot S, Boczkowski J (2013). **The cyclooxygenase-2-prostaglandin E2 pathway maintains senescence of chronic obstructive pulmonary disease fibroblasts.** *Am J Respir Crit Care Med* 187(7):703-14.

Damiano VV, Tsang A, Kucich U, Abrams WR, Rosenbloom J, Kimbel P, Fallahnejad M, Weinbaum G (1986). **Immunolocalization of elastase in human emphysematous lungs.** *J Clin Invest* 78:482-493.

Darrasse-Jèze G, Marodon G, Salomon BL, Catala M, Klatzmann D (2005). **Ontogeny of CD4+CD25+ regulatory/suppressor T cells in human fetuses.** *Blood* 105(12):4715-4721.

Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen JF, Enjyoji K, Linden J, Oukka M, Kuchroo VK, Strom TB, Robson SC (2007). **Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression.** *J Exp Med* 204(6):1257-65.

Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ (1997). **Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation.** *Biochem J* 324: 1R18.

Dekhuijzen PN (2004). **Antioxidant properties of n-acetylcysteine: Their relevance in relation to chronic obstructive pulmonary disease.** *Eur Respir J* 23:629-636.

Dekhuijzen PN, Aben KK, Dekker I, Aarts LP, Wielders PL, van Herwaarden CL, Bast A (1996). **Increased exhalation of hydrogen peroxide in patients with stable and unstable chronic obstructive pulmonary disease.** *Am J Respir Crit Care Med* 154(3 Pt 1):813-6.

Del Prete GF, De Carli M, Mastromauro C, Biagiotti R, Macchia D, Falagiani P, Ricci M, Romagnani S (1991). **Purified protein derivative of mycobacterium tuberculosis and excretory-secretory antigen(s) of *Toxocara canis* expand in vitro human T cells with stable and opposite (type 1 T helper or type 2 T helper) profile of cytokine production.** *J Clin Invest* 88: 346–350.

Demoor T, Bracke KR, Dupont LL, Plantinga M, Bondue B, Roy MO, Lannoy V, Lambrecht BN, Brusselle GG, Joos GF (2011). **The role of ChemR23 in the induction and resolution of cigarette smoke-induced inflammation.** *J Immunol* 186(9):5457-67.

Deng C, Zhang P, Harper JW, Elledge SJ, Leder P (1995). **Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control.** *Cell* 82(4):675-84.

Deslee G, Woods JC, Moore C, Conradi SH, Gierada DS, Atkinson JJ, Battaile JT, Liu L, Patterson GA, Adair-Kirk TL, et al. (2009). **Oxidative damage to nucleic acids in severe emphysema.** *Chest* 135:965-974.

Devadas S, Zaritskaya L, Rhee SG, Oberley L, Williams MS (2002). **Discrete generation of superoxide and hydrogen peroxide by T cell receptor stimulation: selective regulation of**

mitogenactivated protein kinase activation and fas ligand expression. *J Exp Med* 195:59–70.

Devin A, Rigoulet M (2007). **Mechanisms of mitochondrial response to variations in energy demand in eukaryotic cells.** *Am J Physiol Cell Physiol* 292(1): C52-58.

Devling TW, Lindsay CD, McLellan LI, McMahan M, Hayes JD (2005). **Utility of siRNA against Keap1 as a strategy to stimulate a cancer chemopreventive phenotype.** *Proc Natl Acad Sci USA* 102:7280-5.

Dhanasekaran A, Kotamraju S, Karunakaran C, Kalivendi SV, Thomas S, Joseph J, Kalyanaraman B (2005). **Mitochondria superoxide dismutase mimetic inhibits peroxide-induced oxidative damage and apoptosis: role of mitochondrial superoxide.** *Free Radic Biol Med* 39(5):567-83.

Di Leonardo A, Linke SP, Clarkin K, Wahl GM (1994). **DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts.** *Genes Dev* 8:2540–2551.

Di Mitri D, Azevedo RI, Henson SM, Libri V, Riddell NE, Macaulay R, Kipling D, Soares MV, Battistini L, Akbar AN (2011). **Reversible senescence in human CD4+CD45RA+CD27- memory T cells.** *J Immunol* 187(5):2093-100.

Di Stefano A, Caramori G, Gnemmi I, Contoli M, Vicari C, Capelli A, Magno F, D'Anna SE, Zanini A, Brun P, Casolari P, Chung KF, Barnes PJ, Papi A, Adcock I, Balbi B (2009). **T helper type 17-related cytokine expression is increased in the bronchial mucosa of stable chronic obstructive pulmonary disease patients.** *Clin Exp Immunol* 157(2):316-24.

Dietrich M, Block G, Benowitz NL, Morrow JD, Hudes M, Jacob P 3rd, Norkus EP, Packer L (2003). **Vitamin C supplementation decreases oxidative stress biomarker f2-isoprostanes in plasma of nonsmokers exposed to environmental tobacco smoke.** *Nutr Cancer* 45(2):176-84.

Dikalov S, Griendling KK, Harrison DG (2007). **Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies.** *Hypertension* 49(4):717-27.

Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, et al. (1995). **A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9363-7.

Doe C, Bafadhel M, Siddiqui S, Desai D, Mistry V, Rugman P, McCormick M, Woods J, May R, Sleeman MA, Anderson IK, Brightling CE (2010). **Expression of the T helper 17-associated cytokines IL-17A and IL-17F in asthma and COPD.** *Chest* 138(5):1140-7.

Dong C (2008). **TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming.** *Nat Rev Immunol* 8(5):337-48.

Dragon S, Rahman MS, Yang J, Unruh H, Halayko AJ, Gounni AS (2007). **IL-17 enhances IL-1beta mediated CXCL-8 release from human airway smooth muscle cells.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292:L1023-9.

Drané P, Alvarez S, Meiller A, May E (2002). **L'activation de la protéine p53, un événement déterminant de la réponse cellulaire aux radiations ionisantes.** *Médecine nucléaire* 26, 139-147.

Dröge W (2002). **Free radicals in the physiological control of cell function.** *Physiol Rev* 82(1):47-95.

Drost EM, Skwarski KM, Sauleda J, Soler N, Roca J, Agusti A, MacNee W (2005). **Oxidative stress and airway inflammation in severe exacerbations of COPD.** *Thorax* 60(4):293-300.

Duan J, Duan J, Zhang Z, Tong T (2005). **Irreversible cellular senescence induced by prolonged exposure to H₂O₂ involves DNA-damage-and-repair genes and telomere shortening.** *Int J Biochem Cell Biol* 37(7): 1407-1420.

Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, Steinhart AH, Abraham C, Regueiro M, Griffiths A, Dassopoulos T, Bitton A, Yang H, Targan S, Datta LW, Kistner EO, Schumm LP, Lee AT, Gregersen PK, Barnada MM, Rotter JI, Nicolae DL, Cho JH (2006). **A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene.** *Science* 314(5804):1461-3.

Dulić V, Kaufmann WK, Wilson SJ, Tlsty TD, Lees E, Harper JW, Elledge SJ, Reed SI (1994). **p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G₁ arrest.** *Cell* 76, 1013-23.

Durant L, Watford WT, Ramos HL, Laurence A, Vahedi G, Wei L, Takahashi H, Sun HW, Kanno Y, Powrie F et al. (2010). **Diverse targets of the transcription factor STAT3 contribute to T cell pathogenicity and homeostasis.** *Immunity* 32, 605–615.

Durzan DJ, Pedrosa MC (2002). **Nitric oxide and reactive nitrogen oxide species in plants.** *Biotechnol Genet Eng Rev* 19:293-337.

Echtay KS, Roussel D, St-Pierre J, Jekabsons MB, Cadenas S, Stuart JA, Harper JA, Roebuck SJ, Morrison A, Pickering S et al. (2002). **Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins.** *Nature* 415(6867): 96-99.

Efimova O, Szankasi P, Kelley TW (2011). **Ncf1 (p47phox) is essential for direct regulatory T cell mediated suppression of CD4⁺ effector T cells.** *PLoS One* 6(1):e16013.

Eidelman D, Saetta MP, Ghezzi H, Wang NS, Hoidal JR, King M, Cosio MG (1990). **Cellularity of the alveolar walls in smokers and its relation to alveolar destruction. Functional implications.** *Am Rev Respir Dis* 141:1547-1552.

Eisner MD, Anthonisen N, Coultas D, Kuenzli N, Perez-Padilla R, Postma D, Romieu I, Silverman EK, Balmes JR (2010). **An official american thoracic society public policy statement: Novel risk factors and the global burden of chronic obstructive pulmonary disease.** *Am J Respir Crit Care Med* 182:693-718.

El-Behi M, Ciric B, Dai H, Yan Y, Cullimore M, Safavi F, Zhang GX, Dittel BN, Rostami A (2011). **The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF.** *Nat Immunol* 12, 568–575.

Esposti MD, Hatzinisiriou I, McLennan H, Ralph S (1999). **Bcl-2 and mitochondrial oxygen radicals. New approaches with reactive oxygen species-sensitive probes.** *J Biol Chem* 274:29831–29837.

Ewen ME, Sluss HK, Sherr CJ, Matsushime H, Kato J, Livingston DM (1993). **Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins.** *Cell* 73(3):487-97.

Eyerich S, Eyerich K, Pennino D, Carbone T, Nasorri F, Pallotta S, Cianfarani F, Odorisio T, Traidl-Hoffmann C, Behrendt H (2009). **Th22 represent a distinct subset of human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling.** *J Clin Invest* 119, 3573–3585.

Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, Orabona C, Vacca C, Bianchi R, Belladonna ML, Fioretti MC, Alegre ML, Puccetti P (2003). **Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells.** *Nat Immunol* 4(12):1206-12.

Favier A (2003). **Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique.** *L'Actualité chimique* N° 269-270, 108-115.

Ferber IA, Brocke S, Taylor-Edwards C, Ridgway W, Dinisco C, Steinman L, Dalton D, Fathman CG (1996). **Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE).** *J Immunol* 156(1):5-7.

Finkelstein R, Fraser RS, Ghezzi H, Cosio MG (1995). **Alveolar inflammation and its relation to emphysema in smokers.** *Am J Respir Crit Care Med* 152:1666-1672.

Fleury C, Neverova M, Collins S, Raimbault S, Champigny O, Levi-Meyrueis C, Bouillaud F, Seldin MF, Surwit RS, Ricquier D, Warden CH (1997). **Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia.** *Nat Genet* 15(3): 269-272.

Flora SJ, Mittal M, Mehta A (2008). **Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy.** *Indian J Med Res* 128(4):501-23.

Foronjy RF, Mirochnitchenko O, Propokenko O, Lemaitre V, Jia Y, Inouye M, Okada Y, D'Armiento JM (2006). **Superoxide dismutase expression attenuates cigarette smoke- or elastase-generated emphysema in mice.** *Am J Respir Crit Care Med* 173:623-631.

Fraley AE, Tsimikas S (2006). **Clinical applications of circulating oxidized low-density lipoprotein biomarkers in cardiovascular disease.** *Curr Opin Lipidol* 17(5):502-9.

Frejaville C, Karoui H, Tuccio B, Le Moigne F, Culcasi M, Pietri S, Lauricella R, Tordo P (1995). **5-(Diethoxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline N-oxide: a new efficient phosphorylated nitron for the in vitro and in vivo spin trapping of oxygen-centered radicals.** *J Med Chem* 38(2):258-65.

Fridovich I (1995). **Superoxide radical and superoxide dismutases.** *Annu Rev Biochem* 64:97-112.

Furukawa A, Tada-Oikawa S, Kawanishi S, Oikawa S (2007). **H₂O₂ accelerates cellular senescence by accumulation of acetylated p53 via decrease in the function of SIRT1 by NAD⁺ depletion.** *Cell Physiol Biochem* 20(1-4):45-54.

Gabert J, Langlet C, Zamoyska R, Parnes JR, Schmitt-Verhulst AM, Malissen B (1987). **Reconstitution of the MHC class I specificity by transfer of the Tcell receptor and Lyt-2 genes.** *Cell* 50:545.

Gairola C, Aleem MI (1973). **Cigarette smoke: effect of aqueous and nonaqueous fractions on mitochondrial function.** *Nature* 241(5387):287-8.

Gambineri E, Torgerson TR, Ochs HD (2003). **Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis.** *Curr Opin Rheumatol* 15(4):430-5.

Game DS, Hernandez-Fuentes MP, Lechler RI (2005). **Everolimus and basiliximab permit suppression by human CD4⁺CD25⁺ cells in vitro.** *Am J Transplant* 5(3):454-64.

Ganther HE (1999). **Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase.** *Carcinogenesis* 20(9):1657-66.

Garcia KC, Teyton L, Wilson IA (1999). **Structural basis of T cell recognition.** *Annu Rev Immunol* 17, 369–397.

Garín MI, Chu CC, Golshayan D, Cernuda-Morollón E, Wait R, Lechler RI (2007). **Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4⁺CD25⁺ T cells.** *Blood* 109(5):2058- 65.

Gaweska H, Fitzpatrick PF (2011). **Structures and Mechanism of the Monoamine Oxidase Family.** *Biomol Concepts* 2(5):365-377.

Geiszt M, Lekstrom K, Leto TL (2004). **Analysis of mRNA transcripts from the NAD(P)H oxidase 1 (Nox1) gene. Evidence against production of the NADPH oxidase homolog-1 short (NOH-1S) transcript variant.** *J Biol Chem* 279(49):51661-8.

Gergely P Jr, Niland B, Gonchoroff N, Pullmann R Jr, Phillips PE, Perl A (2002). **Persistent mitochondrial hyperpolarization, increased reactive oxygen intermediate production, and cytoplasmic alkalinization characterize altered IL-10 signaling in patients with systemic lupus erythematosus.** *J Immunol* 169:1092– 1101.

Geri G, Terrier B, Rosenzweig M, Wechsler B, Touzot M, Seilhean D, Tran TA, Bodaghi B, Musset L, Soumelis V et al. (2011). **Critical role of IL-21 in modulating TH17 and regulatory T cells in Behc_et disease.** *J Allergy Clin Immunol* 128, 655–664.

Gershon RK, Cohen P, Hencin R, Liebhaver SA (1972). **Suppressor T cells.** *J Immunol* 108(3):586-90.

- Gill T, Levine AD (2013). **Mitochondria-derived Hydrogen Peroxide Selectively Enhances T Cell Receptor-initiated Signal Transduction.** *J Biol Chem.*
- Gloire G, Legrand-Poels S, Piette J (2006). **NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later.** *Biochem Pharmacol* 72:1493-1505.
- Godfrey WR, Ge YG, Spoden DJ, Levine BL, June CH, Blazar BR, Porter SB (2004). **In vitro-expanded human CD4(+)CD25(+) T-regulatory cells can markedly inhibit allogeneic dendritic cell-stimulated MLR cultures.** *Blood* 104(2):453-61.
- Goldstein S (1990). **Replicative senescence: the human fibroblast comes of age.** *Science* 249(4973):1129-33.
- Goven D, Boutten A, Lecon-Malas V, Marchal-Somme J, Amara N, Crestani B, Fournier M, Leseche G, Soler P, Boczkowski J, et al. (2008). **Altered nrf2/keap1-bach1 equilibrium in pulmonary emphysema.** *Thorax* 63:916-924.
- Gran B, Zhang GX, Yu S, Li J, Chen XH, Ventura ES, Kamoun M, Rostami A (2002). **IL-12p35-deficient mice are susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis: evidence for redundancy in the IL-12 system in the induction of central nervous system autoimmune demyelination.** *J Immunol* 169(12):7104-10.
- Greider CW, Blackburn EH (1985). **Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts.** *Cell* 43(2 Pt 1):405-13.
- Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M (2000). **NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease.** *Circ Res* 86:494-501.
- Griffith OW, Mulcahy RT (1999). **The enzymes of glutathione synthesis: gamma-glutamylcysteine synthetase.** *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 73, 209-267.
- Grimsrud PA, Picklo MJ Sr, Griffin TJ, Bernlohr DA (2007). **Carbonylation of adipose proteins in obesity and insulin resistance: identification of adipocyte fatty acid-binding protein as a cellular target of 4-hydroxynonenal.** *Mol Cell Proteomics* 6(4):624-37.
- Groemping Y, Rittinger K (2005). **Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective.** *Biochem J* 386(Pt 3):401-16.
- Grohmann U, Orabona C, Fallarino F, Vacca C, Calcinaro F, Falorni A, Candeloro P, Belladonna ML, Bianchi R, Fioretti MC, Puccetti P (2002). **CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo.** *Nat Immunol* 3(11):1097-101.
- Gross P, Pfitzer EA, Tolker E, Babyak MA, Kaschak M (1965). **Experimental emphysema: Its production with papain in normal and silicotic rats.** *Arch Environ Health* 11:50-58.
- Grossman WJ, Verbsky JW, Barchet W, Colonna M, Atkinson JP, Ley TJ (2004). **Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death.** *Immunity* 21(4):589-601.

Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG (1997). **A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T cell responses and prevents colitis.** *Nature* 389(6652):737-42.

Guatura SB, Martinez JA, Santos Bueno PC, Santos ML (2000). **Increased exhalation of hydrogen peroxide in healthy subjects following cigarette consumption.** *Sao Paulo Med J* 118(4):93-8.

Guillot-Delost M, Le Gouvello S, Mesel-Lemoine M, Cherai M, Baillou C, Simon A, Levy Y, Weiss L, Louafi S, Chaput N, Berrehar F, Kerbrat S, Klatzmann D, Lemoine FM (2012). **Human CD90 identifies Th17/Tc17 T cell subsets that are depleted in HIV-infected patients.** *J Immunol* 188(3):981-91.

Gump J, Stokoe D, McCormick F (2003). **Phosphorylation of p16INK4A correlates with Cdk4 association.** *J Biol Chem* 278(9):6619-22.

Haddad JJ, Olver RE, Land SC (2000). **Antioxidant/pro-oxidant equilibrium regulates HIF-1 α and NF- κ B redox sensitivity. Evidence for inhibition by glutathione oxidation in alveolar epithelial cells.** *J Biol Chem* 275, 21130–21139.

Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS, Beijersbergen RL, Brooks MW, Weinberg RA (1999). **Creation of human tumour cells with defined genetic elements.** *Nature* 400(6743):464-8.

Halliwell B, Cross CE (1994). **Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress.** *Environ Health Perspect* 102 Suppl 10:5-12.

Halliwell B, Gutteridge JMC (1999). **Free Radicals in Biology and Medicine.** 3rd ed Oxford Univ Press Oxford.

Happel KI, Dubin PJ, Zheng M, Ghilardi N, Lockhart C, Quinton LJ, Odden AR, Shellito JE, Bagby GJ, Nelson S, Kolls JK (2005). **Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against *Klebsiella pneumoniae*.** *J Exp Med* 202(6):761-9.

Hara E, Smith R, Parry D, Tahara H, Stone S, Peters G (1996). **Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence.** *Mol Cell Biol* 16(3):859-67.

Hara E, Tsurui H, Shinozaki A, Nakada S, Oda K (1991). **Cooperative effect of antisense-Rb and antisense-p53 oligomers on the extension of life span in human diploid fibroblasts, TIG-1.** *Biochem Biophys Res Commun* 179(1):528-34.

Hara H, Araya J, Ito S, Kobayashi K, Takasaka N, Yoshii Y, Wakui H, Kojima J, Shimizu K, Numata T, Kawaishi M, Kamiya N, Odaka M, Morikawa T, Kaneko Y, Nakayama K, Kuwano K (2013). **Mitochondrial fragmentation in cigarette smoke induced-bronchial epithelial cell senescence.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*.

Hardy J, Selkoe DJ (2002). **The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics.** *Science* 298(5595):962-4.

- Harju T, Kaarteenaho-Wiik R, Sirvio R, Paakko P, Crapo JD, Oury TD, Soini Y, Kinnula VL (2004). **Manganese superoxide dismutase is increased in the airways of smokers' lungs.** *Eur Respir J* 24:765-771.
- Harlin H, Hanson M, Johansson CC, Sakurai D, Poschke I, Norell H, Malmberg KJ, Kiessling R (2007). **The CD16- CD56(bright) NK cell subset is resistant to reactive oxygen species produced by activated granulocytes and has higher antioxidative capacity than the CD16+ CD56(dim) subset.** *J Immunol* 179(7):4513-9.
- Harman D (1998). **Aging: phenomena and theories.** *Ann N Y Acad Sci* 854:1-7.
- Harper JW, Elledge SJ, Keyomarsi K, Dynlacht B, Tsai LH, Zhang P, Dobrowolski S, Bai C, Connell-Crowley L, Swindell E, et al. (1995). **Inhibition of cyclindependent kinases by p21.** *Mol Biol Cell* 6, 387-400.
- Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT (2005). **Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages.** *Nat Immunol* 6(11):1123-32.
- Harrison OJ, Foley J, Bolognese BJ, Long E 3rd, Podolin PL, Walsh PT (2008). **Airway infiltration of CD4+ CCR6+ Th17 type cells associated with chronic cigarette smoke induced airspace enlargement.** *Immunol Lett* 121, 13–21.
- Hartwell LH, Weinert TA (1989). **Checkpoints:controls that ensure the order of cell cycle events.** *Science* 246:629 –634.
- Hautamaki RD, Kobayashi DK, Senior RM, Shapiro SD (1997). **Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice.** *Science* 277:2002-2004.
- Hayflick L (1961). **The establishment of a line (WISH) of human amnion cells in continuous cultivation.** *Exp Cell Res* 23:14-20.
- Heitzer T, Just H, Münzel T (1996). **Antioxidant vitamin C improves endothelial dysfunction in chronic smokers.** *Circulation* 94(1):6-9.
- Helbock HJ, Beckman KB, Ames BN (1999). **8-Hydroxydeoxyguanosine and 8-hydroxyguanine as biomarkers of oxidative DNA damage.** *Methods Enzymol* 300:156-66.
- Herbig U, Jobling WA, Chen BP, Chen DJ, Sedivy JM (2004). **Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a).** *Mol Cell Biol* 14(4):501-13.
- Hernandez CP, Morrow K, Velasco C, Wyczechowska DD, Naura AS, Rodriguez PC (2013). **Effects of cigarette smoke extract on primary activated T cells.** *Cell Immunol* 282(1):38-43.
- Herrero A, Barja G (1997). **ADP-regulation of mitochondrial free radical production is different with complex I- or complex II-linked substrates: implications for the exercise paradox and brain hypermetabolism.** *J Bioenerg Biomembr* 29(3):241-9.

- Hirahara K, Ghoreschi K, Laurence A, Yang XP, Kanno Y, O'Shea JJ (2010). **Signal transduction pathways and transcriptional regulation in Th17 cell differentiation.** *Cytokine Growth Factor Rev* 21(6):425-34.
- Hirai H, Roussel MF, Kato JY, Ashmun RA, Sherr CJ (1995). **Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6.** *Mol Cell Biol* 15, 2672-81.
- Hiroaki H, Umetsu Y, Nabeshima Y, Hoshi M, Kohda D (2011). **A simplified recipe for assigning amide NMR signals using combinatorial 14N amino acid inverse-labeling.** *J Struct Funct Genomics* 12(3):167-74.
- Hirota K, Hashimoto M, Yoshitomi H, Tanaka S, Nomura T, Yamaguchi T, Iwakura Y, Sakaguchi N, Sakaguchi S (2007). **T cell self-reactivity forms a cytokine milieu for spontaneous development of IL-17+ Th cells that cause autoimmune arthritis.** *J Exp Med* 204: 41–47.
- Hirota K, Yoshitomi H, Hashimoto M, Maeda S, Teradaira S, Sugimoto N, Yamaguchi T, Nomura T, Ito H, Nakamura T et al. (2007). **Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model.** *J Exp Med* 204, 2803–2812.
- Hobson J, Wright J, Churg A (1991). **Histochemical evidence for generation of active oxygen species on the apical surface of cigarette-smoke-exposed tracheal explants.** *Am J Pathol* 139(3):573-80.
- Hodge G, Mukaro V, Reynolds PN, Hodge S (2011). **Role of increased CD8/CD28(null) T cells and alternative co-stimulatory molecules in chronic obstructive pulmonary disease.** *Clin Exp Immunol* 166(1):94-102.
- Hoffmann D, Djordjevic MV, Hoffmann I (1997). **The changing cigarette.** *Prev Med* 26(4):427-34.
- Hori S, Nomura T, Sakaguchi S (2003). **Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3.** *Science* 299(5609):1057-61.
- Horikoshi T, Balin AK, Carter DM (1991). **Effects of oxygen tension on the growth and pigmentation of normal human melanocytes.** *J Invest Dermatol* 96(6):841-4.
- Hou J, Sun Y, Hao Y, Zhuo J, Liu X, Bai P, Han J, Zheng X, Zeng H (2013). **Imbalance between subpopulations of regulatory T cells in COPD.** *Thorax*.
- Houben JM, Mercken EM, Ketelslegers HB, Bast A, Wouters EF, Hageman GJ, Schols AM (2009). **Telomere shortening in chronic obstructive pulmonary disease.** *Respir Med* 103(2):230-6.
- Huang W, Na L, Fidel PL, Schwarzenberger P (2004). **Requirement of interleukin-17A for systemic anti-Candida albicans host defense in mice.** *J Infect Dis* 190: 624-31.

- Hubbard RC, Ogushi F, Fells GA, Cantin AM, Jallat S, Courtney M, Crystal RG (1987). **Oxidants spontaneously released by alveolar macrophages of cigarette smokers can inactivate the active site of alpha 1-antitrypsin, rendering it ineffective as an inhibitor of neutrophil elastase.** *J Clin Invest* 80:1289-1295.
- Hulbert AJ (2005). **On the importance of fatty acid composition of membranes for aging.** *J Theor Biol* 234, 277–288.
- Hutter E, Renner K, Pfister G, Stöckl P, Jansen-Dürr P, Gnaiger E (2004). **Senescence-associated changes in respiration and oxidative phosphorylation in primary human fibroblasts.** *Biochem J* 380, 919–928.
- Ichinose M, Sugiura H, Yamagata S, Koarai A, Shirato K (2000). **Increase in reactive nitrogen species production in chronic obstructive pulmonary disease airways.** *Am J Respir Crit Care Med* 162(2 Pt 1):701-6.
- Iizuka T, Ishii Y, Itoh K, Kiwamoto T, Kimura T, Matsuno Y, Morishima Y, Hegab AE, Homma S, Nomura A, Sakamoto T, Shimura M, Yoshida A, Yamamoto M, Sekizawa K (2005). **Nrf2-deficient mice are highly susceptible to cigarette smoke-induced emphysema.** *Genes Cells* 10(12):1113-25.
- Imai K, Mercer BA, Schulman LL, Sonett JR, D'Armiento JM (2005). **Correlation of lung surface area to apoptosis and proliferation in human emphysema.** *Eur Respir J* 25:250-258.
- Infante-Duarte C, Horton HF, Byrne MC, Kamradt T (2000). **Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells.** *J Immunol* 165:6107-15.
- Isajevs S, Taivans I, Strazda G, Kopeika U, Bukovskis M, Gordjusina V, Kratovska A (2009). **Decreased FOXP3 expression in small airways of smokers with COPD.** *Eur Respir J* 33(1):61-7. doi: 10.1183/09031936.00145307.
- Ishii Y, Itoh K, Morishima Y, Kimura T, Kiwamoto T, Iizuka T, Hegab AE, Hosoya T, Nomura A, Sakamoto T, Yamamoto M, Sekizawa K (2005). **Transcription factor Nrf2 plays a pivotal role in protection against elastase-induced pulmonary inflammation and emphysema.** *J Immunol* 175(10):6968-75.
- Ishizu T, Osoegawa M, Mei FJ, Kikuchi H, Tanaka M, Takakura Y, Minohara M, Murai H, Mihara F, Taniwaki T, Kira J (2005). **Intrathecal activation of the IL-17/IL-8 axis in opticospinal multiple sclerosis.** *Brain* 128(Pt 5):988-1002.
- Ito K, Hirao A, Arai F, Takubo K, Matsuoka S, Miyamoto K, Ohmura M, Naka K, Hosokawa K, Ikeda Y, Suda T (2006). **Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells.** *Nat Med* 12(4):446-51.
- Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR (2006). **The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells.** *Cell* 126(6):1121-33.

Iwasa H, Han J, Ishikawa F (2003). **Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signalling pathway.** *Genes Cells* 8(2):131-44.

Jabbur JR, Huang P, Zhang W (2000). **DNA damage-induced phosphorylation of p53 at serine 20 correlates with p21 and Mdm-2 induction in vivo.** *Oncogene* 19(54):6203-8.

Jabůrek M, Varecha M, Gimeno RE, Dembski M, Jezek P, Zhang M, Burn P, Tartaglia LA, Garlid KD (1999). **Transport function and regulation of mitochondrial uncoupling proteins 2 and 3.** *J Biol Chem* 274(37): 26003-26007.

Jackson SH, Devadas S, Kwon J, Pinto LA, Williams MS (2004). **T cells express a phagocyte-type NADPH oxidase which is activated upon TcR stimulation.** *Nat Immunol* (in press).

Jaimes EA, DeMaster EG, Tian RX, Raji L (2004). **Stable compounds of cigarette smoke induce endothelial superoxide anion production via NADPH oxidase activation.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24(6):1031-6.

Jakobs, S (2006). **High resolution imaging of live mitochondria.** *Biochim Biophys Acta* 1763(5-6): 561-575.

Jenkins NC, Liu T, Cassidy P, Leachman SA, Boucher KM, Goodson AG, Samadashwily G, Grossman D (2011). **The p16(INK4A) tumor suppressor regulates cellular oxidative stress.** *Oncogene* 30(3):265-74.

Jia L, Liu Z, Sun L, Miller SS, Ames BN, Cotman CW, Liu J (2007). **Acrolein, a toxicant in cigarette smoke, causes oxidative damage and mitochondrial dysfunction in RPE cells: protection by (R)-alpha-lipoic acid.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48(1):339-48.

Josse C, Legrand-Poels S, Piret B, Sluse F, Piette J (1998). **Impairment of the mitochondrial electron chain transport prevents NF-kappa B activation by hydrogen peroxide.** *Free Radic Biol Med* 25(1):104-12.

Kadenbach, B (2003). **Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation.** *Biochim Biophys Acta* 1604(2): 77-94.

Kamal-Eldin A, Appelqvist LA (1996). **The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols.** *Lipids* 31(7):671-701.

Kaminski M, Kiessling M, Süß D, Krammer PH, Gülow K (2007). **Novel role for mitochondria: protein kinase C-dependent oxidative signaling organelles in activation-induced T-cell death.** *Mol Cell Biol* 27(10):3625-39.

Kamiński MM, Röth D, Sass S, Sauer SW, Krammer PH, Gülow K (2012). **Manganese superoxide dismutase: a regulator of T cell activation-induced oxidative signaling and cell death.** *Biochim Biophys Acta* 1823(5):1041-52.

Kaminski MM, Sauer SW, Klemke CD, Süß D, Okun JG, Krammer PH, Gülow K (2010). **Mitochondrial reactive oxygen species control T cell activation by regulating IL-2 and**

IL-4 expression: mechanism of ciprofloxacin-mediated immunosuppression. *J Immunol* 184(9):4827-41.

Kanazawa H, Shiraishi S, Hirata K, Yoshikawa J (2003). **Imbalance between levels of nitrogen oxides and peroxynitrite inhibitory activity in chronic obstructive pulmonary disease.** *Thorax* 58(2):106-9.

Karlsson M, Kurz T, Brunk UT, Nilsson SE, Frennesson CI (2010). **What does the commonly used DCF test for oxidative stress really show?** *Biochem J* 428(2):183-90.

Kasahara Y, Tuder RM, Taraseviciene-Stewart L, Le Cras TD, Abman S, Hirth PK, Waltenberger J, Voelkel NF (2000). **Inhibition of vegf receptors causes lung cell apoptosis and emphysema.** *J Clin Invest* 106:1311-1319.

Khader SA, Bell GK, Pearl JE, Fountain JJ, Rangel-Moreno J, Cilley GE, Shen F, Eaton SM, Gaffen SL, Swain SL (2007). **IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis challenge.** *Nat Immunol* 8:369-77.

Kharitonov SA, Barnes PJ (2001). **Exhaled markers of inflammation.** *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 1(3):217-24.

Kikly K, Liu L, Na S, Sedgwick JD (2006). **The IL-23/Th17 axis: therapeutic targets for autoimmune inflammation.** *Curr Opin Immunol* 18: 670– 675.

Kim C, Kim JY, Kim JH (2008). **Cytosolic phospholipase A(2), lipoxygenase metabolites, and reactive oxygen species.** *BMB Rep* 41(8):555-9.

Kim HS, Kang SW, Rhee SG, Clerch LB (2001). **Rat lung peroxiredoxins I and II are differentially regulated during development and by hyperoxia.** *Am J Physiol* 280: L1212-L1217.

Kim JS, Sklarz T, Banks LB, Gohil M, Waickman AT, Skuli N, Krock BL, Luo CT, Hu W, Pollizzi KN, Li MO, Rathmell JC, Birnbaum MJ, Powell JD, Jordan MS, Koretzky GA (2013). **Natural and inducible TH17 cells are regulated differently by Akt and mTOR pathways.** *Nat Immunol* 14(6):611-8.

Kim WY, Sharpless NE (2006). **The regulation of INK4/ARF in cancer and aging.** *Cell* 127(2):265-75.

Kimura A, Naka T, Kishimoto T (2007). **IL-6-dependent and -independent pathways in the development of interleukin 17-producing T helper cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(29):12099-104.

Kingsley CI, Karim M, Bushell AR, Wood KJ (2002). **CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses.** *J Immunol* 168(3):1080-6.

Kinoshita T, Hoshino T, Imaoka H, Ichiki H, Okamoto M, Kawayama T, Yodoi J, Kato S, Aizawa H (2007). **Thioredoxin prevents the development and progression of elastase-induced emphysema.** *Biochem Biophys Res Commun* 354(3):712-9.

Kirkham BW, Lassere MN, Edmonds JP, Juhasz KM, Bird PA, Lee CS, Shnier R, Portek IJ (2006). **Synovial membrane cytokine expression is predictive of joint damage progression in rheumatoid arthritis: a two-year prospective study (the DAMAGE study cohort).** *Arthritis Rheum* 54(4):1122-31.

Klegeris A, Korkina LG, Greenfield SA (1995). **Autoxidation of dopamine: a comparison of luminescent and spectrophotometric detection in basic solutions.** *Free Radic Biol Med* 18(2): 215-22.

Kleinschek MA, Boniface K, Sadekova S, Grein J, Murphy EE, Turner SP, Raskin L, Desai B, Faubion WA, de Waal Malefyt R, Pierce RH, McClanahan T, Kastelein RA (2009). **Circulating and gut-resident human Th17 cells express CD161 and promote intestinal inflammation.** *J Exp Med* 206(3):525-34.

Kleinschek MA, Owyang AM, Joyce-Shaikh B, Langrish CL, Chen Y, Gorman DM, Blumenschein WM, McClanahan T, Brombacher F, Hurst SD, Kastelein RA, Cua DJ (2007). **IL-25 regulates Th17 function in autoimmune inflammation.** *J Exp Med* 204(1):161-70.

Komarov PG, Komarova EA, Kondratov RV, Christov-Tselkov K, Coon JS, Chernov MV, Gudkov AV (1999). **A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy.** *Science* 285(5434):1733-7.

Koppenol WH (2001). **100 years of peroxy-nitrite chemistry and 11 years of peroxy-nitrite biochemistry.** *Redox Rep* 6(6):339-41.

Korn T, Bettelli E, Gao W, Awasthi A, Jäger A, Strom TB, Oukka M, Kuchroo VK (2007). **IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells.** *Nature* 448, 484–487.

Korn T, Reddy J, Gao W, Bettelli E, Awasthi A, Petersen TR, Bäckström BT, Sobel RA, Wucherpfennig KW, Strom TB et al. (2007). **Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation.** *Nat Med* 13(4):423-31.

Kovaiou RD, Grubeck-Loebenstien B (2006). **Age-associated changes within CD4+ T cells.** *Immunol Lett* 107(1):8-14.

Kovaiou RD, Weiskirchner I, Keller M, Pfister G, Cioca DP, Grubeck-Loebenstien B (2005). **Age-related differences in phenotype and function of CD4+ T cells are due to a phenotypic shift from naive to memory effector CD4+ T cells.** *Int Immunol* 17(10):1359-66.

Krause KH (2004). **Tissue distribution and putative physiological function of NOX family NADPH oxidases.** *Jpn J Infect Dis* 57(5):S28-9.

Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M (1998). **The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis.** *Annu Rev Physiol* 60, 619–642.

- Kryczek I, Zhao E, Liu Y, Wang Y, Vatan L, Szeliga W, Moyer J, Klimczak A, Lange A, Zou W (2011). **Human TH17 cells are long-lived effector memory cells.** *Sci Transl Med* 3(104):104ra100.
- Kuehl FA Jr, Egan RW (1980). **Prostaglandins, arachidonic acid, and inflammation.** *Science* 210(4473):978-84.
- Kuilman T, Peeper DS (2009). **Senescence-messaging secretome: Sms-ing cellular stress.** *Nat Rev Cancer* 9:81-94.
- Kulju KS, Lehman JM (1995). **Increased p53 protein associated with aging in human diploid fibroblasts.** *Exp Cell Res* 217, 336-45.
- Kullberg MC, Jankovic D, Feng CG, Hue S, Gorelick PL, McKenzie BS, Cua DJ, Powrie F, Cheever AW, Maloy KJ, Sher A (2006). **IL-23 plays a key role in Helicobacter hepaticus-induced T cell-dependent colitis.** *J Exp Med* 203(11):2485-94.
- Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD (2000). **Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells.** *J Cell Sci* 113 (Pt 20), 3613-22.
- Kwak MK, Wakabayashi N, Itoh K, Motohashi H, Yamamoto M, Kensler TW (2003). **Modulation of gene expression by cancer chemopreventive dithiolethiones through the Keap1-Nrf2 pathway. Identification of novel gene clusters for cell survival.** *J Biol Chem* 278: 8135-8145.
- Kwon J, Devadas S, Williams MS (2003). **T cell receptor –stimulated generation of hydrogen peroxide inhibits MEK-ERK activation and Ick serine phosphorylation.** *Free Radic Biol Med* 35:406–417.
- La Thangue NB (1994). **DP and E2F proteins: components of a heterodimeric transcription factor implicated in cell cycle control.** *Curr Opin Cell Biol* 6(3):443-50.
- Lahdenpohja N, Hurme M (1998). **CD28-mediated activation in CD45RA+ and CD45RO+ T cells: enhanced levels of reactive oxygen intermediates and c-Rel nuclear translocation in CD45RA+ cells.** *J Leukoc Biol* 63:775– 780.
- Lambers C, Hacker S, Posch M, Hoetzenecker K, Pollreis A, Lichtenauer M, Klepetko W, Ankersmit HJ (2009). **T cell senescence and contraction of T cell repertoire diversity in patients with chronic obstructive pulmonary disease.** *Clin Exp Immunol* 155(3):466-75.
- Lambeth JD (2004). **NOX enzymes and the biology of reactive oxygen.** *Nat Rev Immunol* 4(3):181-9.
- Lander HM (1997). **An essential role for free radicals and derived species in signal transduction.** *FASEB J* 11, 118–124.

Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ (2005). **IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation.** *J Exp Med* 201:233-40.

Lapouge K, Smith SJ, Groemping Y, Rittinger K (2002). **Architecture of the p40-p47-p67phox complex in the resting state of the NADPH oxidase. A central role for p67phox.** *J Biol Chem* 277(12):10121-8.

Lasoudris F, Cousin C, Prevost-Blondel A, Martin-Garcia N, Abd-Alsamad I, Ortonne N, Farcet JP, Castellano F, Molinier-Frenkel V (2011). **IL4I1: an inhibitor of the CD8⁺ antitumor T-cell response in vivo.** *Eur J Immunol* 41(6):1629-38.

Laugesen M, Fowles J (2005). **Scope for regulation of cigarette smoke toxicity according to brand differences in published toxicant emissions.** *N Z Med J* 118(1213).

Laurence A, Tato CM, Davidson TS, Kanno Y, Chen Z, Yao Z, Blank RB, Meylan F, Siegel R, Hennighausen L, Shevach EM, O'shea JJ (2007). **Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation.** *Immunity* 26(3):371-81.

LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC (1992). **Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress.** *Chem Res Toxicol* 5(2):227-31.

Lee J, Sandford AJ, Connett JE, Yan J, Mui T, Li Y, Daley D, Anthonisen NR, Brooks-Wilson A, Man SF, Sin DD (2012). **The relationship between telomere length and mortality in chronic obstructive pulmonary disease (COPD).** *PLoS One* 7(4):e35567.

Lee JR, Koretzky GA (1998). **Production of reactive oxygen intermediates following CD40 ligation correlates with c-Jun N-terminal kinase activation and IL-6 secretion in murine B lymphocytes.** *Eur J Immunol* 28:4188–4197.

Lee KW, Meyer N, Ortwerth BJ (1999). **Chromatographic comparison of the UVA sensitizers present in brunescant cataracts and in calf lens proteins ascorbylated in vitro.** *Exp Eye Res* 69(4):375-84.

Lee SR, Yang KS, Kwon J, Lee C, Jeong W, Rhee SG (2002). **Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H₂O₂.** *J Biol Chem* 277(23):20336-42.

Lee YK, Turner H, Maynard CL, Oliver JR, Chen D, Elson CO, Weaver CT (2009). **Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage.** *Immunity* 30, 92–107.

Lefer AM, Lefer DJ (1999). **Nitric oxide. II. Nitric oxide protects in intestinal inflammation.** *Am J Physiol Cell Physiol* 276(3 Pt 1): G572-5.

Leong WF, Chau JF, Li B (2009). **p53 Deficiency leads to compensatory up-regulation of p16INK4a.** *Mol Cancer Res* 7(3):354-60.

Leslie NR, Bennett D, Lindsay YE, Stewart H, Gray A, Downes CP (2003). **Redox regulation of PI 3-kinase signalling via inactivation of PTEN.** *EMBO J* 22(20):5501-10.

- Levine RL (2002). **Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease.** *Free Radic Biol Med* 32, 790–796.
- Li T, Shi MM, Forman HJ (1997). **Increased transcription of the regulatory subunit of γ -glutamylcysteine synthetase in rat lung epithelial L2 cells exposed to oxidative stress or glutathione depletion.** *Arch Biochem Biophys* 342, 126–133.
- Li XY, Donaldson K, Rahman I, MacNee W (1994). **An investigation of the role of glutathione in increased epithelial permeability induced by cigarette smoke in vivo and in vitro.** *Am J Respir Crit Care Med* 149(6):1518-25.
- Liang B, Workman C, Lee J, Chew C, Dale BM, Colonna L, Flores M, Li N, Schweighoffer E, Greenberg S et al. (2008). **Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II.** *J Immunol* 180(9):5916-26.
- Lighvani AA, Frucht DM, Jankovic D, Yamane H, Aliberti J, Hissong BD, Nguyen BV, Gadina M, Sher A, Paul WE, O'Shea JJ (2001). **T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(26):15137-42.
- Lim HW, Hillsamer P, Banham AH, Kim CH (2005). **Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells.** *J Immunol* 175(7): 4180-3.
- Lin AW, Barradas M, Stone JC, van Aelst L, Serrano M, Lowe SW (1998). **Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling.** *Genes Dev* 12(19):3008-19.
- Lin CS, Klingenberg M (1980). **Isolation of the uncoupling protein from brown adipose tissue mitochondria.** *FEBS Lett* 113(2): 299-303.
- Linden A, Laan M, Anderson GP (2005). **Neutrophils, interleukin-17A and lung disease.** *Eur Respir J* 25:159-72.
- Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, Fazekas de St Groth B, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF, Bluestone JA (2006). **CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells.** *J Exp Med* 203(7):1701-11.
- Liu X, Harriman JF, Schnellmann RG (2002). **Cytoprotective properties of novel nonpeptide calpain inhibitors in renal cells.** *J Pharmacol Exp Ther* 302(1):88-94.
- Lohr J, Knoechel B, Wang JJ, Villarino AV, Abbas AK (2006). **Role of IL-17 and regulatory T lymphocytes in a systemic autoimmune disease.** *J Exp Med* 203(13):2785-91.
- Lubberts E (2008). **IL-17/Th17 targeting: on the road to prevent chronic destructive arthritis?** *Cytokine* 41(2):84-91.
- Lykkesfeldt J, Christen S, Wallock LM, Chang HH, Jacob RA, Ames BN (2000). **Ascorbate is depleted by smoking and repleted by moderate supplementation: a study in male smokers and nonsmokers with matched dietary antioxidant intakes.** *Am J Clin Nutr* 71(2):530-6.

Ma CS, Chew GY, Simpson N, Priyadarshi A, Wong M, Grimbacher B, Fulcher DA, Tangye SG, Cook MC (2008). **Deficiency of Th17 cells in hyper IgE syndrome due to mutations in STAT3.** *J Exp Med* 205(7):1551-7.

Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS (2005). **Oxidative stress and vascular disease. Arterioscler.** *Thromb Vasc Biol* 25(1):29-38.

Maeno T, Houghton AM, Quintero PA, Grumelli S, Owen CA, Shapiro SD (2007). **CD8+ T Cells are required for inflammation and destruction in cigarette smoke-induced emphysema in mice.** *J Immunol* 178(12):8090-6.

Maestrelli P, Paska C, Saetta M, Turato G, Nowicki Y, Monti S, Formichi B, Miniati M, Fabbri LM (2003). **Decreased haem oxygenase-1 and increased inducible nitric oxide synthase in the lung of severe copd patients.** *Eur Respir J* 21:971-976.

Maggi L, Santarlasci V, Capone M, Peired A, Frosali F, Crome SQ, Querci V, Fambrini M, Liotta F, Levings MK, Maggi E, Cosmi L, Romagnani S, Annunziato F (2010). **CD161 is a marker of all human IL-17-producing T-cell subsets and is induced by RORC.** *Eur J Immunol* 40(8):2174-81.

Malek TR, Yu A, Vincek V, Scibelli P, Kong L (2002). **CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbetadeficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2.** *Immunity* 17(2):167-178.

Malhotra D, Thimmulappa R, Navas-Acien A, Sandford A, Elliott M, Singh A, Chen L, Zhuang X, Hogg J, Pare P, Tudor RM, Biswal S (2008). **Decline in NRF2-regulated Antioxidants in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Lungs Due to Loss of Its Positive Regulator, DJ-1.** *Am J Respir Crit Care Med* 78(6):592-604.

Manel N, Unutmaz D, Littman DR (2008). **The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgammat.** *Nat Immunol* 9(6):641-9.

Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, Hatton RD, Wahl SM, Schoeb TR, Weaver CT (2006). **Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage.** *Nature* 441:231-4.

Mao W, Yu XX, Zhong A, Li W, Brush J, Sherwood SW, Adams SH, Pan G (1999). **UCP4, a novel brain-specific mitochondrial protein that reduces membrane potential in mammalian cells.** *FEBS Lett* 443(3): 326-330.

Marks BR, Nowyhed HN, Choi JY, Poholek AC, Odegard JM, Flavell RA, Craft J (2009). **Thymic self-reactivity selects natural interleukin 17-producing T cells that can regulate peripheral inflammation.** *Nat Immunol* 10(10):1125-32.

Marquet J, Lasoudris F, Cousin C, Puiffe ML, Martin-Garcia N, Baud V, Chereau F, Farcet JP, Molinier-Frenkel V, Castellano F (2010). **Dichotomy between factors inducing the immunosuppressive enzyme IL-4-induced gene 1 (IL4I1) in B lymphocytes and mononuclear phagocytes.** *Eur J Immunol* 40(9):2557-68.

- Martin MU, Wesche H (2002). **Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/ interleukin-1 receptor family.** *Biochim Biophys Acta* 1592, 265–280.
- Martyn KD, Frederick LM, von Loehneysen K, Dinauer MC, Knaus UG (2006). **Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases.** *Cell Signal* 18(1):69-82.
- Mason JM, Naidu MD, Barcia M, Porti D, Chavan SS, Chu CC (2004). **IL-4-induced gene-1 is a leukocyte L-amino acid oxidase with an unusual acidic pH preference and lysosomal localization.** *J Immunol* 173(7):4561-7.
- Mathur AN, Chang HC, Zisoulis DG, Stritesky GL, Yu Q, O'Malley JT, Kapur R, Levy DE, Kansas GS, Kaplan MH (2007). **Stat3 and Stat4 direct development of IL-17-secreting Th cells.** *J Immunol* 178(8):4901-7.
- Matsue H, Edelbaum D, Shalhevet D, Mizumoto N, Yang C, Mummert ME, Oeda J, Masayasu H, Takashima A (2003). **Generation and function of reactive oxygen species in dendritic cells during antigen presentation.** *J Immunol* 171:3010– 3018.
- Matsumura T, Pfenndt EA, Hayflick L (1979). **DNA synthesis in the human diploid cell strain WI-38 during in vitro aging: an autoradiography study.** *J Gerontol* 34(3):323-7.
- Matsuzaki G, Umemura M (2007). **Interleukin-17 as an effector molecule of innate and acquired immunity against infections.** *Microbiol Immunol* 51(12):1139-47.
- McConnell BB, Starborg M, Brookes S, Peters G (1998). **Inhibitors of cyclin-dependent kinases induce features of replicative senescence in early passage human diploid fibroblasts.** *Curr Biol* 8(6):351-4.
- McKinley L, Alcorn JF, Peterson A, Dupont RB, Kapadia S, Logar A, Henry A, Irvin CG, Piganelli JD, Ray A et al. (2008). **TH17 cells mediate steroid-resistant airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mice.** *J Immunol* 181:4089-97.
- Michiels C, Raes M, Pigeolet E, Corbisier P, Lambert D, Remacle J (1990). **Importance of a threshold for error accumulation in cell degenerative processes. I. Modulation of the threshold in a model of free radical-induced cell degeneration.** *Mech Ageing Dev* 51(1):41-54.
- Migliore L, Coppedè F (2002). **Genetic and environmental factors in cancer and neurodegenerative diseases.** *Mutat Res* 512(2-3):135-53.
- Milner JD, Brenchley JM, Laurence A, Freeman AF, Hill BJ, Elias KM, Kanno Y, Spalding C, Elloumi HZ, Paulson ML, Davis J, Hsu A, Asher AI, O'Shea J, Holland SM, Paul WE, Douek DC (2008). **Impaired T(H)17 cell differentiation in subjects with autosomal dominant hyper-IgE syndrome.** *Nature* 452(7188):773-6.
- Min B, Prout M, Hu-Li J, Zhu J, Jankovic D, Morgan ES, Urban JF Jr, Dvorak AM, Finkelman FD, LeGros G, Paul WE (2004). **Basophils produce IL-4 and accumulate in tissues after infection with a Th2-inducing parasite.** *J Exp Med* 200(4):507-17.

- Misra N, Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine MD, Kaveri SV (2004). **Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigenpresenting function of dendritic cells.** *J Immunol* 172(8): 4676-80.
- Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A, Parizot C, Taflin C, Heike T, Valeyre D (2009). **Functional Delineation and Differentiation Dynamics of Human CD4+ T Cells Expressing the FoxP3 Transcription Factor.** *Immunity* 30(6):899-911.
- Mondovì B, Riccio P (1984). **Copper amine oxidases: structure and function.** *Adv Inorg Biochem J* 6: 225-44.
- Montuschi P, Collins JV, Ciabattoni G, Lazzeri N, Corradi M, Kharitonov SA, Barnes PJ (2000). **Exhaled 8-isoprostane as an in vivo biomarker of lung oxidative stress in patients with COPD and healthy smokers.** *Am J Respir Crit Care Med* 162(3 Pt 1):1175-7.
- Montuschi P, Kharitonov SA, Ciabattoni G, Barnes PJ (2003). **Exhaled leukotrienes and prostaglandins in COPD.** *Thorax* 58(7):585-8.
- Morel Y, Barouki R (1999). **Repression of gene expression by oxidative stress** *Biochem J* 342 : 481-96.
- Morissette MC, Vachon-Beaudoin G, Parent J, Chakir J, Milot J (2008). **Increased p53 level, bax/bcl-x(l) ratio, and trail receptor expression in human emphysema.** *Am J Respir Crit Care Med* 178:240-247.
- Morlá M, Busquets X, Pons J, Sauleda J, MacNee W, Agustí AG (2006). **Telomere shortening in smokers with and without COPD.** *Eur Respir J* 27(3):525-8.
- Morrison D, Rahman I, Lannan S, MacNee W (1999). **Epithelial permeability, inflammation, and oxidant stress in the air spaces of smokers.** *Am J Respir Crit Care Med* 159(2):473-9.
- Morrow JD, Frei B, Longmire AW, Gaziano JM, Lynch SM, Shyr Y, Strauss WE, Oates JA, Roberts LJ 2nd (1995). **Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2-isoprostanes) in smokers. Smoking as a cause of oxidative damage.** *N Engl J Med* 332(18):1198-203.
- Mosmann TR, Coffman RL (1989). **TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties.** *Annu Rev Immunol* 7: 145–173.
- Mosmann TR, Sad S (1996). **The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more.** *Immunol Today* 17(3):138-46.
- Mougiakakos D, Johansson CC, Jitschin R, Böttcher M, Kiessling R (2011). **Increased thioredoxin-1 production in human naturally occurring regulatory T cells confers enhanced tolerance to oxidative stress.** *Blood* 117(3):857-61.

- Mougiakakos D, Johansson CC, Kiessling R (2009). **Naturally occurring regulatory T cells show reduced sensitivity toward oxidative stress-induced cell death.** *Blood* 113(15):3542-5.
- Mueller CF, Laude K, McNally JS, Harrison DG (2005). **ATVB in focus: redox mechanisms in blood vessels.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25(2):274-8.
- Muller KC, Welker L, Paasch K, Feindt B, Erpenbeck VJ, Hohlfeld JM, Krug N, Nakashima M, Branscheid D, Magnussen H, et al. (2006). **Lung fibroblasts from patients with emphysema show markers of senescence in vitro.** *Respir Res* 7:32.
- Müller T, Gebel S (1994). **Heme oxygenase expression in Swiss 3T3 cells following exposure to aqueous cigarette smoke fractions.** *Carcinogenesis* 15(1):67-72.
- Müller T, Gebel S (1998). **The cellular stress response induced by aqueous extracts of cigarette smoke is critically dependent on the intracellular glutathione concentration.** *Carcinogenesis* 19(5):797-80.
- Muller T, Haussmann HJ, Schepers G (1997). **Evidence for peroxynitrite as an oxidative stress-inducing compound of aqueous cigarette smoke fractions.** *Carcinogenesis* 18(2):295-301.
- Muranski P, Borman ZA, Kerkar SP, Klebanoff CA, Ji Y, Sanchez-Perez L, Sukumar M, Reger RN, Yu Z, Kern SJ, Roychoudhuri R, Ferreyra GA, Shen W, Durum SK, Feigenbaum L, Palmer DC, Antony PA, Chan CC, Laurence A, Danner RL, Gattinoni L, Restifo NP (2011). **Th17 cells are long lived and retain a stem cell-like molecular signature.** *Immunity* 35(6):972-85.
- Murata K, Fujimoto K, Kitaguchi Y, Horiuchi T, Kubo K, Honda T (2013). **Hydrogen Peroxide Content and pH of Expired Breath Condensate from Patients with Asthma and COPD.** *COPD*.
- Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, Blumenschein W, McClanahan T, Kastelein RA, Sedgwick JD, Cua DJ (2003). **Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation.** *J Exp Med* 198: 1951-7.
- Muscat JE, Kleinman W, Colosimo S, Muir A, Lazarus P, Park J, Richie JP Jr (2004). **Enhanced protein glutathiolation and oxidative stress in cigarette smokers.** *Free Radic Biol Med* 36(4):464-70.
- Nagy G, Koncz A, Perl A (2003). **T cell activation- induced mitochondrial hyperpolarization is mediated by Ca²⁺- and redoxdependent production of nitric oxide.** *J Immunol* 171:5188-5197.
- Nakae S, Nambu A, Sudo K, Iwakura Y (2003). **Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice.** *J Immunol* 171(11):6173-7.
- Napolitani G, Acosta-Rodriguez EV, Lanzavecchia A, Sallusto F (2009). **Prostaglandin E2 enhances Th17 responses via modulation of IL-17 and IFN-gamma production by memory CD4+ T cells.** *Eur J Immunol* 39(5):1301-12.

- Narita M, Nunez S, Heard E, Narita M, Lin AW, Hearn SA, Spector DL, Hannon GJ, Lowe SW (2003). **Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence.** *Cell* 113, 703-16.
- Nègre-Salvayre A, Hirtz C, Carrera G, Cazenave R, Troly M, Salvayre R, Pénicaud L, Casteilla L (1997). **A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation.** *FASEB J* 11: 809-815.
- Nembrini C, Marsland BJ, Kopf M (2009). **IL-17-producing T cells in lung immunity and inflammation.** *J Allergy Clin Immunol* 123: 986–994.
- Niedbala W, Alves-Filho JC, Fukada SY, Vieira SM, Mitani A, Sonogo F, Mirchandani A, Nascimento DC, Cunha FQ, Liew FY (2011). **Regulation of type 17 helper T-cell function by nitric oxide during inflammation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(22):9220-5.
- Nishikawa H, Sakaguchi S (2010). **Regulatory T cells in tumor immunity.** *Int J Cancer* 127(4):759-767.
- Nishio K, Inoue A, Qiao S, Kondo H, Mimura A (2001). **Senescence and cytoskeleton: overproduction of vimentin induces senescent-like morphology in human fibroblasts.** *Histochem Cell Biol* 116(4):321-7.
- Noctor G, Foyer CH (1998). **Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control.** *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49:249-279.
- Nurieva R, Yang XO, Martinez G, Zhang Y, Panopoulos AD, Ma L, Schluns K, Tian Q, Watowich SS, Jetten AM, Dong C (2007). **Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells.** *Nature* 448(7152):480-3.
- Nyunoya T, Monick MM, Klingelutz A, Yarovinsky TO, Cagley JR, Hunninghake GW (2006). **Cigarette smoke induces cellular senescence.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 35(6):681-8.
- O'Donnell R, Breen D, Wilson S, Djukanovic R (2006). **Inflammatory cells in the airways in COPD.** *Thorax* 61(5):448-54.
- O'Shaughnessy TC, Ansari TW, Barnes NC, Jeffery PK (1997). **Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8+ T lymphocytes with FEV1.** *Am J Respir Crit Care Med* 155(3):852-7.
- Oberle N, Eberhardt N, Falk CS, Krammer PH, Suri-Payer E (2007). **Rapid suppression of cytokine transcription in human CD4+CD25 T cells by CD4+Foxp3+ regulatory T cells: independence of IL-2 consumption, TGF-beta, and various inhibitors of TCR signaling.** *J Immunol* 179(6):3578-87.
- Ohkura N, Sakaguchi S (2010). **Regulatory T cells: roles of T cell receptor for their development and function.** *Semin Immunopathol* 32(2):95-106.

Ohtani N, Zebedee Z, Huot TJ, Stinson JA, Sugimoto M, Ohashi Y, Sharrocks AD, Peters G, Hara E (2001). **Opposing effects of Ets and Id proteins on p16INK4a expression during cellular senescence.** *Nature* 409(6823):1067-70.

Okado-Matsumoto A, Fridovich I (2002). **Amyotrophic lateral sclerosis: a proposed mechanism.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(13):9010-4.

Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, Vega F, Yu N, Wang J, Singh K, Zonin F, Vaisberg E, Churakova T, Liu M, Gorman D, Wagner J, Zurawski S, Liu Y, Abrams JS, Moore KW, Rennick D, de Waal-Malefyt R, Hannum C, Bazan JF, Kastelein RA (2000). **Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12.** *Immunity* 13(5):715-25.

Orosz Z, Csiszar A, Labinsky N, Smith K, Kaminski PM, Ferdinandy P, Wolin MS, Rivera A, Ungvari Z (2007). **Cigarette smoke-induced proinflammatory alterations in the endothelial phenotype: role of NAD(P)H oxidase activation.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292(1):H130-9.

Ostergaard H, Tachibana C, Winther JR (2004). **Monitoring disulfide bond formation in the eukaryotic cytosol.** *J Cell Biol* 166, 337–345.

Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y (2008). **The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation.** *Immunity* 28(4):454-67.

Pacher P, Beckman JS, Liaudet L (2007). **Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease.** *Physiol Rev* 87(1):315-424.

Pamplona R, Portero-Otin M, Ruiz C, Gredilla R, Herrero A, Barja G (2000). **Double bond content of phospholipids and lipid peroxidation negatively correlate with maximum longevity in the heart of mammals.** *Mech Ageing Dev* 112, 169–183.

Pani G, Colavitti R, Borrello S, Galeotti T (2000). **Endogenous oxygen radicals modulate protein tyrosine phosphorylation and JNK-1 activation in lectin-stimulated thymocytes.** *Biochem J* 347:173–181.

Papagno L, Spina CA, Marchant A, Salio M, Rufer N, Little S, Dong T, Chesney G, Waters A, Easterbrook P, Dunbar PR, Shepherd D, Cerundolo V, Emery V, Griffiths P, Conlon C, McMichael AJ, Richman DD, Rowland-Jones SL, Appay V (2004). **Immune activation and CD8+ T-cell differentiation towards senescence in HIV-1 infection.** *PLoS Biol* 2(2):E20.

Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C (2005). **A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17.** *Nat Immunol* 6(11):1133-41.

Park HS, Lee SH, Park D, Lee JS, Ryu SH, Lee WJ, Rhee SG, Bae YS (2004). **Sequential activation of phosphatidylinositol 3-kinase, beta Pix, Rac1, and Nox1 in growth factor-induced production of H₂O₂.** *Mol Cell Biol* 24(10):4384-94.

Parronchi P, Romagnani P, Annunziato F, Sampognaro S, Becchio A, Giannarini L, Maggi E, Pupilli C, Tonelli F, Romagnani S (1997). **Type 1 T-helper cell predominance and**

interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *Am J Pathol* 150(3):823-32.

Pauwels RA, Rabe KF (2004). **Burden and clinical features of chronic obstructive pulmonary disease (copd).** *Lancet* 364:613-620.

Peck A, Mellins ED (2010). **Precarious balance: Th17 cells in host defense.** *Infect Immun* 78(1):32-8.

Pelletier M, Maggi L, Micheletti A, Lazzeri E, Tamassia N, Costantini C, Cosmi L, Lunardi C, Annunziato F, Romagnani S et al. (2010). **Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells.** *Blood* 115, 335–343.

Peng J, Jones GL, Watson K (2000). **Stress proteins as biomarkers of oxidative stress: effects of antioxidant supplements.** *Free Radic Biol Med* 28, 1598–1606.

Petrache I, Natarajan V, Zhen L, Medler TR, Richter A, Berdyshev EV, Tudor RM (2006). **Ceramide causes pulmonary cell apoptosis and emphysema: A role for sphingolipid homeostasis in the maintenance of alveolar cells.** *Proc Am Thorac Soc* 3:510.

Pi J, Qu W, Reece JM, Kumagai Y, Waalkes MP (2003). **Transcription factor Nrf2 activation by inorganic arsenic in cultured keratinocytes: involvement of hydrogen peroxide.** *Exp Cell Res* 290, 234– 245.

Piccirillo CA, Letterio JJ, Thornton AM, McHugh RS, Mamura M, Mizuhara H, Shevach EM (2002). **CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness.** *J Exp Med* 196(2): 237-46.

Pinamonti S, Muzzoli M, Chicca MC, Papi A, Ravenna F, Fabbri LM, Ciaccia A (1996). **Xanthine oxidase activity in bronchoalveolar lavage fluid from patients with chronic obstructive pulmonary disease.** *Free Radic Biol Med* 21(2):147-55.

Pinot F, Bachelet M, François D, Polla BS, Walti H (1999). **Modified natural porcine surfactant modulates tobacco smoke-induced stress response in human monocytes.** *Life Sci* 64(2):125-34.

Poderoso JJ, Carreras MC, Lisdero C, Riobó N, Schöpfer F, Boveris A (1996). **Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles.** *Arch Biochem Biophys* 328(1):85-92.

Podolin PL, Foley JP, Carpenter DC, Bolognese BJ, Logan GA, Long E 3rd, Harrison OJ, Walsh PT (2013). **T cell depletion protects against alveolar destruction due to chronic cigarette smoke exposure in mice.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 304(5):L312-23.

Polgár E, Campbell AD, MacIntyre LM, Watanabe M, Todd AJ (2007). **Phosphorylation of ERK in neurokinin 1 receptor-expressing neurons in laminae III and IV of the rat spinal dorsal horn following noxious stimulation.** *Mol Pain* 3: 4.

- Pryor WA, Dooley MM, Church DF (1984). **Inactivation of human alpha-1-proteinase inhibitor by gas-phase cigarette smoke.** *Biochem Biophys Res Commun* 122(2):676-81.
- Pryor WA, Godber SS (1991). **Noninvasive measures of oxidative stress status in humans.** *Free Radic Biol Med* 10(3-4):177-84.
- Pryor WA, Prier DG, Church DF (1983). **Electron-spin resonance study of mainstream and sidestream cigarette smoke: nature of the free radicals in gas-phase smoke and in cigarette tar.** *Environ Health Perspect* 47:345-55.
- Puiffe ML, Lachaise I, Molinier-Frenkel V, Castellano F (2013). **Antibacterial properties of the mammalian L-amino acid oxidase IL4I1.** *PLoS One* 8(1).
- Putnam CD, Arvai AS, Bourne Y, Tainer JA (2000). **Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism.** *J Mol Biol* 296, 295–309.
- Quintana FJ, Basso AS, Iglesias AH, Korn T, Farez MF, Bettelli E, Caccamo M, Oukka M, Weiner HL (2008). **Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor.** *Nature* 453(7191):65-71.
- Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, Barnes PJ, Buist SA, Calverley P, Fukuchi Y, Jenkins C, Rodriguez-Roisin R, van Weel C, et al. (2007). **Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: Gold executive summary.** *Am J Respir Crit Care Med* 176:532-555.
- Rabesandratana H, Fournier AM, Chateau MT, Serre A, Dornand J (1992). **Increased oxidative metabolism in PMA-activated lymphocytes: a flow cytometric study.** *Int J Immunopharmacol* 14:895–902.
- Radhakrishnan S, Cabrera R, Schenk EL, Nava-Parada P, Bell MP, Van Keulen VP, Marler RJ, Felts SJ, Pease LR (2008). **Reprogrammed FoxP3⁺ T regulatory cells become IL-17⁺ antigen-specific autoimmune effectors in vitro and in vivo.** *J Immunol* 181: 3137-3147.
- Rahman I, Kelly F (2003). **Biomarkers in breath condensate: a promising new non-invasive technique in free radical research.** *Free Radic Res* 37(12):1253-66.
- Rahman I, Li XY, Donaldson K, Harrison DJ, MacNee W (1995). **Glutathione homeostasis in alveolar epithelial cells in vitro and lung in vivo under oxidative stress.** *Am J Physiol* 269(3 Pt 1):L285-92.
- Rahman I, MacNee W (1999). **Lung glutathione and oxidative stress: implications in cigarette smoke-induced airway disease.** *Am J Physiol* 277(6 Pt 1):L1067-88.
- Rahman I, MacNee W (2000). **Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation.** *Eur Respir J* 16(3):534-54.
- Rahman I, Morrison D, Donaldson K, MacNee W (1996). **Systemic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers.** *Am J Respir Crit Care Med* 154(4 Pt 1):1055-60.

- Rahman I, van Schadewijk AA, Crowther AJ, Hiemstra PS, Stolk J, MacNee W, De Boer WI (2002). **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(4):490-5.
- Raibekas AA, Massey V (1998). **Primary structure of the snake venom L-amino acid oxidase shows high homology with the mouse B cell interleukin 4-induced Fig1 protein.** *Biochem Biophys Res Commun* 248(3):476-8.
- Ramirez RD, Morales CP, Herbert BS, Rohde JM, Passons C, Shay JW, Wright WE (2001). **Putative telomere-independent mechanisms of replicative aging reflect inadequate growth conditions.** *Genes Dev* 15(4):398-403.
- Rao AV, Balachandran B (2002). **Role of oxidative stress and antioxidants in neurodegenerative diseases.** *Nutr Neurosci* 5(5):291-309.
- Rao PE, Petrone AL, Ponath PD (2005). **Differentiation and expansion of T cells with regulatory function from human peripheral lymphocytes by stimulation in the presence of TGF- β .** *J Immunol* 174(3): 1446-55.
- Ravanat JL, Di Mascio P, Martinez GR, Medeiros MH, Cadet J (2000). **Singlet oxygen induces oxidation of cellular DNA.** *J Biol Chem* 275(51):40601-4.
- Reiner SL (2001). **Helper T cell differentiation, inside and out.** *Curr Opin Immunol* 13: 351-355.
- Rhee SG, Kang SW, Jeong W, Chang TS, Yang KS, Woo HA (2005). **Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins.** *Curr Opin Cell Biol* 17, 183-189.
- Robles SJ, Adami GR (1998). **Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts.** *Oncogene* 16(9):1113-23.
- Roche N, Huchon G (2004). **epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease.** *Rev Prat* 54:1408-1413.
- Rode L, Bojesen SE, Weischer M, Vestbo J, Nordestgaard BG (2013). **Short telomere length, lung function and chronic obstructive pulmonary disease in 46,396 individuals.** *Thorax* 68(5):429-35.
- Rogge L, Barberis-Maino L, Biffi M, Passini N, Presky DH, Gubler U, Sinigaglia F (1997). **Selective expression of an interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells.** *J Exp Med* 185: 825-831.
- Rolfe DF, Brown GC (1997). **Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals.** *Physiol Rev* 77(3):731-58.
- Romagnani S (1997). **The Th1/Th2 paradigm.** *Immunol Today* 18:263-266.

- Rothe G, Valet G (1990). **Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescein.** *J Leukoc Biol* 47(5):440-8.
- Rouvier E, Luciani MF, Mattéi MG, Denizot F, Golstein P (1993). **CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene.** *J Immunol* 150(12):5445-56.
- Rubio ML, Martin-Mosquero MC, Ortega M, Peces-Barba G, González-Mangado N (2004). **Oral N-acetylcysteine attenuates elastase-induced pulmonary emphysema in rats.** *Chest* 125(4):1500-6.
- Ruprecht CR, Gattorno M, Ferlito F, Gregorio A, Martini A, Lanzavecchia A, Sallusto F (2005). **Coexpression of CD25 and CD27 identifies FoxP3+ regulatory T cells in inflamed synovia.** *J Exp Med* 201(11):1793-803.
- Rusznak C, Mills PR, Devalia JL, Sapsford RJ, Davies RJ, Lozewicz S (2000). **Effect of cigarette smoke on the permeability and IL-1beta and sICAM-1 release from cultured human bronchial epithelial cells of never-smokers, smokers, and patients with chronic obstructive pulmonary disease.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 23(4):530-6.
- Rutault K, Alderman C, Chain BM, Katz DR (1999). **Reactive oxygen species activate human peripheral blood dendritic cells.** *Free Radical Biol Med* 26, 232–238.
- Rytilä P, Rehn T, Ilumets H, Rouhos A, Sovijärvi A, Myllärniemi M, Kinnula VL (2006). **Increased oxidative stress in asymptomatic current chronic smokers and GOLD stage 0 COPD.** *Respir Res* 7:69.
- Sadlack B, Merz H, Schorle H, Schimpl A, Feller AC, Horak I (1993). **Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene.** *Cell* 75(2):253-261.
- Saetta M, Baraldo S, Corbino L, Turato G, Braccioni F, Rea F, Cavallesco G, Tropeano G, Mapp CE, Maestrelli P, Ciaccia A, Fabbri LM (1999). **CD8+ve cells in the lungs of smokers with chronic obstructive pulmonary disease.** *Am J Respir Crit Care Med* 160(2):711-7.
- Saetta M, Di Stefano A, Turato G, Facchini FM, Corbino L, Mapp CE, Maestrelli P, Ciaccia A, Fabbri LM (1998). **CD8+ T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease.** *Am J Respir Crit Care Med* 157(3 Pt 1):822-6.
- Saito S, Ogawa J, Minamiya Y (2005). **Pulmonary reexpansion causes xanthine oxidase-induced apoptosis in rat lung.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289:L400-406.
- Sakaguchi K, Saito S, Higashimoto Y, Roy S, Anderson CW, Appella E (2000). **Damage-mediated phosphorylation of human p53 threonine 18 through a cascade mediated by a casein 1-like kinase. Effect on Mdm2 binding.** *J Biol Chem* 275(13):9278-83.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M (1995). **Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases.** *J Immunol* 155(3):1151-64.

Santarlaschi V, Maggi L, Capone M, Frosali F, Querci V, De Palma R, Liotta F, Cosmi L, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F (2009). **TGF-beta indirectly favors the development of human Th17 cells by inhibiting Th1 cells.** *Eur J Immunol* 39(1):207-15.

Santarlaschi V, Maggi L, Capone M, Querci V, Beltrame L, Cavaliere D, D'Aiuto E, Cimaz R, Nebbioso A, Liotta F, De Palma R, Maggi E, Cosmi L, Romagnani S, Annunziato F (2012). **Rarity of human T helper 17 cells is due to retinoic acid orphan receptor-dependent mechanisms that limit their expansion.** *Immunity* 36(2):201-14.

Sato W, Aranami T, Yamamura T (2007). **Cutting edge: Human Th17 cells are identified as bearing CCR2+CCR5- phenotype.** *J Immunol* 178(12):7525-9.

Savale L, Chaouat A, Bastuji-Garin S, Marcos E, Boyer L, Maitre B, Sarni M, Housset B, Weitzenblum E, Matrat M, Le Corvoisier P, Rideau D, Boczkowski J, Dubois-Randé JL, Chouaid C, Adnot S (2009). **Shortened telomeres in circulating leukocytes of patients with chronic obstructive pulmonary disease.** *Am J Respir Crit Care Med* 179(7):566-71.

Sazanov LA (2007). **Respiratory complex I: mechanistic and structural insights provided by the crystal structure of the hydrophilic domain.** *Biochemistry* 46(9): 2275-2288.

Schapira AH (1998). **Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disorders.** *Biochim Biophys Acta* 1366(1-2):225-33.

Schiött A, Lindstedt M, Johansson-Lindbom B, Roggen E, Borrebaeck CA (2004). **CD27-CD4+ memory T cells define a differentiated memory population at both the functional and transcriptional levels.** *Immunology* 113(3):363-70.

Schon O, Friedler A, Bycroft M, Freund SM, Fersht AR (2002). **Molecular mechanism of the interaction between MDM2 and p53.** *J Mol Biol* 323(3):491-501.

Schulz C, Krätzel K, Wolf K, Schroll S, Köhler M, Pfeifer M (2004). **Activation of bronchial epithelial cells in smokers without airway obstruction and patients with COPD.** *Chest* 125(5):1706-13.

Schulz C, Wolf K, Harth M, Krätzel K, Kunz-Schughart L, Pfeifer M (2003). **Expression and release of interleukin-8 by human bronchial epithelial cells from patients with chronic obstructive pulmonary disease, smokers, and never-smokers.** *Respiration* 70(3):254-61.

Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, Landay A, Solomon M, Selby W, Alexander SI, Nanan R, Kelleher A, Fazekas de St Groth B (2006). **Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells.** *J Exp Med* 203(7):1693-700.

Sena LA, Li S, Jairaman A, Prakriya M, Ezponda T, Hildeman DA, Wang CR, Schumacker PT, Licht JD, Perlman H, Bryce PJ, Chandel NS (2013). **Mitochondria are required for antigen-specific T cell activation through reactive oxygen species signaling.** *Immunity* 38(2):225-36.

- Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW (1997). **Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a.** *Cell* 88(5):593-602.
- Serteyn D, Grulke S, Franck T, Mouithys-mickalad A, Deby-dupont G (2003). **La myéloperoxydase des neutrophiles, une enzyme de défense aux capacités oxydantes.** *Ann Méd Vét* 147:79-93.
- Servais S, Couturier K, Koubi H, Rouanet JL, Desplanches D, Sornay-Mayet MH, Sempore B, Lavoie JM, Favier R (2003). **Effect of voluntary exercise on H₂O₂ release by subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria.** *Free Radic Biol Med* 35(1):24-32.
- Setoguchi R, Hori S, Takahashi T, Sakaguchi S (2005). **Homeostatic maintenance of natural Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization.** *J Exp Med* 201:723-35.
- Shan M, Cheng HF, Song LZ, Roberts L, Green L, Hacken-Bitar J, Huh J, Bakaeen F, Coxson HO, Storness-Bliss C, Ramchandani M, Lee SH, Corry DB, Kheradmand F (2009). **Lung myeloid dendritic cells coordinately induce TH1 and TH17 responses in human emphysema.** *Sci Transl Med* 1(4):4ra10.
- Shapiro SD, Goldstein NM, Houghton AM, Kobayashi DK, Kelley D, Belaouaj A (2003). **Neutrophil elastase contributes to cigarette smoke-induced emphysema in mice.** *Am J Pathol* 163:2329-2335.
- Sherr CJ, Roberts JM (1999). **CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression.** *Genes Dev* 13, 1501-12.
- Shevach EM (2009). **Mechanisms of foxp3⁺ T regulatory cell-mediated suppression.** *Immunity* 30(5):636-645.
- Shiva S, Crawford JH, Ramachandran A, Ceaser EK, Hillson T, Brookes PS, Patel RP, Darley-Usmar VM (2004). **Mechanisms of the interaction of nitroxyl with mitochondria.** *Biochem J* 379(Pt 2):359-66.
- Shull S, Heintz NH, Periasamy M, Manohar M, Janssen YM, Marsh JP, Mossman BT (1991). **Differential regulation of antioxidant enzymes in response to oxidants.** *J Biol Chem* 266(36):24398-403.
- Sies H (1991). **Role of reactive oxygen species in biological processes.** *Klin Wochenschr* 69(21-23):965-8.
- Sies H (1993). **Strategies of antioxidant defense.** *Eur J Biochem* 215(2):213-9.
- Singh SP, Zhang HH, Foley JF, Hedrick MN, Farber JM (2008). **Human T cells that are able to produce IL-17 express the chemokine receptor CCR6.** *J Immunol* 180(1):214-21.
- Sitkovsky MV, Lukashev D, Apasov S, Kojima H, Koshiba M, Caldwell C, Ohta A, Thiel M (2004). **Physiological control of immune response and inflammatory tissue damage by hypoxia-inducible factors and adenosine A_{2A} receptors.** *Annu Rev Immunol* 22:657-82.

Slebos DJ, Ryter SW, van der Toorn M, Liu F, Guo F, Baty CJ, Karlsson JM, Watkins SC, Kim HP, Wang X, Lee JS, Postma DS, Kauffman HF, Choi AM (2007). **Mitochondrial localization and function of heme oxygenase-1 in cigarette smoke-induced cell death.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 36(4):409-17.

Smyth LJ, Starkey C, Vestbo J, Singh D (2007). **CD4-regulatory cells in COPD patients.** *Epub* 132(1):156-63.

Sohal RS, Mockett RJ, Orr WC (2002). **Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis.** *Free Radic Biol Med* 33(5):575-86.

Soltaninassab SR, Sekhar KR, Meredith MJ, Freeman ML (2000). **Multi-faceted regulation of γ -glutamylcysteine synthetase.** *J Cell Physiol* 182, 163–170.

Sorg O (2004). **Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality?** *C R Biol* 327(7):649-62.

St-Laurent J, Proulx LI, Boulet LP, Bissonnette E (2009). **Comparison of two in vitro models of cigarette smoke exposure.** *Inhal Toxicol* 21(13):1148-53.

Stahl W, Sies H (2002). **Carotenoids and protection against solar UV radiation.** *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 15(5):291-6.

Starnes T, Robertson MJ, Sledge G, Kelich S, Nakshatri H, Broxmeyer HE, Hromas R (2001). **Cutting edge: IL-17F, a novel cytokine selectively expressed in activated T cells and monocytes, regulates angiogenesis and endothelial cell cytokine production.** *J Immunol* 167(8):4137-40.

Stein GH, Drullinger LF, Soulard A, Dulić V (1999). **Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts.** *Mol Cell Biol* 19(3):2109-17.

Stokes AH, Hastings TG, Vrana KE (1999). **Cytotoxic and genotoxic potential of dopamine.** *J Neurosci Res* 55(6): 659-65.

Stowe DF, Camara AK (2009). **Mitochondrial reactive oxygen species production in excitable cells: modulators of mitochondrial and cell function.** *Antioxid Redox Signal* 11(6):1373-414.

Stumhofer JS, Laurence A, Wilson EH, Huang E, Tato CM, Johnson LM, Villarino AV, Huang Q, Yoshimura A, Sehy D, Saris CJ, O'Shea JJ, Hennighausen L, Ernst M, Hunter CA (2006). **Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system.** *Nat Immunol* 7(9):937-45.

Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, Shi J, Xu X, Sorescu D, Chung AB, Griendling KK, Lambeth JD (1999). **Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1.** *Nature* 401:79–82.

Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani K, Finkel T (1995). **Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction.** *Science* 270:296–299.

Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Sulciner DJ, Gutkind JS, Irani K, Goldschmidt-Clermont PJ, Finkel T (1996). **Regulation of reactive-oxygen-species generation in fibroblasts by Rac1.** *Biochem J* 318:379–382.

Sutherland BM, Cimino JS, Delihias N, Shih AG, Oliver RP (1980). **Ultraviolet light-induced transformation of human cells to anchorage-independent growth.** *Cancer Res* 40(6):1934-9.

Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH (2000). **A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment.** *Cell* 100: 655–669.

Takada Y, Mukhopadhyay A, Kundu GC, Mahabeleshwar GH, Singh S, Aggarwal BB (2003). **Hydrogen peroxide activates NFκB through tyrosine phosphorylation of IκBα and serine phosphorylation of p65: evidence for the involvement of IκBα kinase and Syk proteintyrosine kinase.** *J Biol Chem* 278, 24233–24241.

Takahashi A, Ohtani N, Yamakoshi K, Iida S, Tahara H, Nakayama K, Nakayama KI, Ide T, Saya H, Hara E (2006). **Mitogenic signalling and the p16INK4a-Rb pathway cooperate to enforce irreversible cellular senescence.** *Nat Cell Biol* 8(11):1291-7.

Takeya R, Ueno N, Kami K, Taura M, Kohjima M, Izaki T, Nunoi H, Sumimoto H (2003). **Novel human homologues of p47phox and p67phox participate in activation of superoxide-producing NADPH oxidases.** *J Biol Chem* 278(27):25234-46.

Tashkin DP, Celli B, Senn S, Burkhart D, Kesten S, Menjoge S, Decramer M (2008). **A 4-year trial of tiotropium in chronic obstructive pulmonary disease.** *N Engl J Med* 359:1543-1554.

Tatla S, Woodhead V, Foreman JC, Chain BM (1999). **The role of reactive oxygen species in triggering proliferation and IL-2 secretion in T cells.** *Free Radic Biol Med* 26:14–24.

Thielen A, Klus H, Muller L (2008). **Tobacco smoke: Unraveling a controversial subject.** *Exp Toxicol Pathol* 60:141-156.

Thornton AM, Shevach EM (1998). **CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production.** *J Exp Med* 188(2):287-96.

Tirosh O, Aronis A, Melendez JA (2003). **Mitochondrial state 3 to 4 respiration transition during Fas-mediated apoptosis controls cellular redox balance and rate of cell death.** *Biochem Pharmacol* 66(8):1331-4.

Todd DE, Densham RM, Molton SA, Balmanno K, Newson C, Weston CR, Garner AP, Scott L, Cook SJ (2004). **ERK1/2 and p38 cooperate to induce a p21CIP1-dependent G1 cell cycle arrest.** *Oncogene* 23(19):3284-95.

Toninello A, Salvi M, Pietrangeli P, Mondovì B (2004). **Biogenic amines and apoptosis: minireview article.** *Amino Acids* 26(4): 339-43.

Toy D, Kugler D, Wolfson M, Vanden Bos T, Gurgel J, Derry J, Tocker J, Peschon J (2006). **Cutting edge: interleukin 17 signals through a heteromeric receptor complex.** *J Immunol* 177(1):36-9.

Tsuchiya M, Suematsu M, Suzuki H (1994). **In vivo visualization of oxygen radical-dependent photoemission.** *Methods Enzymol* 128–140.

Tsuchiya M, Thompson DF, Suzuki YJ, Cross CE, Packer L (1992). **Superoxide formed from cigarette smoke impairs polymorphonuclear leukocyte active oxygen generation activity.** *Arch Biochem Biophys* 299(1):30-7.

Tsugeno Y, Ito A (1997). **A key amino acid responsible for substrate selectivity of monoamine oxidase A and B.** *J Biol Chem* 272(22): 14033-6.

Tsuji T, Aoshiha K, Nagai A (2004). **Cigarette smoke induces senescence in alveolar epithelial cells.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 31:643-649.

Tsuji T, Aoshiha K, Nagai A (2006). **Alveolar cell senescence in patients with pulmonary emphysema.** *Am J Respir Crit Care Med* 174(8):886-93.

Turrens JF (1997). **Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain.** *Biosci Rep* 17(1): 3-8.

Ueno N, Takeya R, Miyano K, Kikuchi H, Sumimoto H (2005). **The NADPH oxidase Nox3 constitutively produces superoxide in a p22phox-dependent manner: its regulation by oxidase organizers and activators.** *J Biol Chem* 280(24):23328-39.

Uhlig HH, Coombes J, Mottet C, Izcue A, Thompson C, Fanger A, Tannapfel A, Fontenot JD, Ramsdell F, Powrie F (2006). **Characterization of Foxp3+CD4+CD25+ and IL-10-secreting CD4+CD25+ T cells during cure of colitis.** *J Immunol* 177(9): 5852-60.

Upadhyay AK, Borbat PP, Wang J, Freed JH, Edmondson DE (2008). **Determination of the Oligomeric States of Human and Rat Monoamine Oxidases in the Outer Mitochondrial Membrane and Octyl β -d-Glucopyranoside Micelles Using Pulsed Dipolar Electron Spin Resonance Spectroscopy.** *Biochemistry* 47:1554–1566.

Ursini F, Maiorino M, Brigelius-Flohe R, Aurnann KD, Roveri A, Schomburg D, Flohe L (1995). **Diversity of glutathione peroxidases.** *Methods Enzymol* 252, 38–53.

van den Berg R, Haenen GR, van den Berg H, Bast A (2001). **Nuclear factor-kappaB activation is higher in peripheral blood mononuclear cells of male smokers.** *Environ Toxicol Pharmacol* 9(4):147-151.

van Reyk DM, King NJ, Dinauer MC, Hunt NH (2001). **The intracellular oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein in murine T lymphocytes.** *Free Radic Biol Med* 30:82– 88.

- Vargas-Rojas MI, Ramírez-Venegas A, Limón-Camacho L, Ochoa L, Hernández-Zenteno R, Sansores RH (2011). **Increase of Th17 cells in peripheral blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease.** *Respir Med* 105(11):1648-54.
- Veldhoen M, Hirota K, Christensen J, O'Garra A, Stockinger B (2009). **Natural agonists for aryl hydrocarbon receptor in culture medium are essential for optimal differentiation of Th17 T cells.** *J Exp Med* 206(1):43-9.
- Veldhoen M, Hirota K, Westendorf AM, Buer J, Dumoutier L, Renauld JC, Stockinger B (2008). **The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins.** *Nature* 453(7191):106-9.
- Veldhoen M, Hocking RJ, Flavell RA, Stockinger B (2006). **Signals mediated by transforming growth factor-beta initiate autoimmune encephalomyelitis, but chronic inflammation is needed to sustain disease.** *Nat Immunol* 7(11):1151-6.
- Vidal-Puig AJ, Grujic D, Zhang CY, Hagen T, Boss O, Ido Y, Szczepanik A, Wade J, Mootha V, Cortright R et al. (2000). **Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice.** *J Biol Chem* 275(21): 16258-16266.
- Vindis C, Séguélas MH, Bianchi P, Parini A, Cambon C (2000). **Monoamine oxidase B induces ERK-dependent cell mitogenesis by hydrogen peroxide generation.** *Biochem Biophys Res Commun* 271(1): 181-5.
- Volpe E, Servant N, Zollinger R, Bogiatzi SI, Hupé P, Barillot E, Soumelis V (2008). **A critical function for transforming growth factorb, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human TH-17 responses.** *Nat Immunol* 9, 650–657.
- Wahl GM, Carr AM (2001). **The evolution of diverse biological responses to DNA damage: insights from yeast and p53.** *Nat Cell Biol* 3, E277-86.
- Wakabayashi N, Itoh K, Wakabayashi J, Motohashi H, Noda S, Takahashi S, Imakado S, Kotsuji T, Otsuka F, Roop DR et al. (2003). **Keap1-null mutation leads to postnatal lethality due to constitutive Nrf2 activation.** *Nat Genet* 35:238-45.
- Wallace DC (2008). **Mitochondria as Chi.** *Genetics* 179, 727–735.
- Wang E (1995). **Senescent human fibroblasts resist programmed cell death, and failure to suppress bcl2 is involved.** *Cancer Res* 55(11):2284-92.
- Wang H, Peng W, Weng Y, Ying H, Li H, Xia D, Yu W (2012). **Imbalance of Th17/Treg cells in mice with chronic cigarette smoke exposure.** *Int Immunopharmacol* 14(4):504-12.
- Wang Y, Meng A, Zhou D (2004). **Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase uncouples H2O2-induced senescent phenotype and cell cycle arrest in normal human diploid fibroblasts.** *Exp Cell Res* 298(1):188-96.
- Wasserman WW, Fahl WE (1997). **Comprehensive analysis of proteins which interact with the antioxidant responsive element: correlation of ARE-BP-1 with the chemoprotective induction response.** *Arch Biochem Biophys* 344, 387–396.

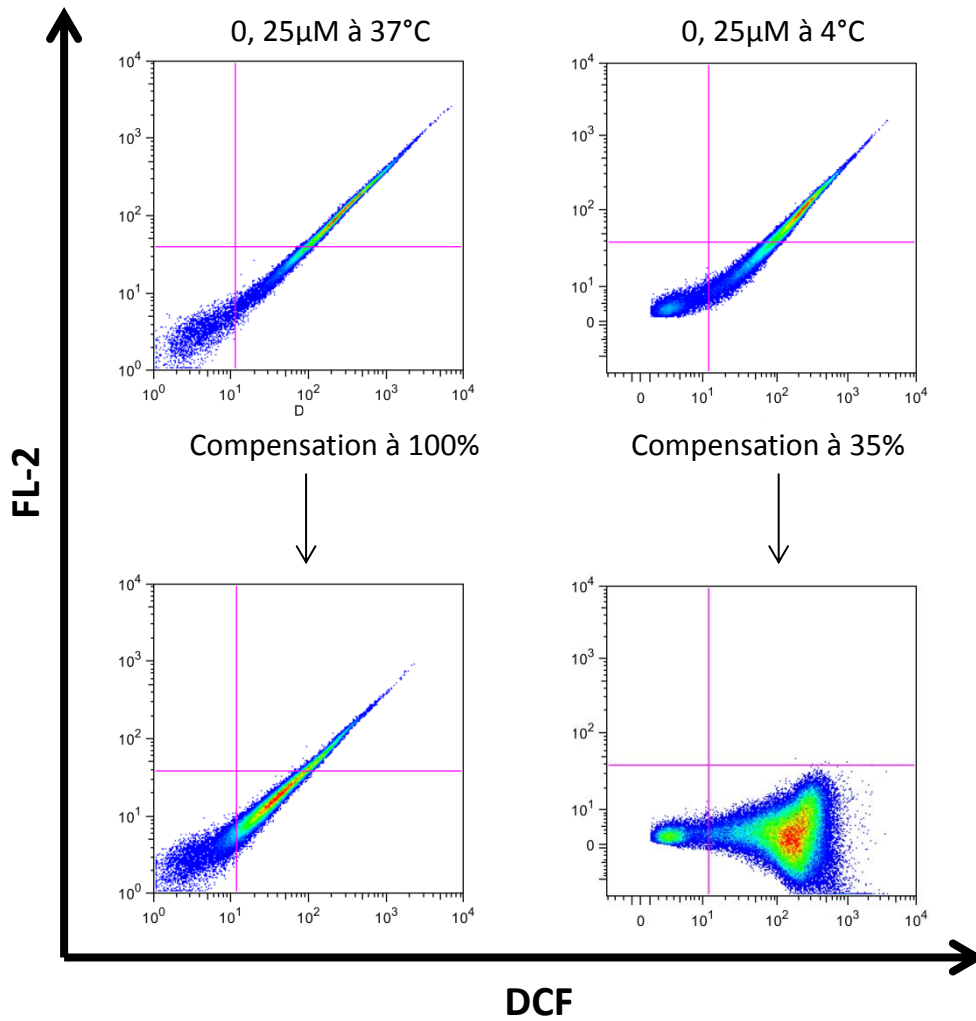
- Webley K, Bond JA, Jones CJ, Blaydes JP, Craig A, Hupp T, Wynford-Thomas D (2000). **Posttranslational modifications of p53 in replicative senescence overlapping but distinct from those induced by DNA damage.** *Mol Cell Biol* 20(8):2803-8.
- Wikström M, Verkhovsky MI (2007). **Mechanism and energetics of proton translocation by the respiratory heme-copper oxidases.** *Biochim Biophys Acta* 1767(10):1200-1214.
- Williams IR (2006). **CCR6 and CCL20: partners in intestinal immunity and lymphorganogenesis.** *Ann N Y Acad Sci* 1072:52-61.
- Williams MA, Rangasamy T, Bauer SM, Killedar S, Karp M, Kensler TW, Yamamoto M, Breyse P, Biswal S, Georas SN (2008). **Disruption of the transcription factor Nrf2 promotes pro-oxidative dendritic cells that stimulate Th2-like immunoresponsiveness upon activation by ambient particulate matter.** *J Immunol* 181(7):4545-59.
- Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, Blumenschein WM, Mattson JD, Basham B, Smith K, Chen T, Morel F et al. (2007). **Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells.** *Nat Immunol* 8(9):950-7.
- Wohlfert E, Belkaid Y (2008). **Role of endogenous and induced regulatory T cells during infections.** *J Clin Immunol* 28(6):707-15.
- Wolk K, Sabat R (2006). **Interleukin-22: a novel T- and NK-cell derived cytokine that regulates the biology of tissue cells.** *Cytokine Growth Factor Rev* 17(5):367-80.
- Wong H, Riabowol K (1996). **Differential CDK-inhibitor gene expression in aging human diploid fibroblasts.** *Exp Gerontol* 31, 311-25.
- Wood LG, Gibson PG, Garg ML (2003). **Biomarkers of lipid peroxidation, airway inflammation and asthma.** *Eur Respir J* 21(1):177-86.
- Woods D, Parry D, Cherwinski H, Bosch E, Lees E, McMahon M (1997). **Raf-induced proliferation or cell cycle arrest is determined by the level of Raf activity with arrest mediated by p21Cip1.** *Mol Cell Biol* 17(9):5598-611.
- Wright JF, Guo Y, Quazi A, Luxenberg DP, Bennett F, Ross JF, Qiu Y, Whitters MJ, Tomkinson KN, Dunussi-Joannopoulos K, Carreno BM, Collins M, Wolfman NM (2007). **Identification of an interleukin 17F/17A heterodimer in activated human CD4+ T cells.** *J Biol Chem* 282(18):13447-55.
- Xu D, Rovira II, Finkel T (2002). **Oxidants painting the cysteine chapel: redox regulation of PTPs.** *Dev Cell* 2, 251-252.
- Xu L, Kitani A, Fuss I, Strober W (2007). **Cutting edge: Regulatory T cells induce CD4₊CD25⁺Foxp3⁺ T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta.** *J Immunol* 178:6725-6729.

- Yamaguchi Y, Nasu F, Harada A, Kunitomo M (2007). **Oxidants in the gas phase of cigarette smoke pass through the lung alveolar wall and raise systemic oxidative stress.** *J Pharmacol Sci* 103(3):275-82.
- Yan F, Williams S, Griffin GD, Jagannathan R, Plunkett SE, Shafer KH, Vo-Dinh T (2005). **Near-real-time determination of hydrogen peroxide generated from cigarette smoke.** *J Environ Monit* 7(7):681-7.
- Yan Z, Garg SK, Banerjee R (2010). **Regulatory T cells interfere with glutathione metabolism in dendritic cells and T cells.** *J Biol Chem* 285(53):41525-32.
- Yan Z, Garg SK, Kipnis J, Banerjee R (2009). **Extracellular redox modulation by regulatory T cells.** *Nat Chem Biol* 5(10):721-3.
- Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J, Anderson M, Schröder JM, Wang JM, Howard OM, Oppenheim JJ (1999). **B-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6.** *Science* 286: 525–528.
- Yang L, Anderson DE, Baecher-Allan C, Hastings WD, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK, Hafler DA (2008). **IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells.** *Nature* 454(7202):350-2.
- Yang XO (2007). **STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells.** *J Biol Chem* 282, 9358-9363.
- Yang XO, Pappu BP, Nurieva R, Akimzhanov A, Kang HS, Chung Y, Ma L, Shah B, Panopoulos AD, Schluns KS, Watowich SS, Tian Q, Jetten AM, Dong C (2008). **T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma.** *Immunity* 28(1):29-39.
- Yao Z, Painter SL, Fanslow WC, Ulrich D, Macduff BM, Spriggs MK, Armitage RJ (1995). **Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells.** *J Immunol* 155(12):5483-6.
- Ye J, Huang X, Hsueh EC, Zhang Q, Ma C, Zhang Y, Varvares MA, Hoft DF, Peng G (2012). **Human regulatory T cells induce T-lymphocyte senescence.** *Blood* 120(10):2021-31.
- Yen D, Cheung J, Scheerens H, Poulet F, McClanahan T, McKenzie B, Kleinschek MA, Owyang A, Mattson J, Blumenschein W, Murphy E, Sathe M, Cua DJ, Kastelein RA, Rennick D (2006). **IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6.** *J Clin Invest* 116(5):1310-6.
- Yokohori N, Aoshiba K, Nagai A (2004). **Increased levels of cell death and proliferation in alveolar wall cells in patients with pulmonary emphysema.** *Chest* 125:626-632.
- Yu XX, Mao W, Zhong A, Schow P, Brush J, Sherwood SW, Adams SH, Pan G (2000). **Characterization of novel UCP5/BMCP1 isoforms and differential regulation of UCP4 and UCP5 expression through dietary or temperature manipulation.** *FASEB J* 14(11):1611-1618.

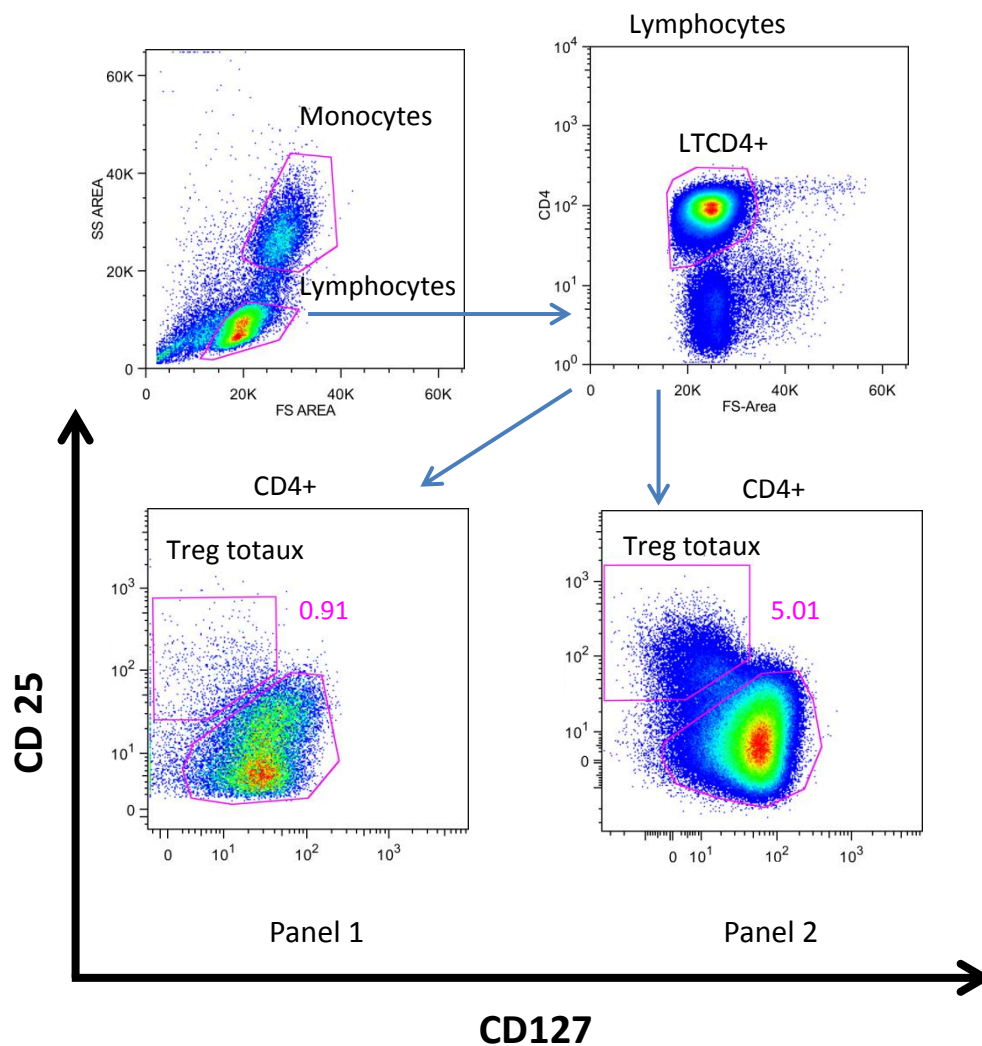
- Zdanov S, Remacle J, Toussaint O (2006). **Establishment of H₂O₂-induced premature senescence in human fibroblasts concomitant with increased cellular production of H₂O₂.** *Ann N Y Acad Sci* 1067:210-6.
- Zhang J, Chu S, Zhong X, Lao Q, He Z, Liang Y (2013). **Increased expression of CD4+IL-17+ cells in the lung tissue of patients with stable chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and smokers.** *Int Immunopharmacol* 15(1):58-66.
- Zhang Y, Zhou B (2012). **Functions of thymic stromal lymphopoietin in immunity and disease.** *Immunol Res* 52(3):211-23.
- Zhang Z, Zheng M, Bindas J, Schwarzenberger P, Kolls JK (2006). **Critical role of IL-17 receptor signaling in acute TNBS-induced colitis.** *Inflamm Bowel Dis* 12: 382–388.
- Zhao F, Hoechst B, Gamrekelashvili J, Ormandy LA, Voigtländer T, Wedemeyer H, Ylaya K, Wang XW, Hewitt SM, Manns MP, Korangy F, Greten TF (2012). **Human CCR4+ CCR6+ Th17 cells suppress autologous CD8+ T cell responses.** *J Immunol* 188(12):6055-62.
- Zheng W, Flavell RA (1997). **The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells.** *Cell* 89: 587–596.
- Zheng W, Wang H, Xue L, Zhang Z, Tong T (2004). **Regulation of cellular senescence and p16(INK4a) expression by Id1 and E47 proteins in human diploid fibroblast.** *J Biol Chem* 279(30):31524-32.
- Zheng Y, Danilenko DM, Valdez P, Kasman I, Eastham-Anderson J, Wu J, Ouyang W (2007). **Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis.** *Nature* 445, 648–651.
- Zhou L, Ivanov II, Spolski R, Min R, Shenderov K, Egawa T, Levy DE, Leonard WJ, Littman DR (2007). **IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways.** *Nat Immunol* 8(9):967-74.
- Zhu J, Paul WE (2010). **Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors.** *Immunol Rev* 238(1):247-62.
- Zhu J, Woods D, McMahon M, Bishop JM (1998). **Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf.** *Genes Dev* 12(19):2997-3007.
- Zhu X, Gadgil AS, Givelber R, George MP, Stoner MW, Scieurba FC, Duncan SR (2009). **Peripheral T cell functions correlate with the severity of chronic obstructive pulmonary disease.** *J Immunol* 182(5):3270-7.
- Zorn E, Nelson EA, Mohseni M, Porcheray F, Kim H, Litsa D, Bellucci R, Raderschall E, Canning C, Soiffer RJ et al. (2006). **IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo.** *Blood* 108:1571-9.

ANNEXES

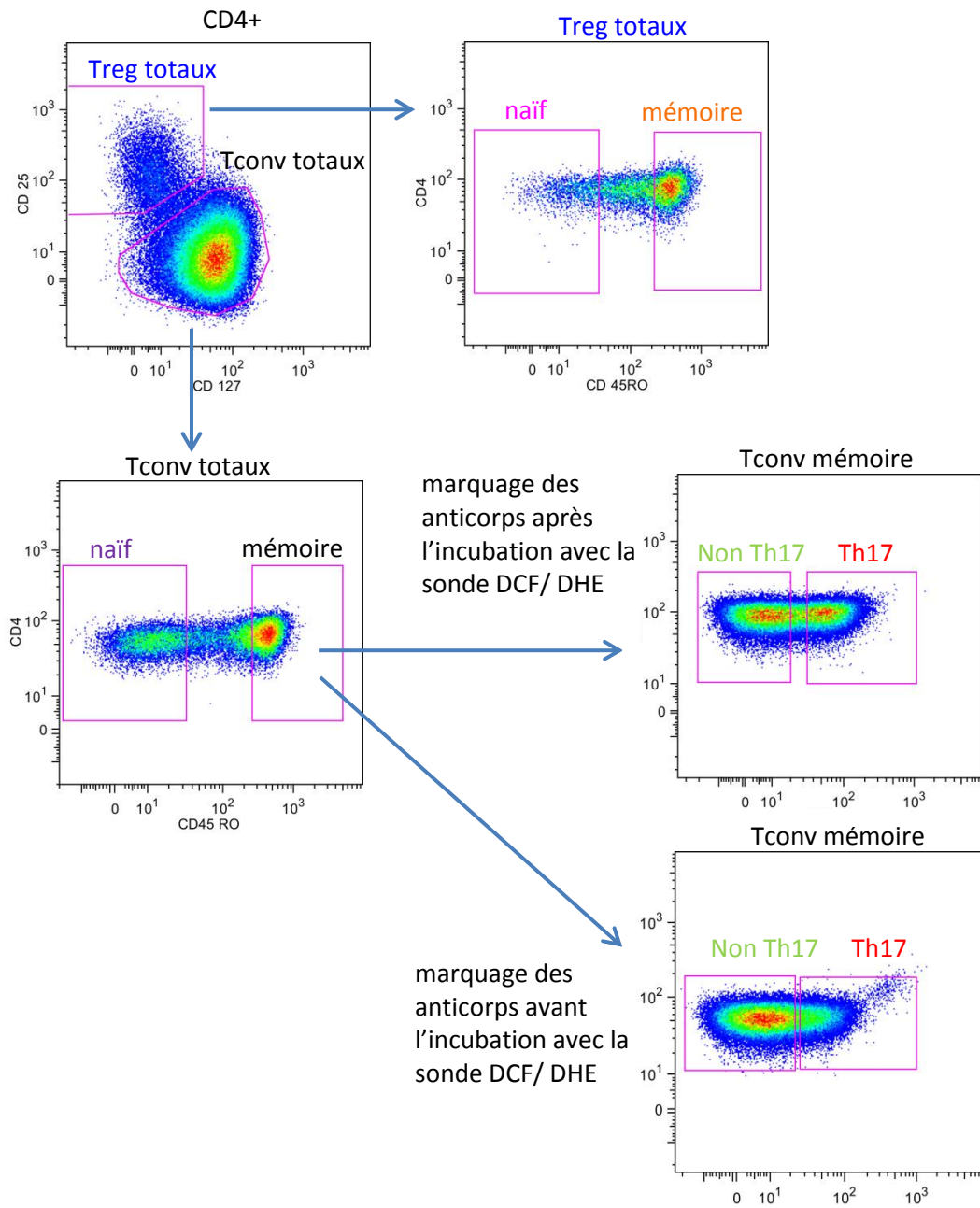
Résultats



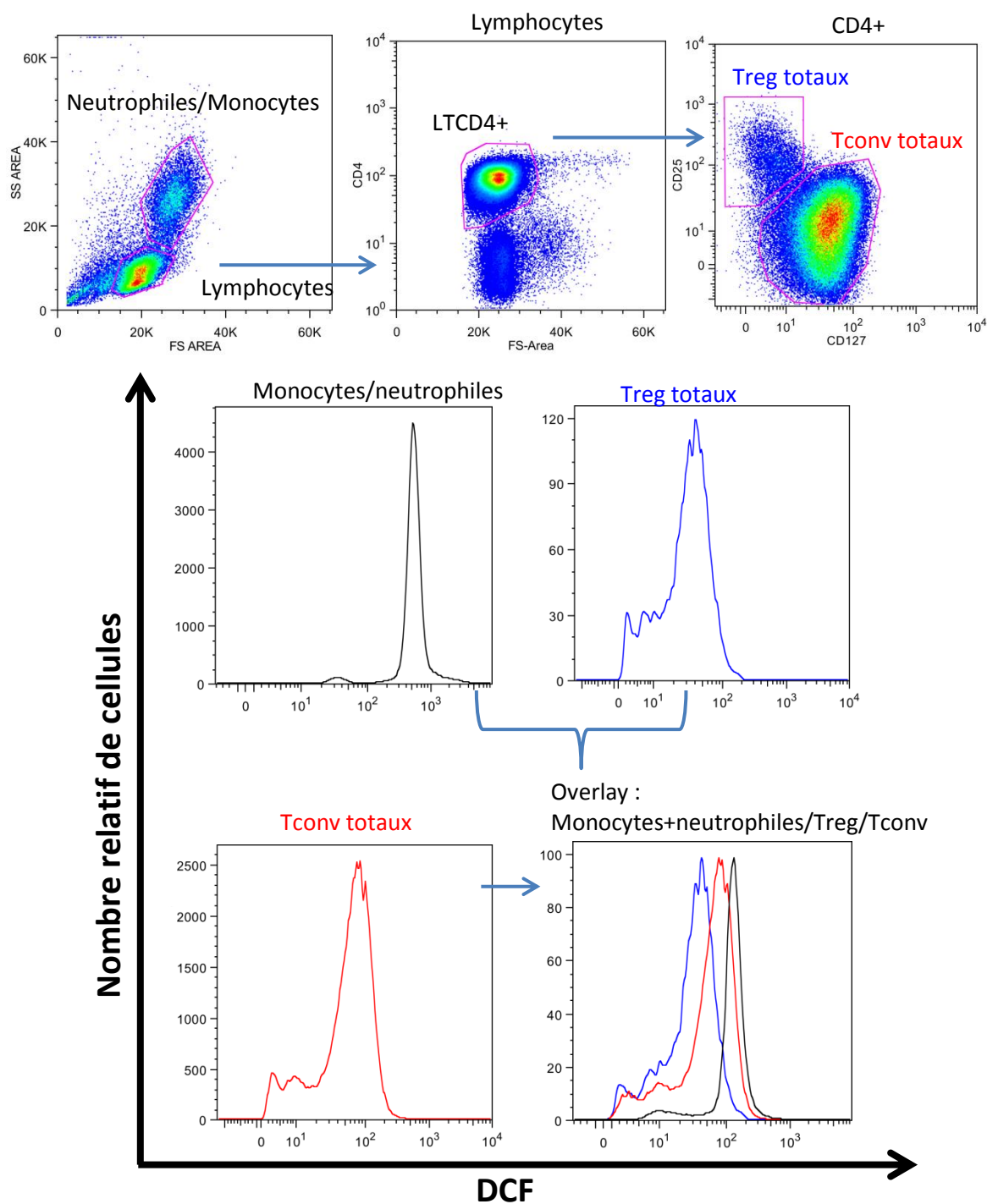
Résultat 1. Mise au point du marquage intracellulaire H₂DCF-DA. (A) Les PBMC totaux sont incubées avec 0,25μM de la sonde métabolique H₂DCF-DA pendant 30min à 37°C et à (B) 4°C. (A) La compensation est effectuée à 100% sur le canal adjacent (FL-2), la fluorescence est très importante. (B) La fluorescence de la sonde est soustraite de 35% dans FL-2, le marquage est visible.



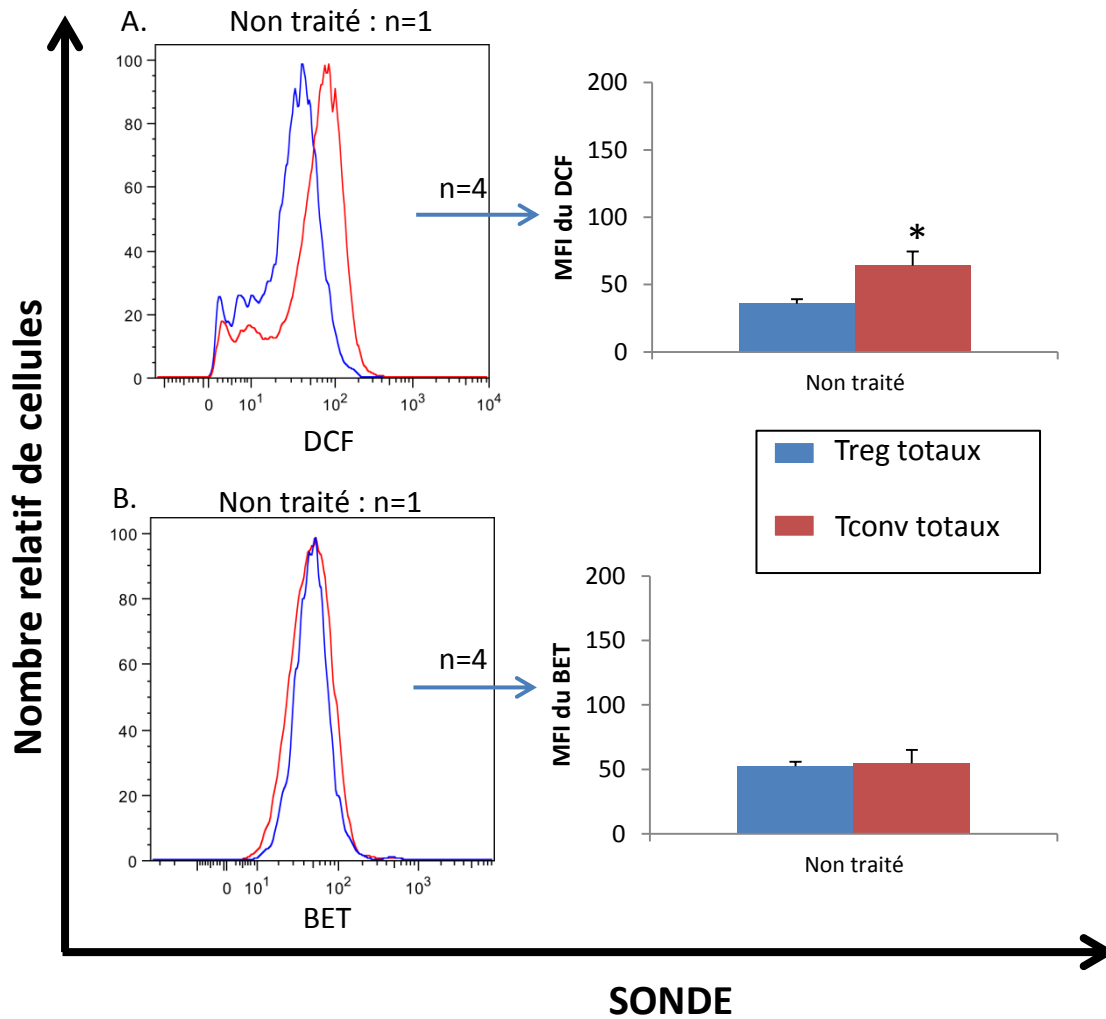
Résultat 2. Mise au point du multimarquage membranaire CD4/CD25/CD127. Les PBMC totaux d'un même donneur sont marqués avec deux combinaisons d'anticorps différentes, (A) Panel1 et (B) panel 2. (A) Les Treg totaux (ou nTreg totaux) du panel 1 sont estimés à 0,91% et la population n'est pas visible. (B) La population Treg se distingue du reste des cellules (Tconv), elle représente 5,01%.



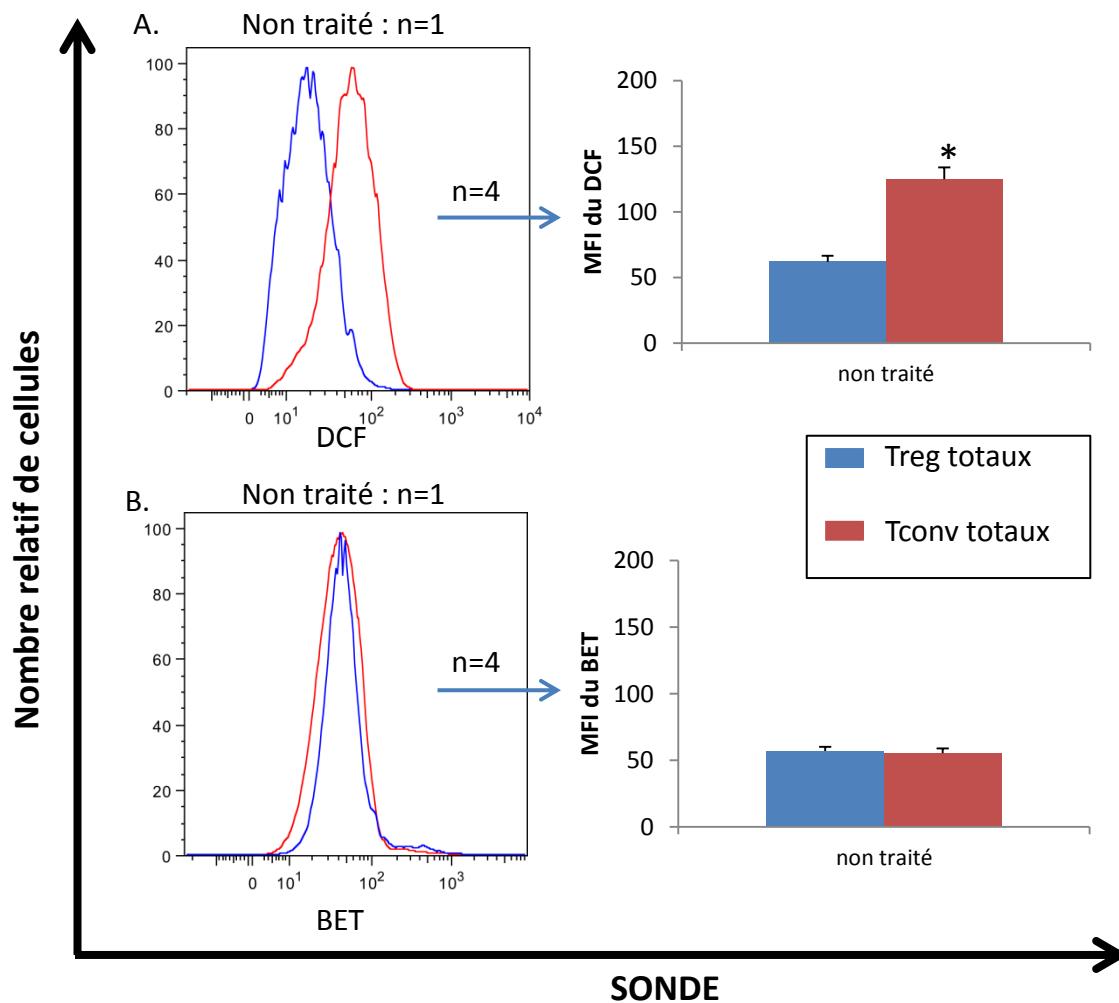
Résultat 3. Mise au point du multimarquage membranaire CD4/CD25/CD127 combinée à CCR6 et la sonde H₂DCF-DA. Les PBMC totaux d'un même donneur sont marqués avec les anticorps CD4 /CD25 /CD127 /CCR6. Ce marquage est effectué (A) post ou (B) avant l'incubation avec la sonde H₂DCF-DA. Les marquages CCR6 réalisés sur le même donneur sont différents. (A) Celui réalisé post incubation avec la sonde est optimale et celui réalisé avant (B) est plus faible.



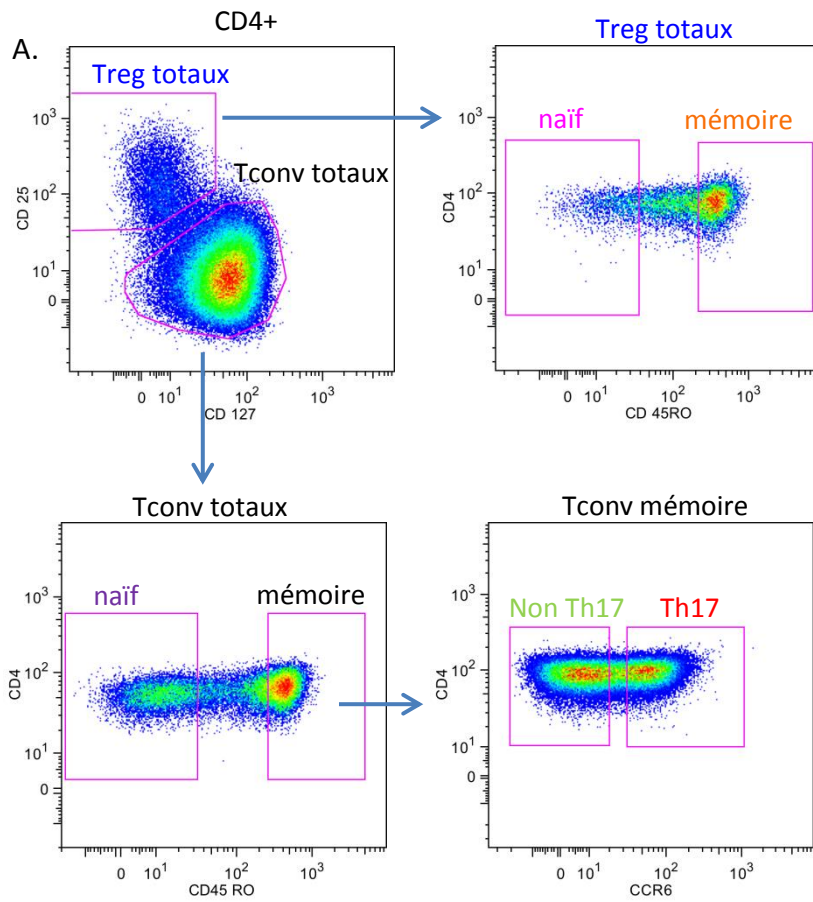
Résultat 4. Dosage d'ERO intracellulaire dans les sous-populations de LTCD4+ et les monocytes/neutrophiles en condition basale. Les PBMC totaux sont marqués au niveau membranaire (CD4/25/CD127) et intracellulaire avec H₂DCF-DA. La moyenne de fluorescence (MFI) de la sonde est visualisée dans les populations Treg, Tconv et monocytes/neutrophiles, n=1.



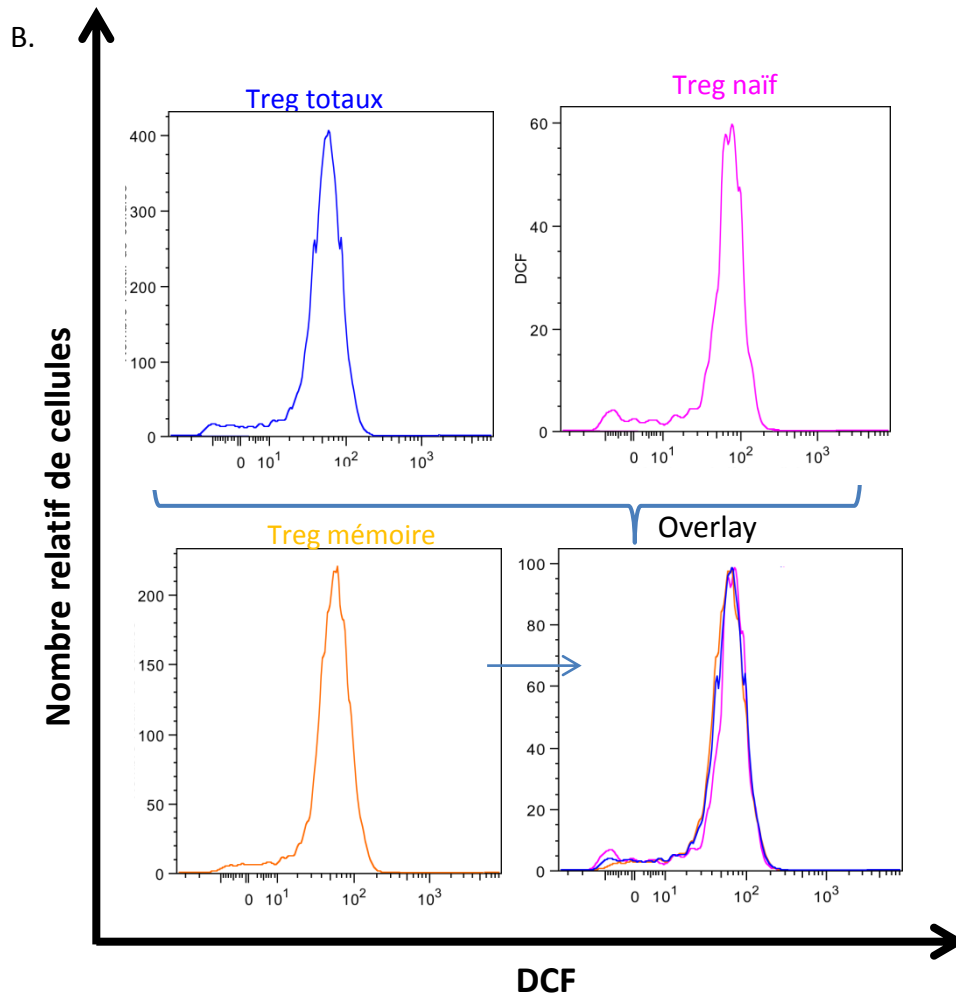
Résultat 5. Dosage d'ERO intracellulaire dans les sous-populations de LTCD4+ en condition basale. Les PBMC totaux sont marqués au niveau membranaire (CD4/25/CD127) et intracellulaire avec H₂DCF-DA (A) ou dihydroéthidine (DHE) (B) ; les résultats sont représentés pour n=1 et Moyenne +/-SEM n=4.



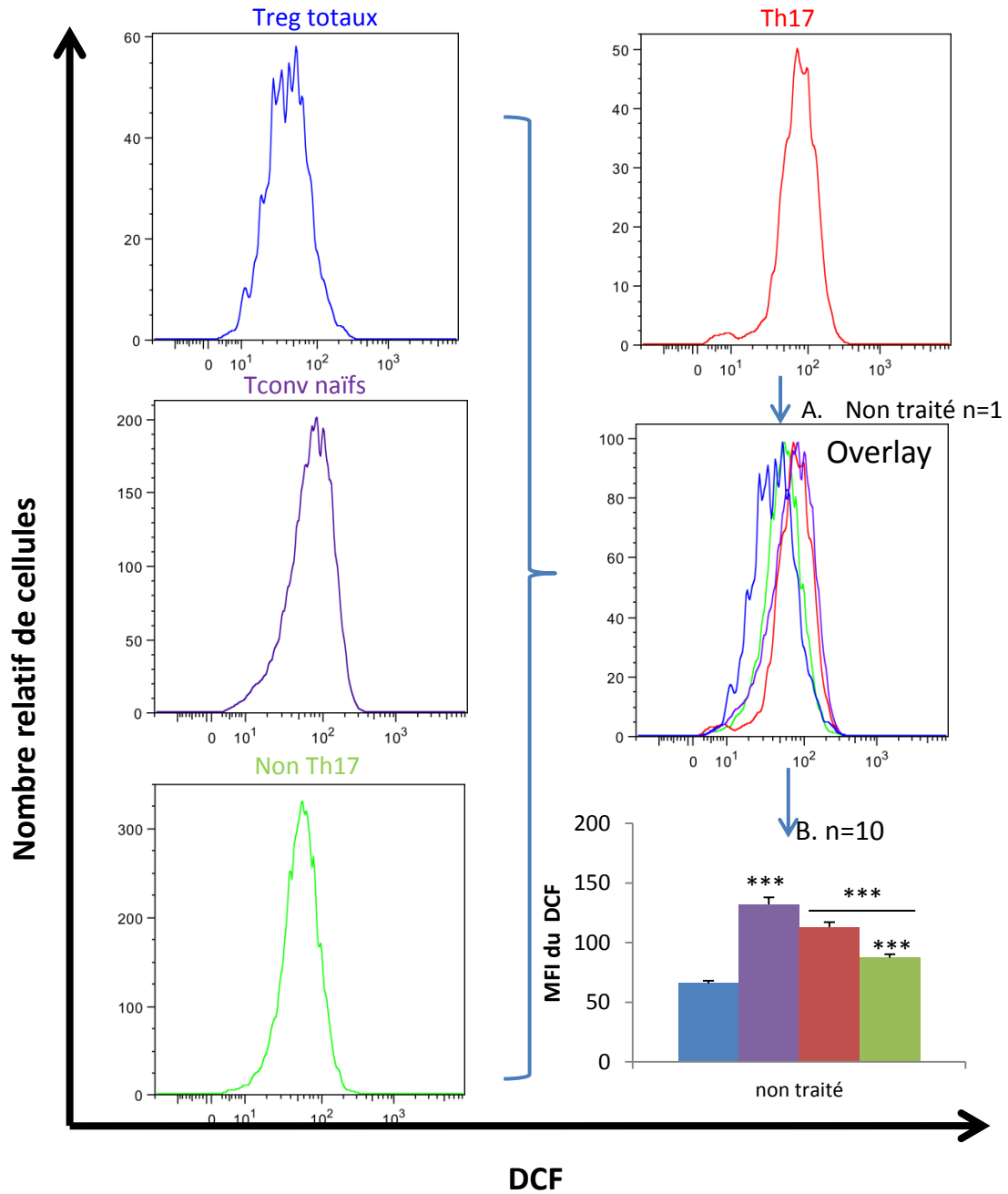
Résultat 6. Dosage d'ERO intracellulaire dans les sous-populations de LTCD4+ en condition basale. Les TCD4+ triés sont marqués au niveau membranaire (CD4/25/CD127) et intracellulaire avec H₂DCF-DA (A) ou (B) DHE, les résultats sont représentés pour n=1 et Moyenne +/-SEM n=4.



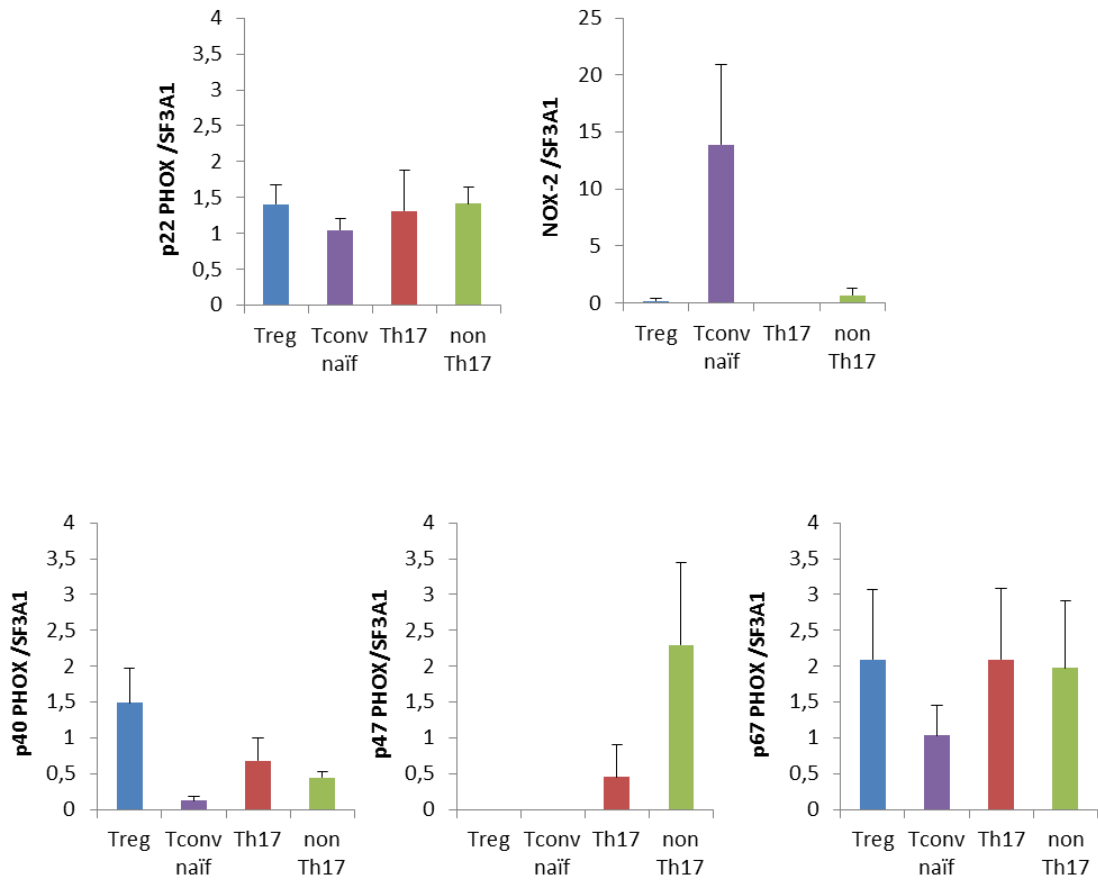
Résultat 7. Dosage d'ERO intracellulaire dans les sous-populations de Treg totaux, en condition basale. (A) Stratégie de l'analyse conditionnée pour l'identification des populations mémoires et naïves parmi les Treg et Tconv.



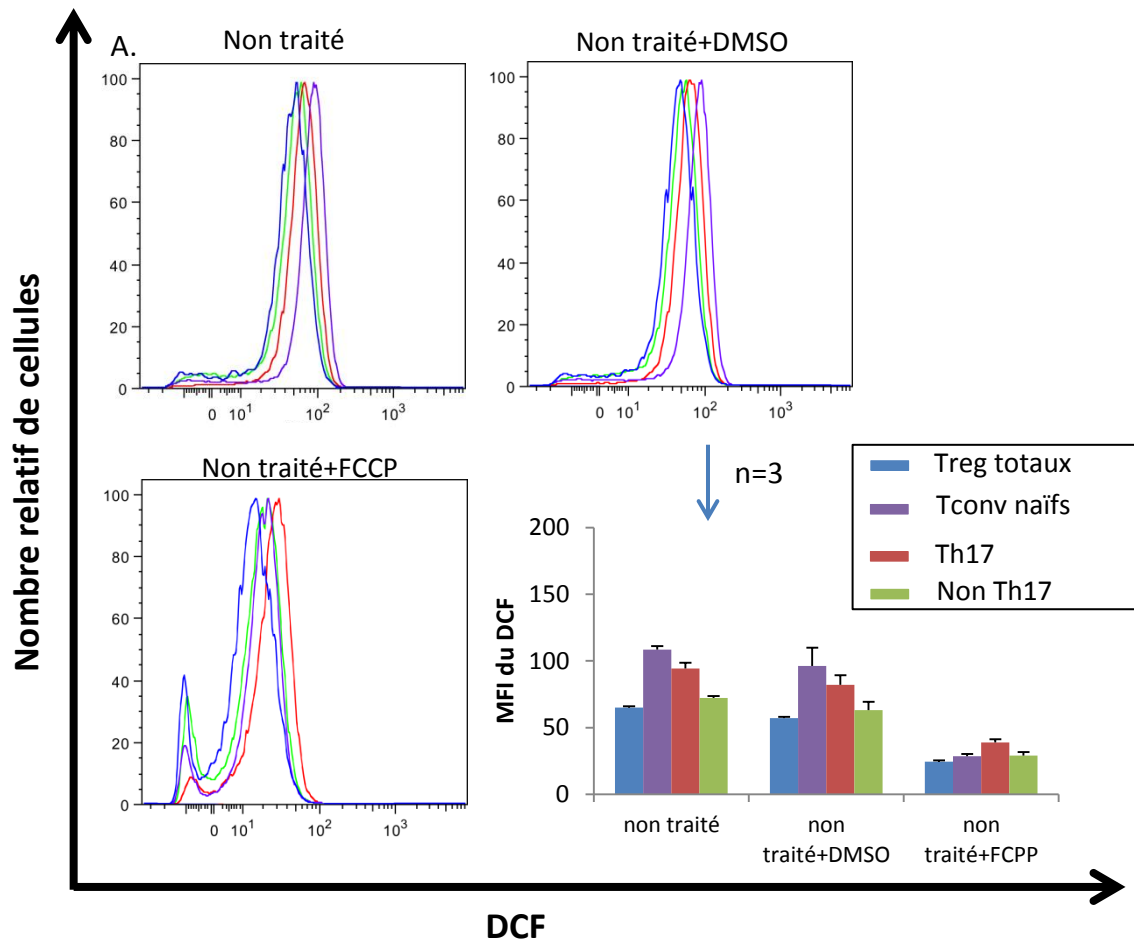
Résultat 7. Dosage d'ERO intracellulaire dans les sous-populations de Treg totaux, en condition basale. (B) Comparaison des MFI des Treg totaux par rapport aux Treg mémoires et naïfs ; n=1



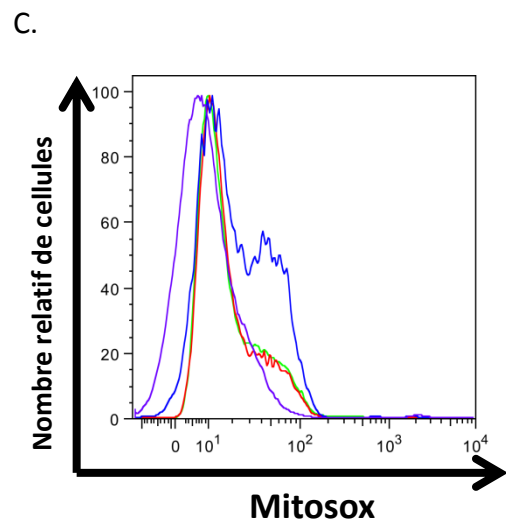
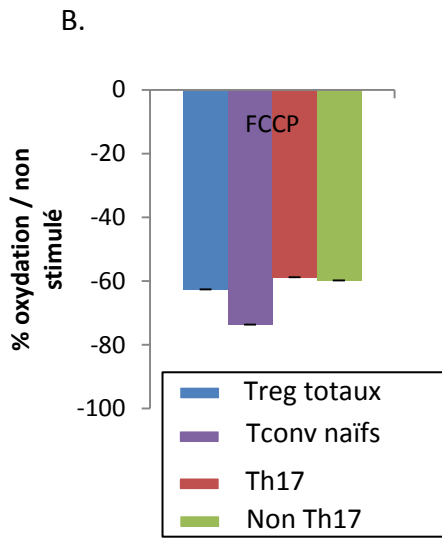
Résultat 8. Dosage d'ERO intracellulaire dans les sous-populations de LTCD4+ en condition basale. (A) Comparaison des MFI des Treg totaux, Tconv naïfs, Th17 et non Th17 n=1 (B) et Moyenne +/-SEM n=10. ; Mann-Whitney U test, Significativité *<p 0,05, **<p 0,01, ***<p 0,001 par rapport à Treg et Th17.



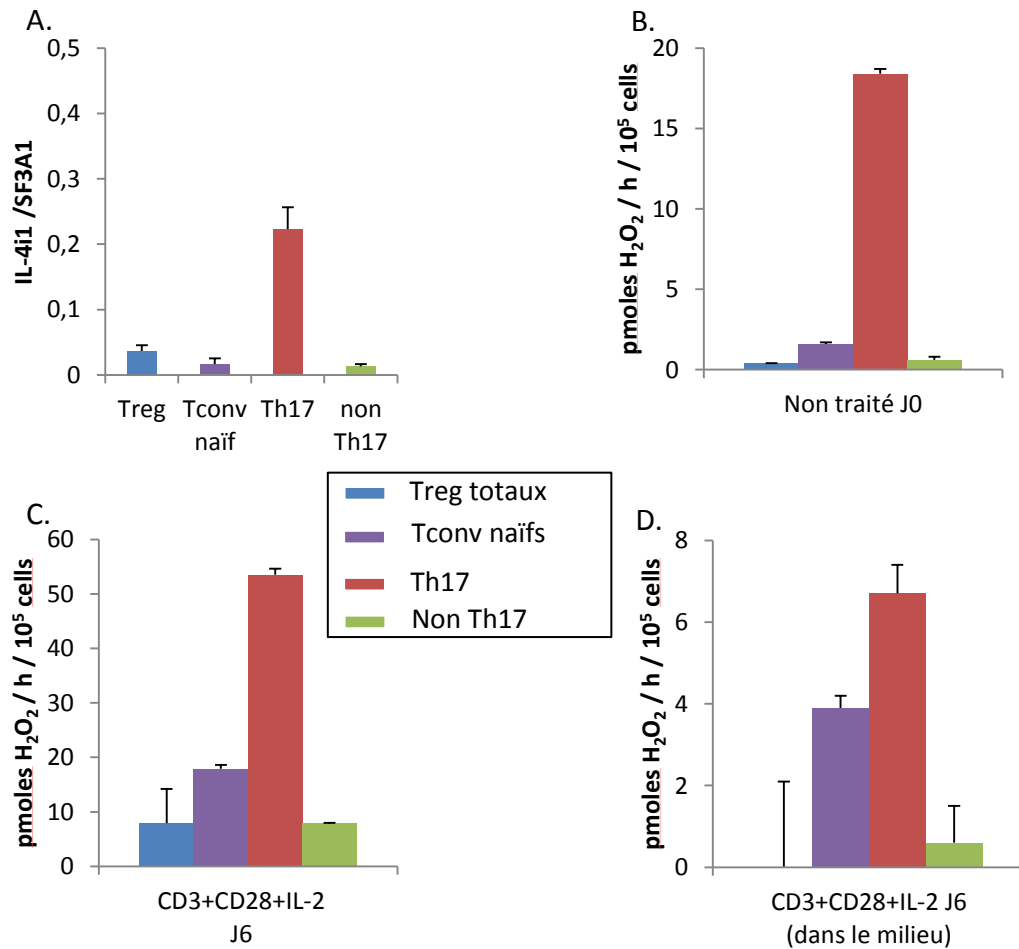
Résultat 9. Expression des gènes codant pour les sous-unités de la NADPH oxydase. Quantification de l'expression des sous-unités de la NADPH oxydase (p22phox, NOX2, p40-47-67 phox) par RT-qPCR, dans les sous-populations lymphocytaires isolées par un trieur de cellules, et Moyenne +/-SEM n=3.



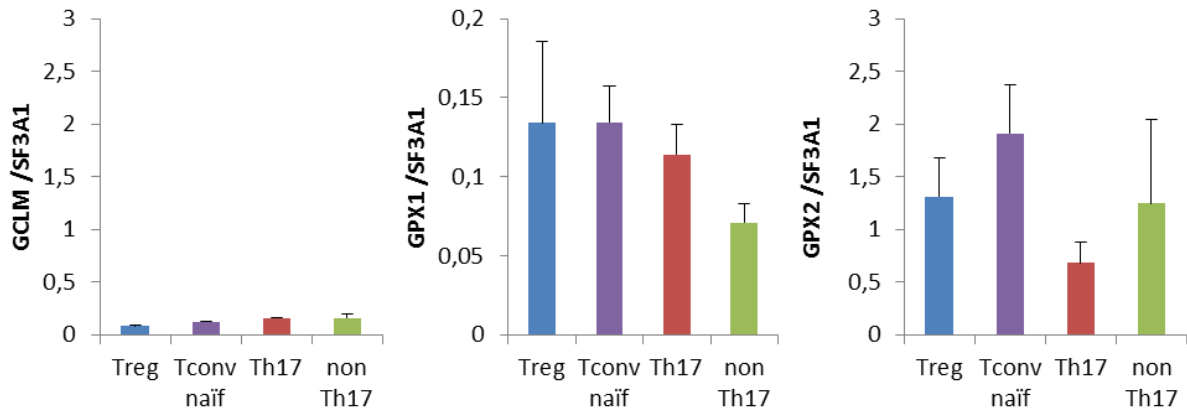
Résultat 10. Dosage d'ERO intracellulaire dans les sous-populations de LTCD4+ traitées +/- FCCP en condition basale, par le H₂DCF-DA lu en CMF. (A) Les TCD4+ triés magnétiquement, traités par 2 μ M de FCCP ou l'éluant seul (DMSO) puis marqués au niveau membranaire par anti-CD4/25/CD45RO/CCR6/ CD127, et intracellulaire avec H₂DCF-DA. Comparaison des MFI des Treg totaux, Tconv naïfs, Th17 et non Th17 n=1 et Moyenne +/- SEM n=3.



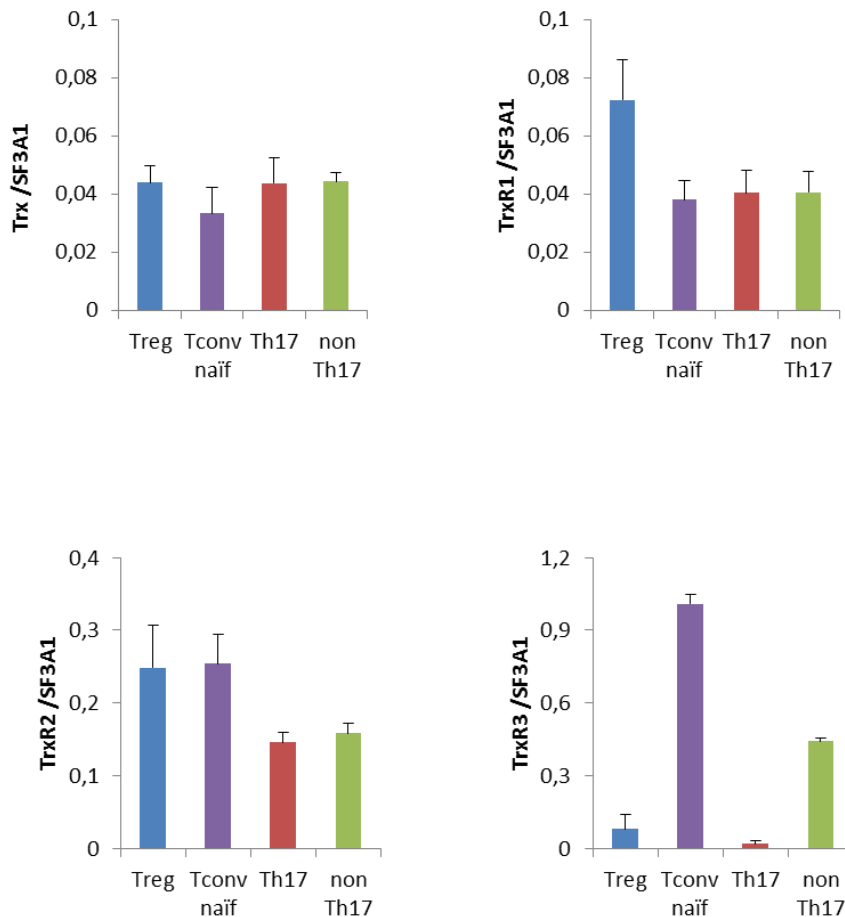
Résultat 10. Dosage d'ERO intracellulaire dans les sous-populations de LTCD4+ traitées +/- FCCP en condition basale, par le H₂DCF-DA lu en CMF. (B) % oxydation : (MFI traité -MFI non traité)/MFI non traité x 100.Moyenne+/- SEM. (C) Les TCD4+ triés magnétiquement sont traités par 2µM de la sonde MITOSOX.



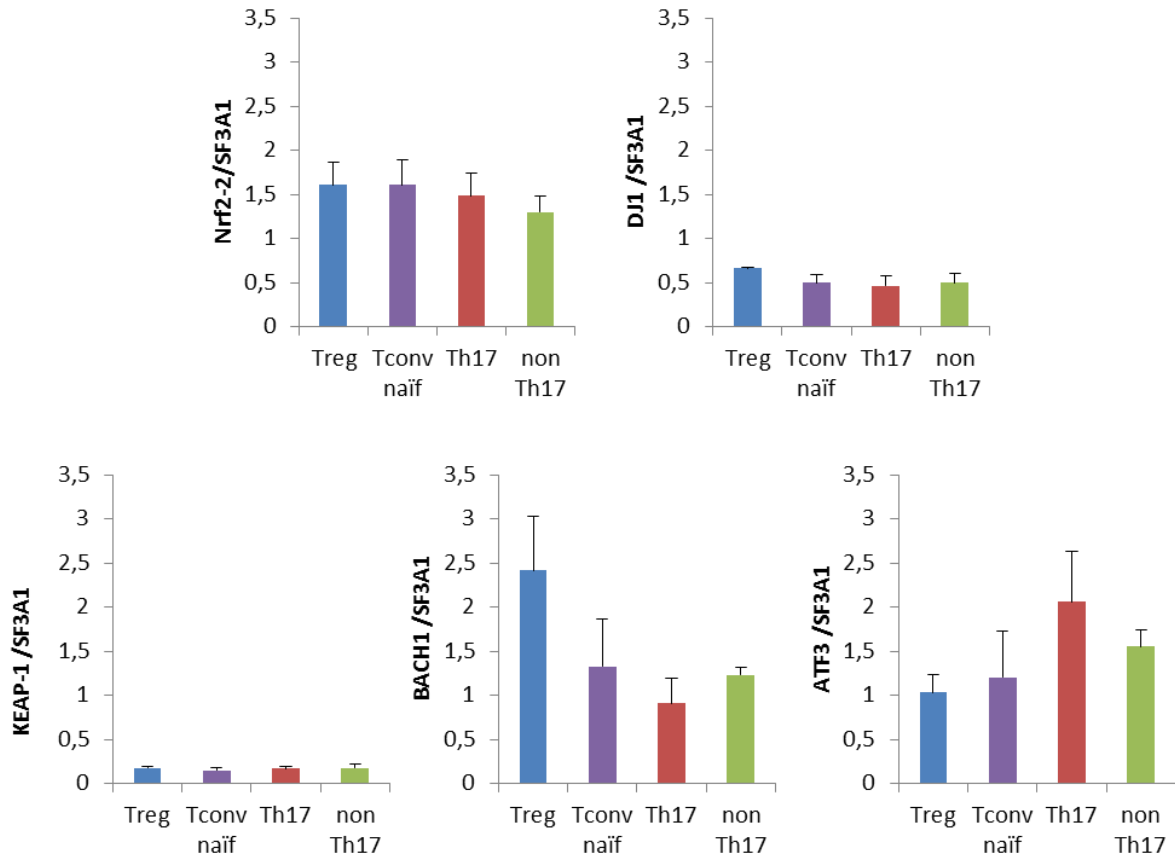
Résultat 11. Expression et dosage de l'activité IL-4i1. (A) Quantification de l'expression de l'IL-4i1 en condition basale par RT-qPCR, dans les sous-populations lymphocytaires isolées par un trieur de cellules, moyenne +/-SEM n=3. (B) Dosage de l'activité IL-4i1 par le kit ultra Amplex red sur 10⁵ cellules totales des populations cellulaires triées en l'absence de stimulation, après une stimulation de 6 jours avec de l'anti-CD3 (5 µg/ml, clone OKT3) + anti-CD28 (1 µg/ml) + IL-2(600 U/ml) (C) et dans le milieu de culture (D). Moyenne +/-SEM n=2.



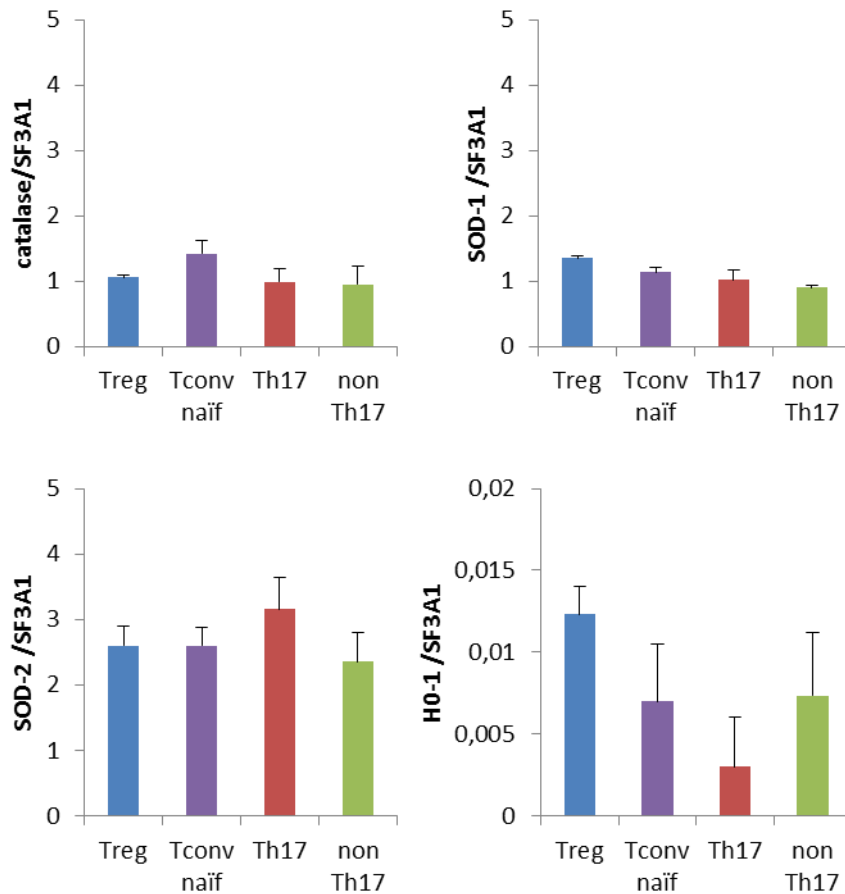
Résultat 12. Expression des gènes codant pour les enzymes impliquées le métabolisme du glutathion. Quantification des gènes (GCLM, GPX1-2) par RT-qPCR, dans les sous-populations lymphocytaires isolées par un trieur de cellules, moyenne +/-SEM n=3.



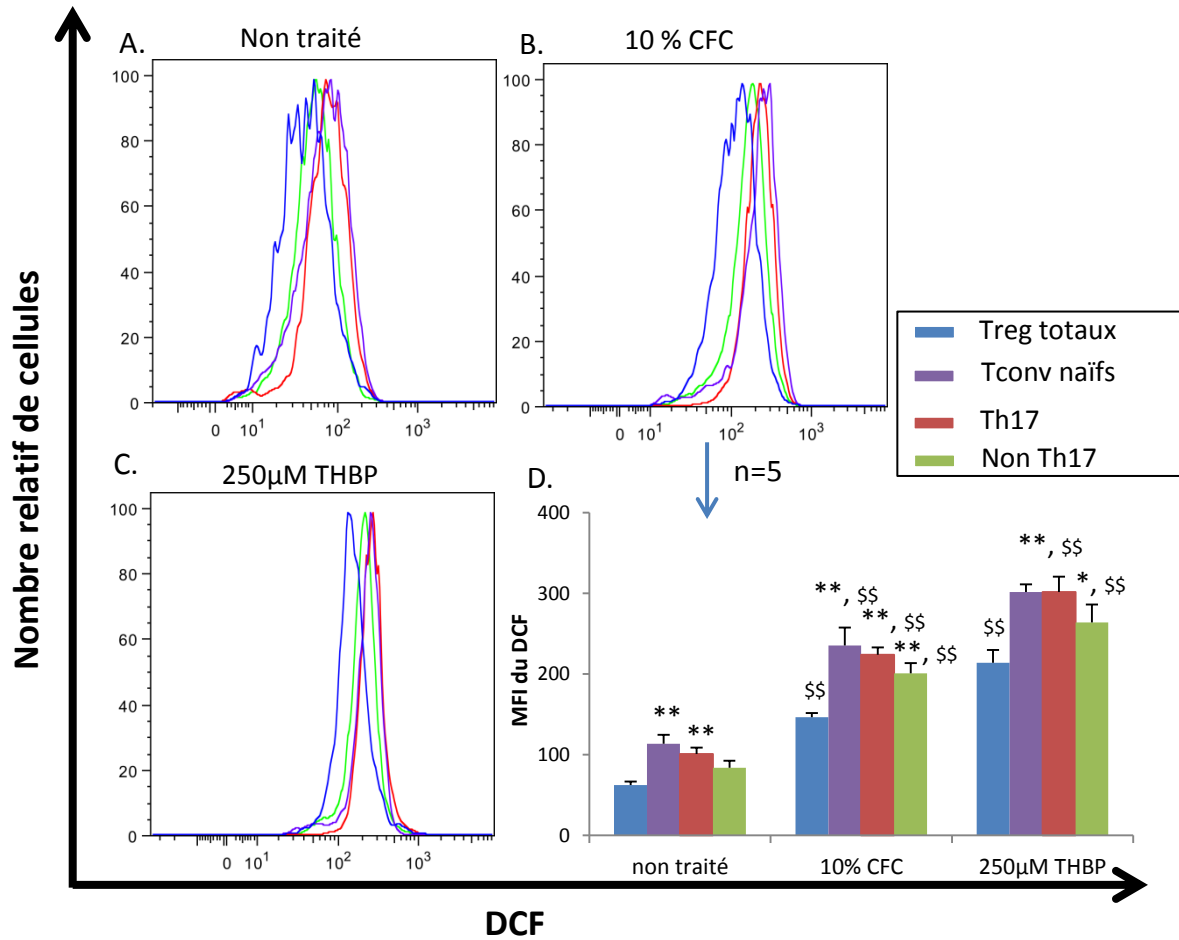
Résultat 13. Expression des gènes codant pour les enzymes impliquées dans le métabolisme de la thioredoxine. Quantification des gènes (Trx, TrxR1-3) par RT-qPCR, dans les sous-populations lymphocytaires isolées par un trieur de cellules, moyenne +/-SEM n=3.



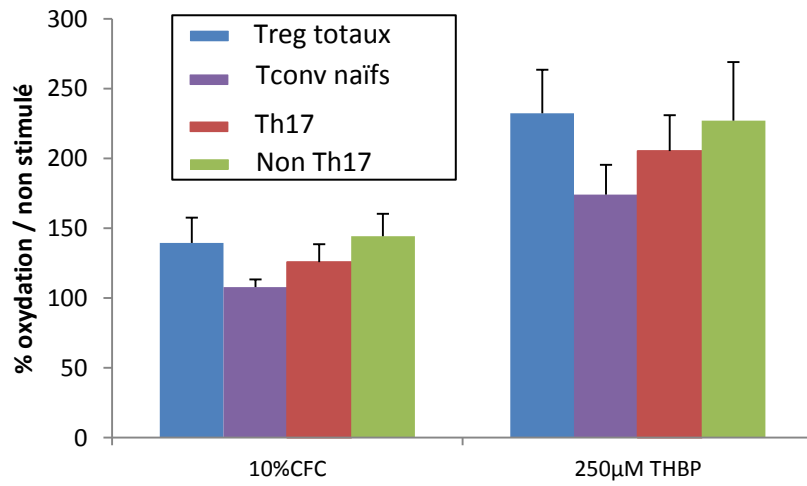
Résultat 14. Expression des gènes codant pour les régulateurs de Nrf2. Quantification des gènes (Nrf2, DJ-1, Keap1, Bach1 et ATF3) par RT-qPCR, dans les sous-populations lymphocytaires isolées par un trieur de cellules, moyenne +/-SEM n=3.



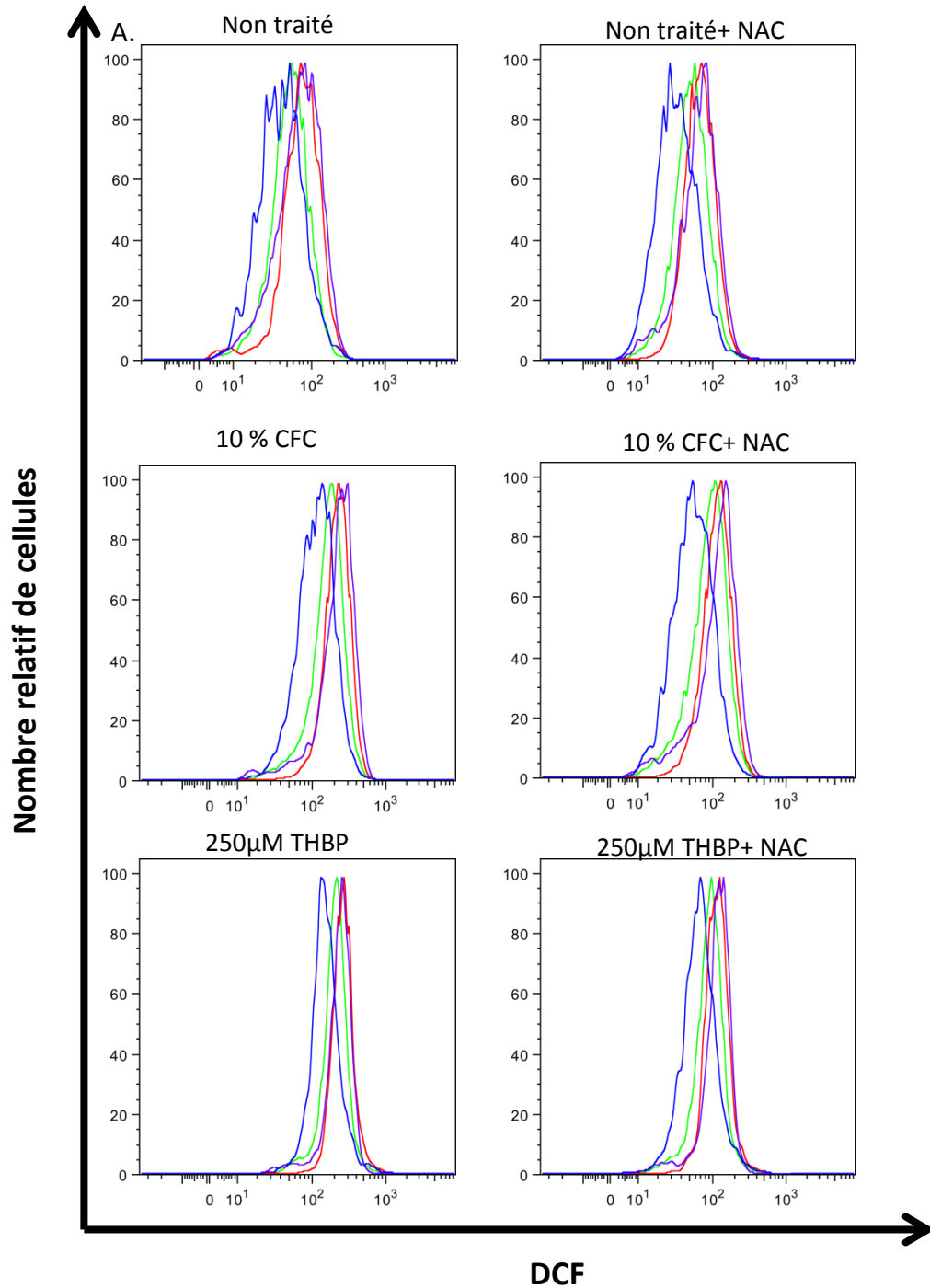
Résultat 15. Expression des gènes codant pour les enzymes anti-oxydantes. Quantification des gènes (catalase, SOD1-2 et HO-1) par RT-qPCR, dans les sous-populations lymphocytaires isolées par un trieur de cellules, moyenne +/-SEM n=3.



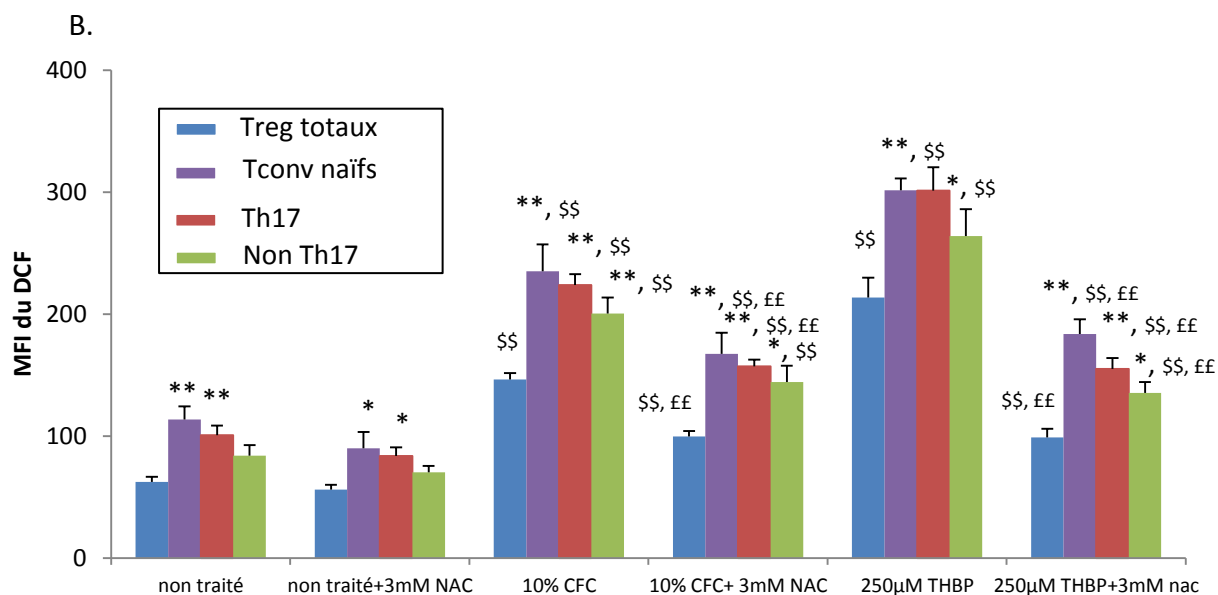
Résultat 16. Dosage d'ERO intracellulaires dans les sous-populations issus de LTCD4+ triés exposées +/- CFC ou +/- THBP. Les TCD4+ triés magnétiquement, traités ou (A) non par (B) 10% de condensat de fumée de cigarette (CFC) ou (C) 250µM THBP puis marqués au niveau membranaire par anti-CD4/25/CD45RO/CCR6/ CD127, et intracellulaire avec H₂DCF-DA, n=1 et (D) moyenne +/-SEM n=5; Mann-Whitney U test, Significativité *<p 0,05, **<p 0,01 par rapport à Treg ; \$<p 0,05, \$\$<p 0,01 par rapport au non traité.



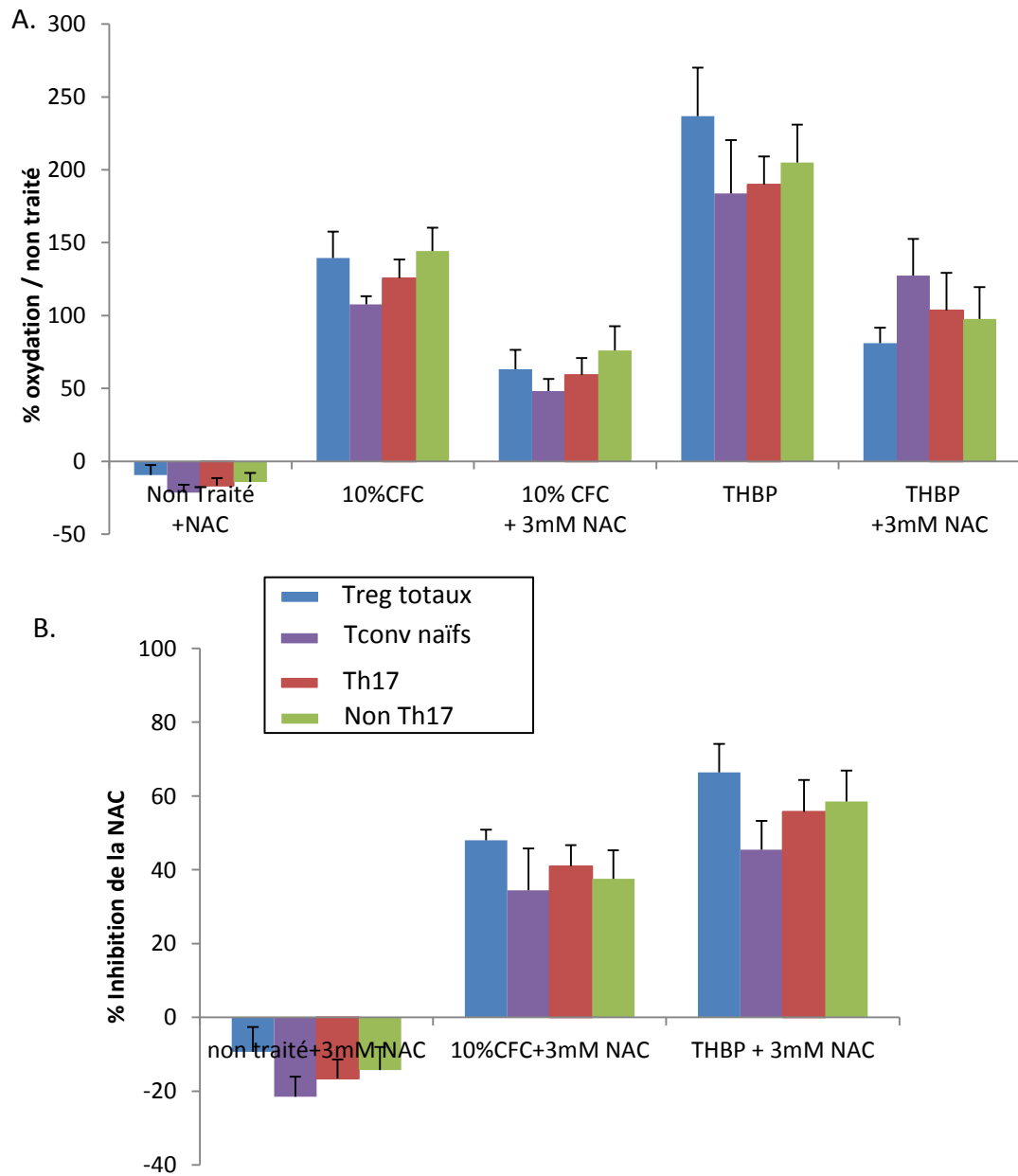
Résultat 17. Pourcentage d'oxydation de la sonde des cellules traitées (CFC, THBP) par rapport aux cellules non traitées. % oxydation : $(\text{MFI traité} - \text{MFI non traité}) / \text{MFI non traité} \times 100$. Moyenne \pm SEM. n=5



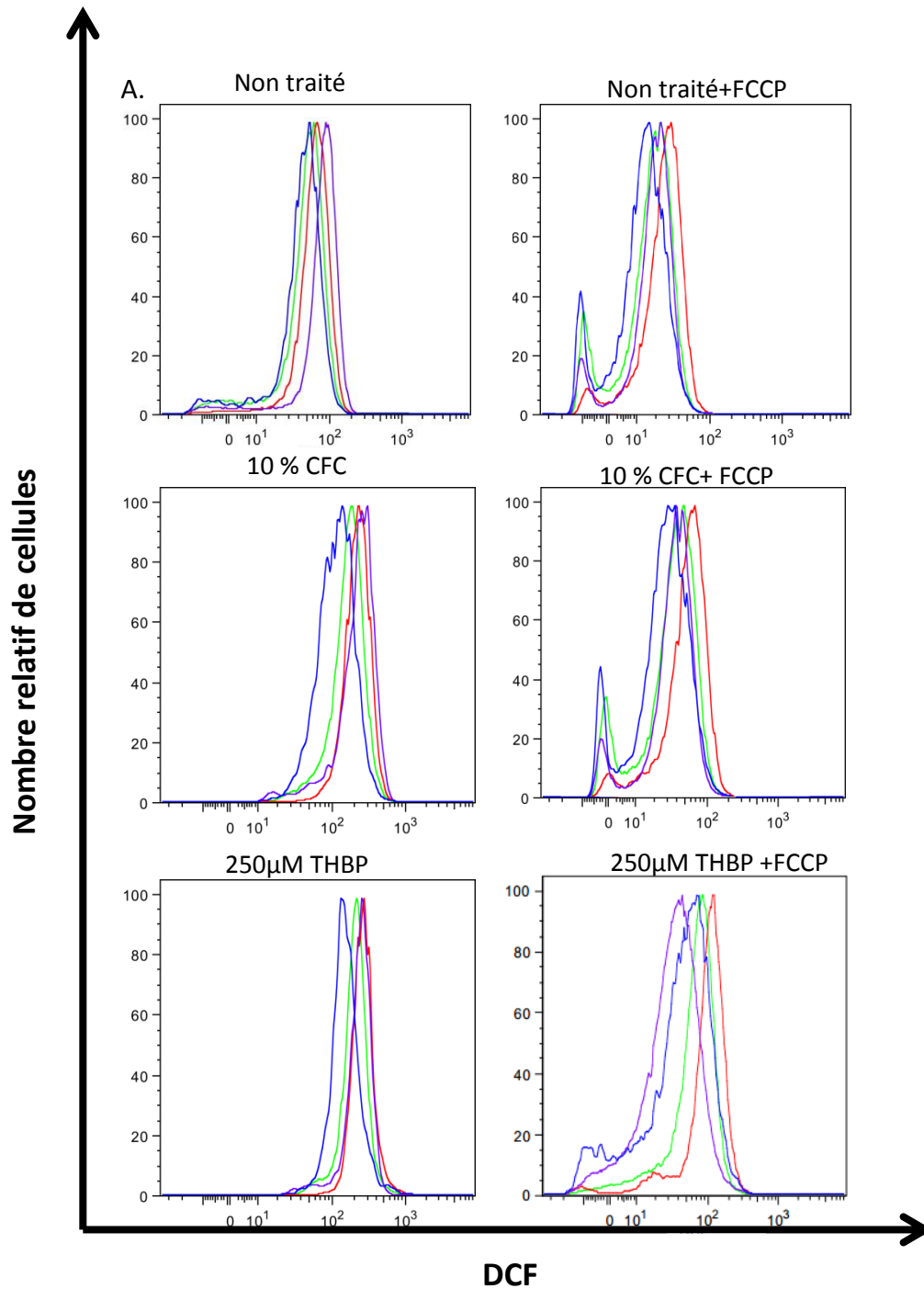
Résultat 18. Dosage d'ERO intracellulaires dans les sous-populations issus de LTCD4+ triés exposées +/- CFC ou +/- THBP +/- NAC. Les TCD4+ triés magnétiquement, sont pré incubées 2h avec 3mM de NAC puis sont traités ou (A) non par 10% de condensat de fumée de cigarette (CFC) ou 250µM THBP puis marqués au niveau membranaire par anti-CD4/25/CD45RO/CCR6/ CD127, et intracellulaire avec H₂DCF-DA, n=1



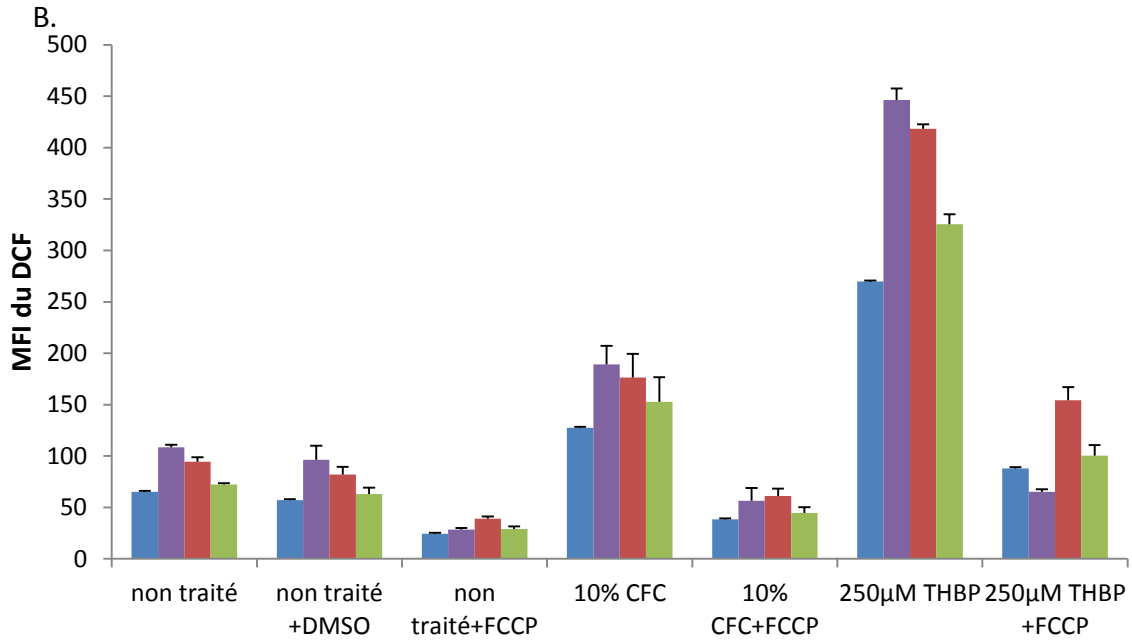
Résultat 18. Dosage d'ERO intracellulaires dans les sous-populations issus de LTCD4+ triés exposés +/- CFC ou +/- THBP +/- NAC. Les TCD4+ triés magnétiquement, sont pré incubés 2h avec 3mM de NAC puis sont traités ou (B) non par 10% de condensat de fumée de cigarette (CFC) ou 250µM THBP puis marqués au niveau membranaire par anti-CD4/25/CD45RO/CCR6/ CD127, et intracellulaire avec H₂DCF-DA, moyenne +/-SEM n=5; Mann-Whitney U test, Significativité *<p 0,05, **<p 0,01 par rapport à Treg ; \$<p 0,05, \$\$<p 0,01 par rapport au non traité ; £<p 0,05, ££<p 0,01 effet de la NAC.



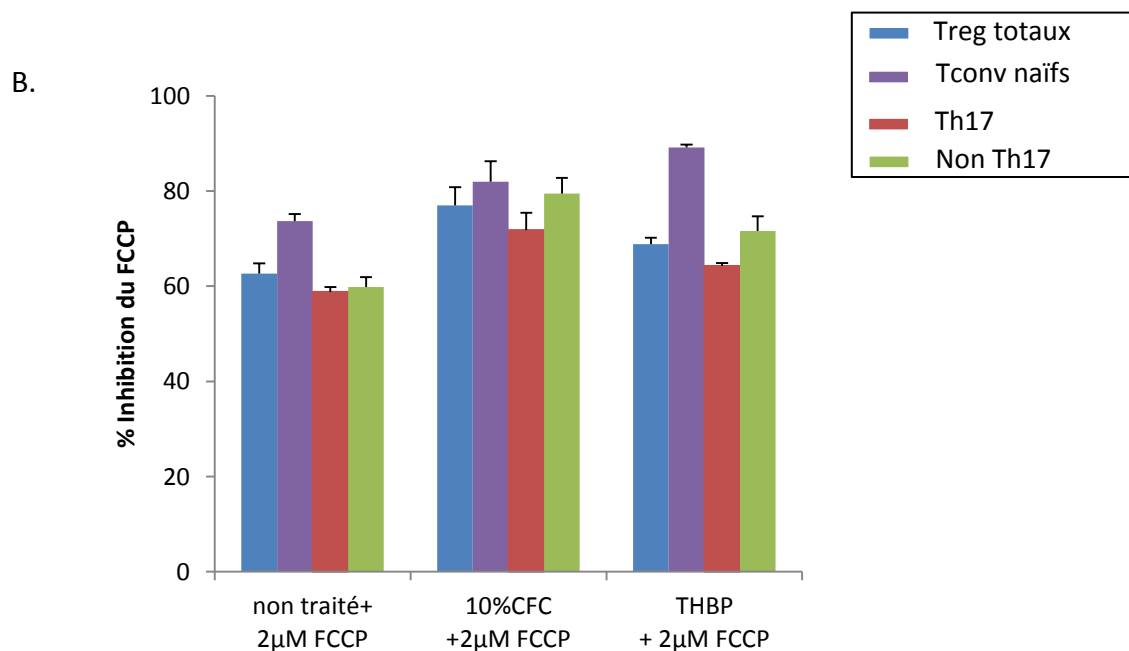
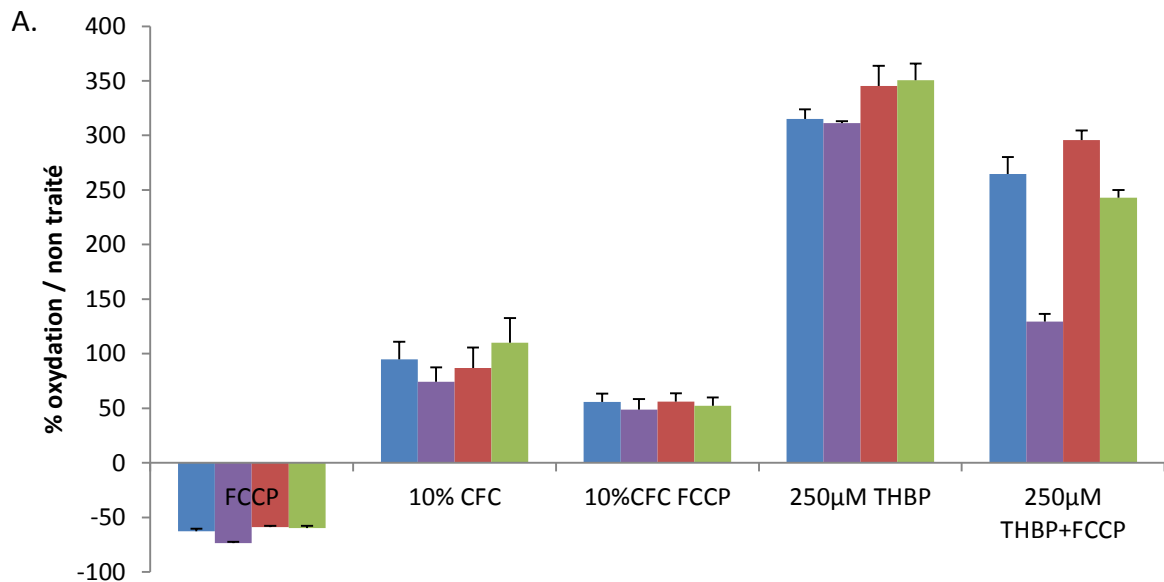
Résultat 19. Pourcentage d'oxydation de la sonde des cellules traitées (CFC, THBP, NAC) par rapport aux cellules non traitées et effet de la NAC. (A) % oxydation : $(\text{MFI traité} - \text{MFI non traité}) / \text{MFI non traité} \times 100$. Moyenne \pm SEM. $n=5$. (B) % inhibition de la NAC : $(\text{MFI traité CFC ou THBP NAC} - \text{MFI non traité NAC}) / \text{MFI non traité NAC} \times 100$.



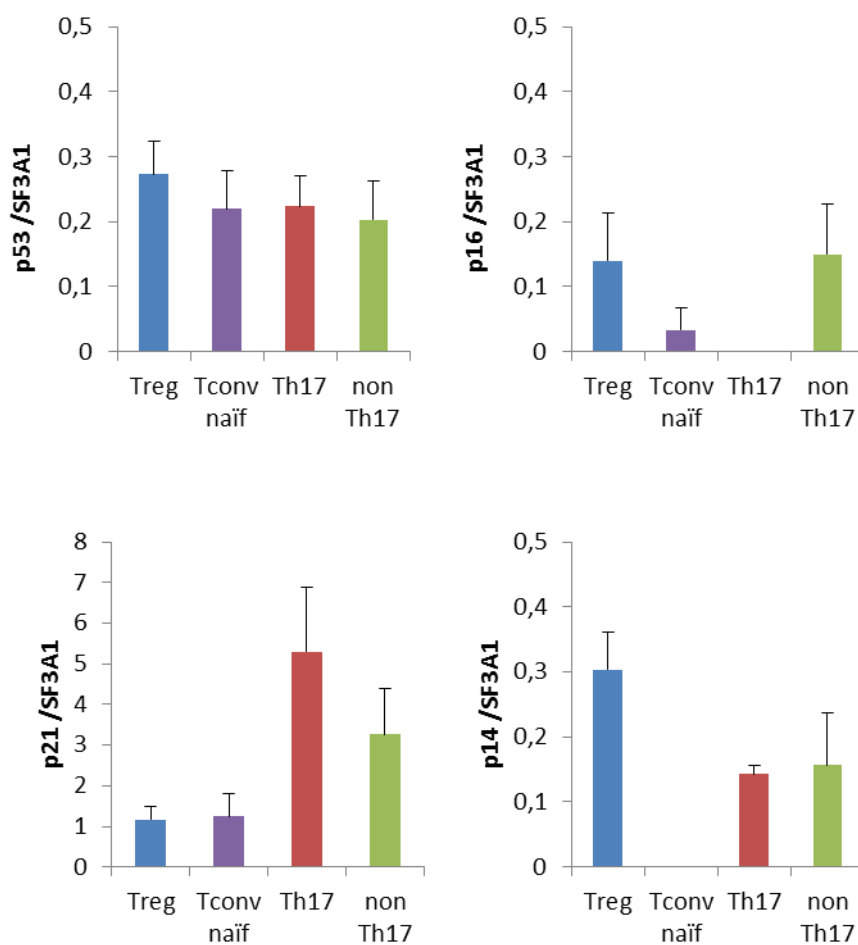
Résultat 20. Dosage d'ERO intracellulaires dans les sous-populations issus de LTCD4+ triés exposés +/- CFC ou +/- THBP +/- FCCP. Les TCD4+ triés magnétiquement, sont pré incubées 2h avec 2µM de FCCP puis sont traités ou (A) non par 10% de condensat de fumée de cigarette (CFC) ou 250µM THBP puis marqués au niveau membranaire par anti-CD4/25/CD45RO/CCR6/ CD127, et intracellulaire avec H₂DCF-DA, n=1



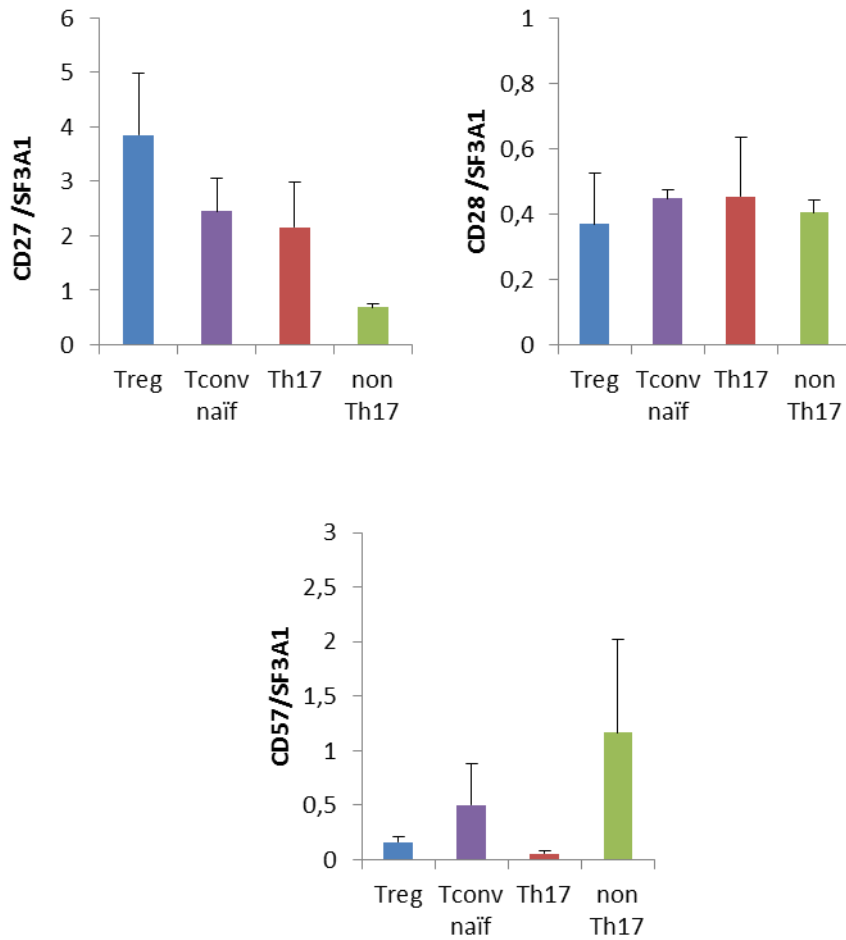
Résultat 20. Dosage d'ERO intracellulaires dans les sous-populations issus de LTCD4+ triés exposées +/- CFC ou +/- THBP +/- FCCP. Les TCD4+ triés magnétiquement, sont pré incubées 2h avec 2µM de FCCP puis sont traités ou (B) non par 10% de condensat de fumée de cigarette (CFC) ou 250µM THBP puis marqués au niveau membranaire par anti-CD4/25/CD45RO/CCR6/ CD127, et intracellulaire avec H₂DCF-DA, moyenne +/-SEM n=3



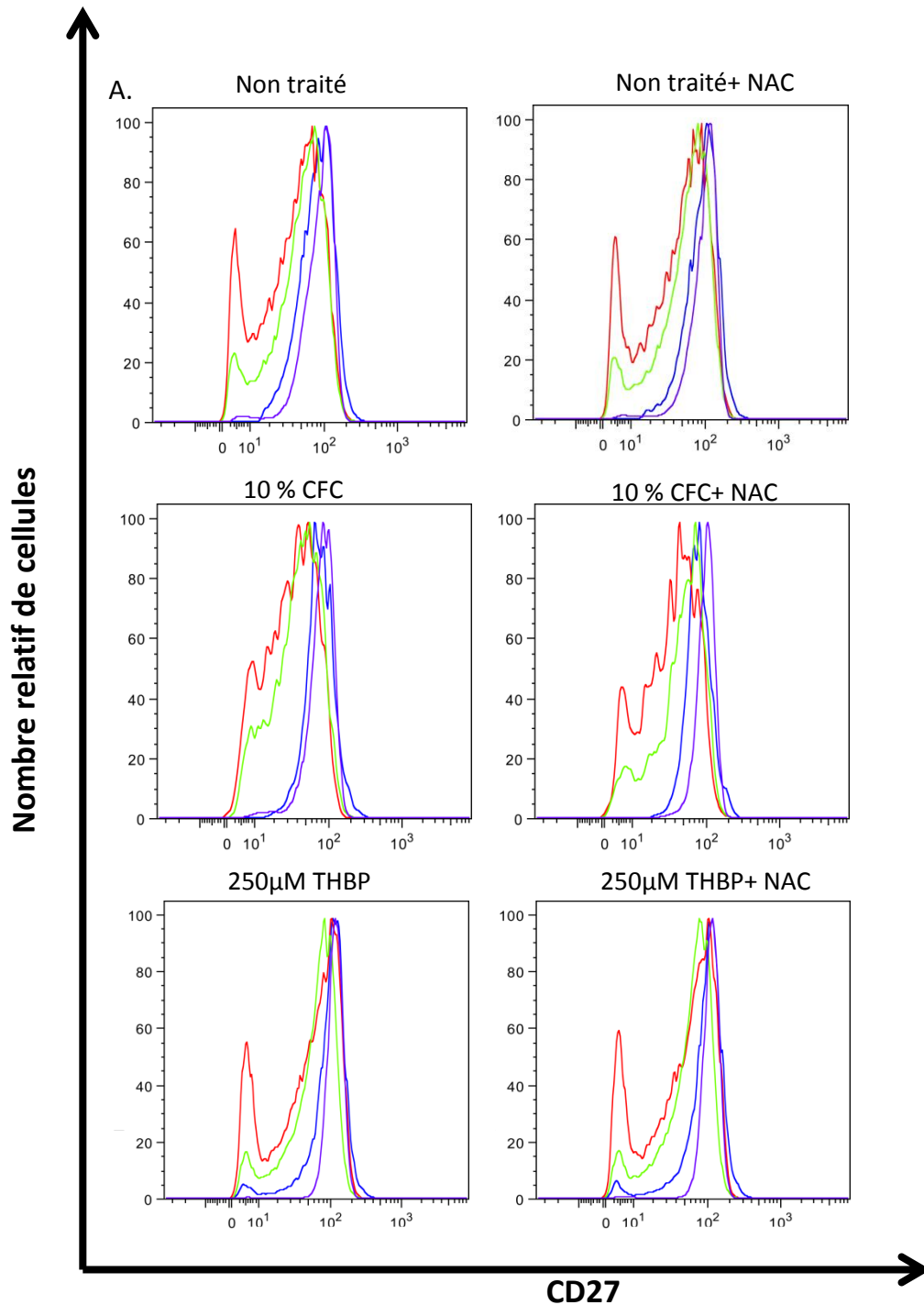
Résultat 21. Pourcentage d'oxydation de la sonde des cellules traitées (CFC, THBP, FCCP) par rapport aux cellules non traitées et effet du FCCP. (A) % oxydation : $(\text{MFI traité} - \text{MFI non traité}) / \text{MFI non traité} \times 100$. Moyenne \pm SEM. n=3. (B) % inhibition du FCCP : $(\text{MFI traité CFC ou THBP FCCP} - \text{MFI non traité FCCP}) / \text{MFI non traité FCCP} \times 100$.



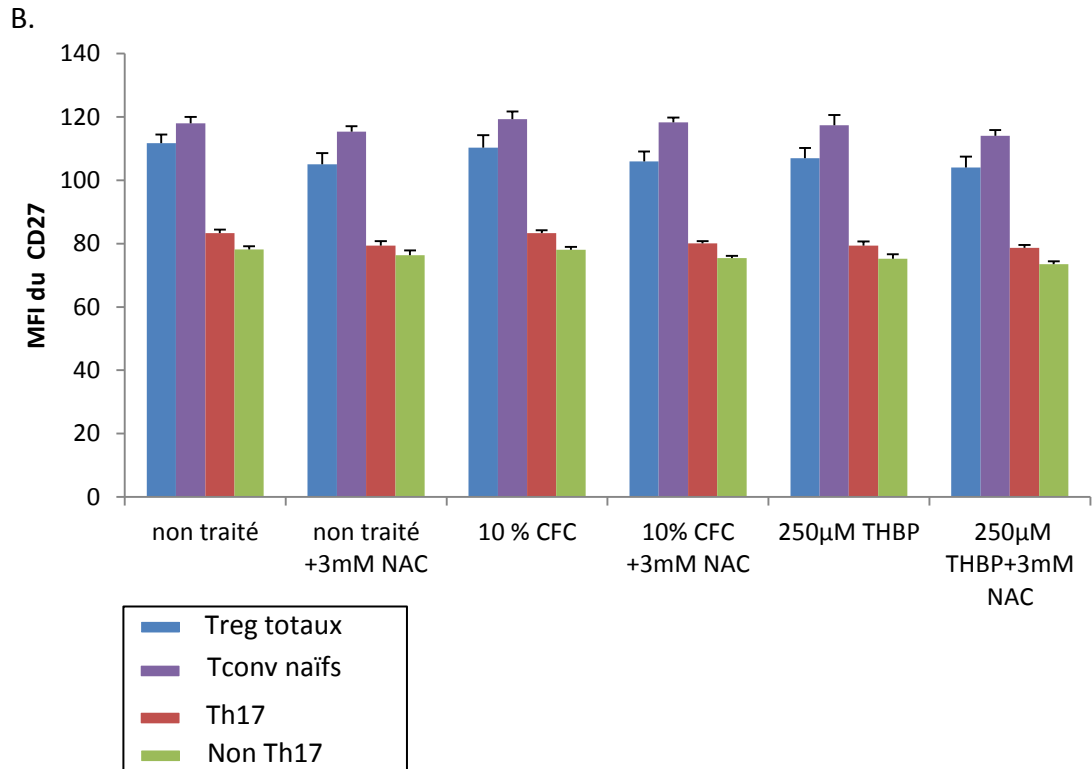
Résultat 22. Expression des gènes codant pour les marqueurs de sénescence. Quantification des gènes (p53, p21, p16 et p14) par RT-qPCR, dans les sous-populations lymphocytaires isolées, en condition basale par un trieur de cellules, moyenne +/-SEM n=3.



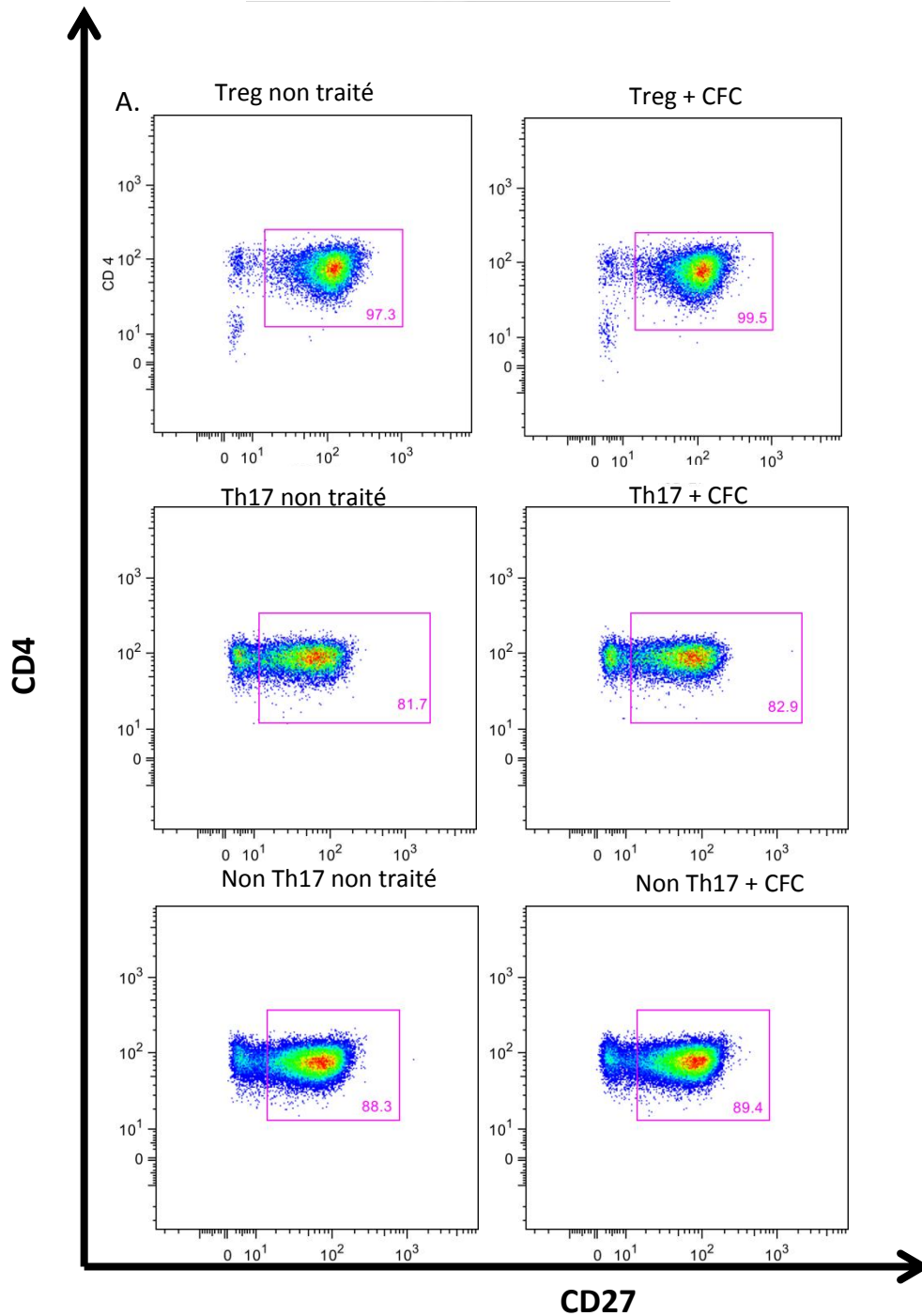
Résultat 23. Expression des gènes codant pour les marqueurs d'immunosénescence. Quantification des gènes (CD27, 28 et 57) par RT-qPCR, dans les sous-populations lymphocytaires isolées par un trieur de cellules, moyenne +/-SEM n=3.



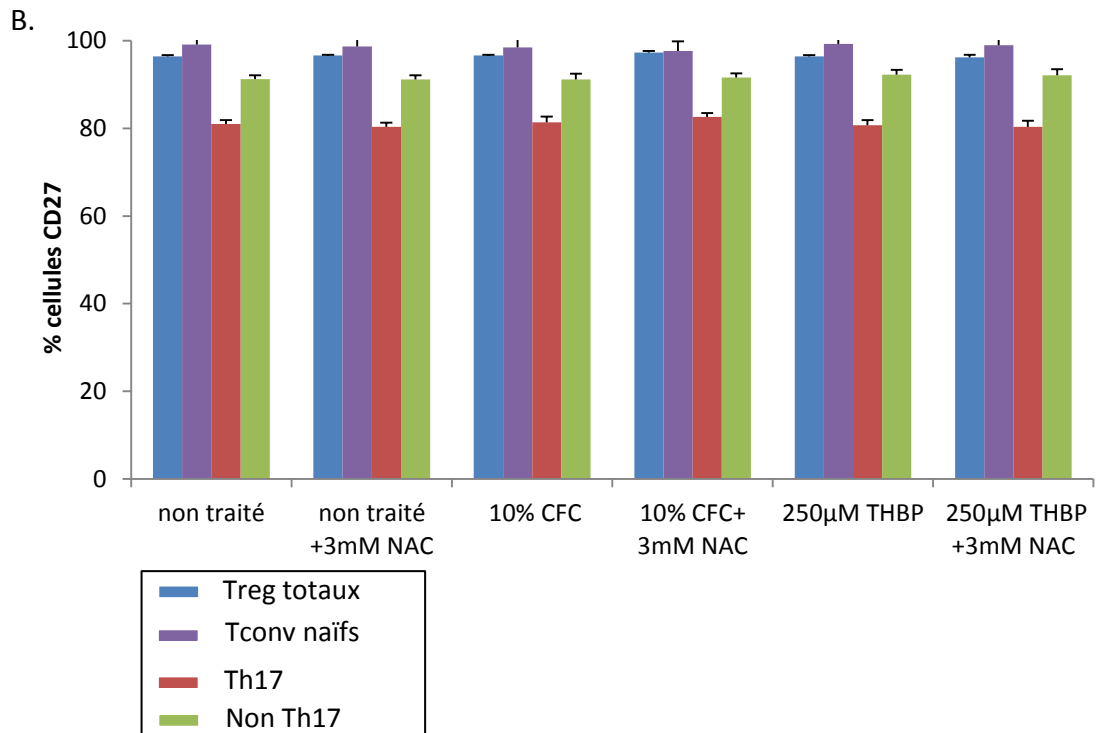
Résultat 24. Expression de CD27 dans les sous-populations au sein de LTCD4+triés. Les TCD4+ triés magnétiquement, sont pré incubées ou non 2h avec 3mM de NAC puis sont traités ou (A) non par 10% de condensat de fumée de cigarette (CFC) ou 250µM THBP puis marqués au niveau membranaire par anti-CD4/25/CD45RO/CCR6/ CD127, et l'anti-CD27, Comparaison des MFI CD27 des Treg totaux, Tconv naïfs, Th17 et non Th17n=1



Résultat 24. Expression de CD27 dans les sous-populations au sein de LTCD4+ triés. Les TCD4+ triés magnétiquement, sont pré incubées ou non 2h avec 3mM de NAC puis sont traités ou (B) non par 10% de condensat de fumée de cigarette (CFC) ou 250µM THBP puis marqués au niveau membranaire par anti-CD4/25/CD45RO/CCR6/ CD127, et l'anti-CD27, Comparaison des MFI CD27 des Treg totaux, Tconv naïfs, Th17 et non Th17n=1 et Moyenne +/-SEM n=3.

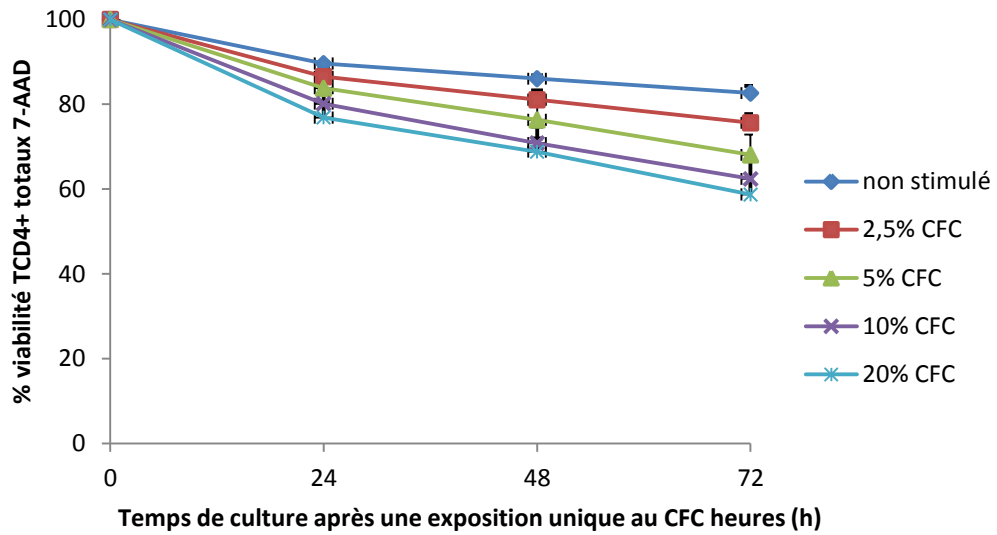


Résultat 25. Expression de CD27 dans les sous-populations au sein de LTCD4⁺ triés. Les TCD4⁺ triés magnétiquement, sont pré incubées ou non 2h avec 3mM de NAC puis sont traités ou (A) non par 10% de condensat de fumée de cigarette (CFC) ou 250 μ M THBP puis marqués au niveau membranaire par anti-CD4/25/CD45RO/CCR6/ CD127, et l'anti-CD27 et comparaison des % de Treg totaux, Tconv naïfs, Th17 et non Th17 exprimant CD27 n=1

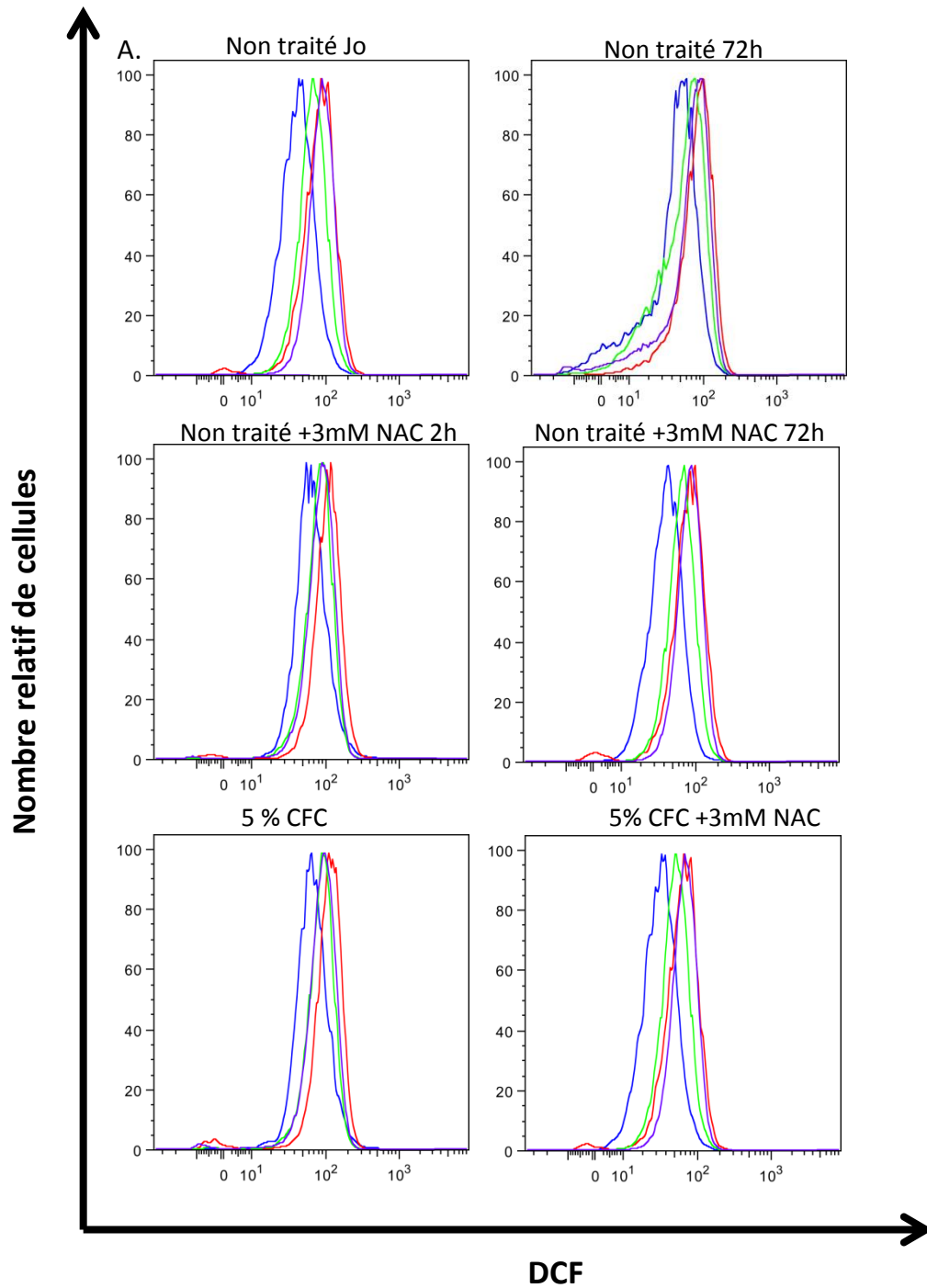


Résultat 25. Expression de CD27 dans les sous-populations au sein de LTCD4+triés. Les TCD4+ triés magnétiquement, sont pré incubées ou non 2h avec 3mM de NAC puis sont traités ou (B) non par 10% de condensat de fumée de cigarette (CFC) ou 250µM THBP puis marqués au niveau membranaire par anti-CD4/25/CD45RO/CCR6/ CD127, et l'anti-CD27 et comparaison des % de Treg totaux, Tconv naïfs, Th17 et non Th17 exprimant CD27 Moyenne +/-SEM n=3.

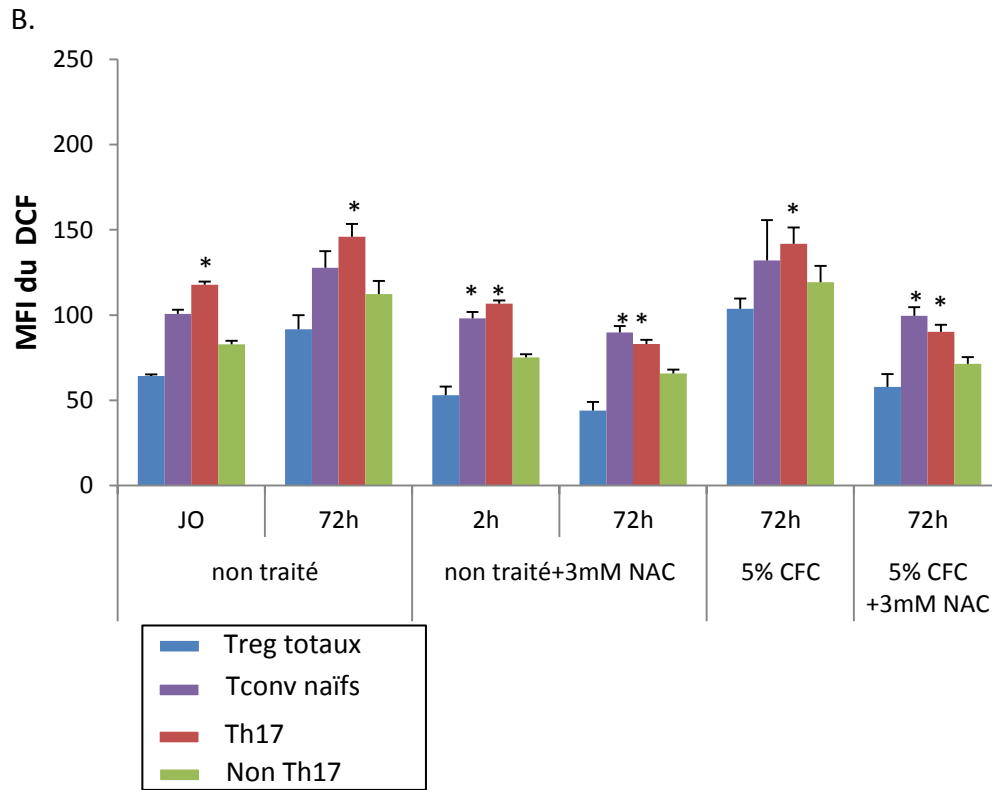
Annexes



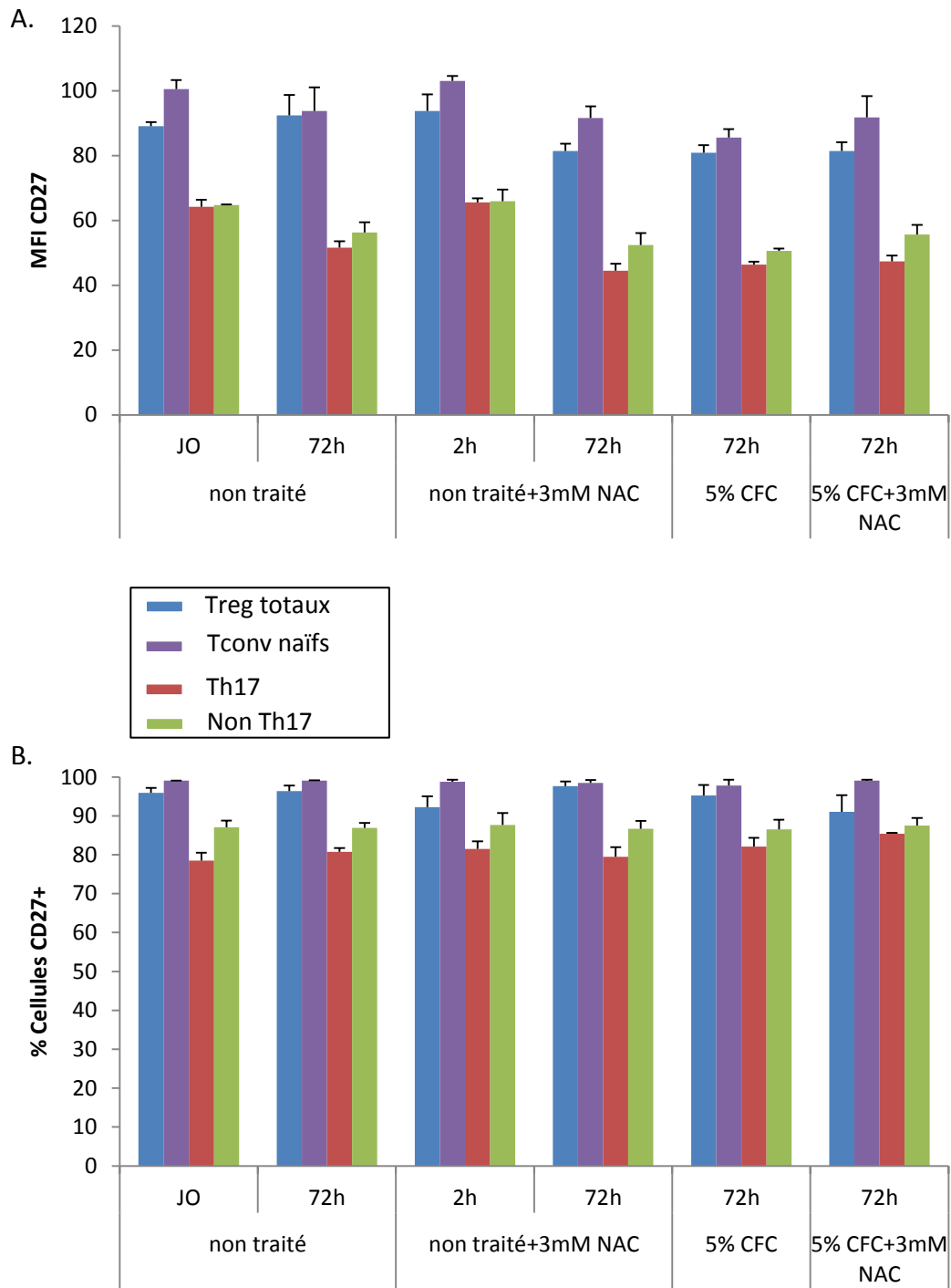
Résultat 26. Evaluation de la toxicité de différentes doses de CFC sur des LTCD4+ totaux triés. La viabilité des TCD4+ triés magnétiquement traités par différentes doses de CFC est évaluée par un marquage 7-AAD, lu en CMF. n=3.



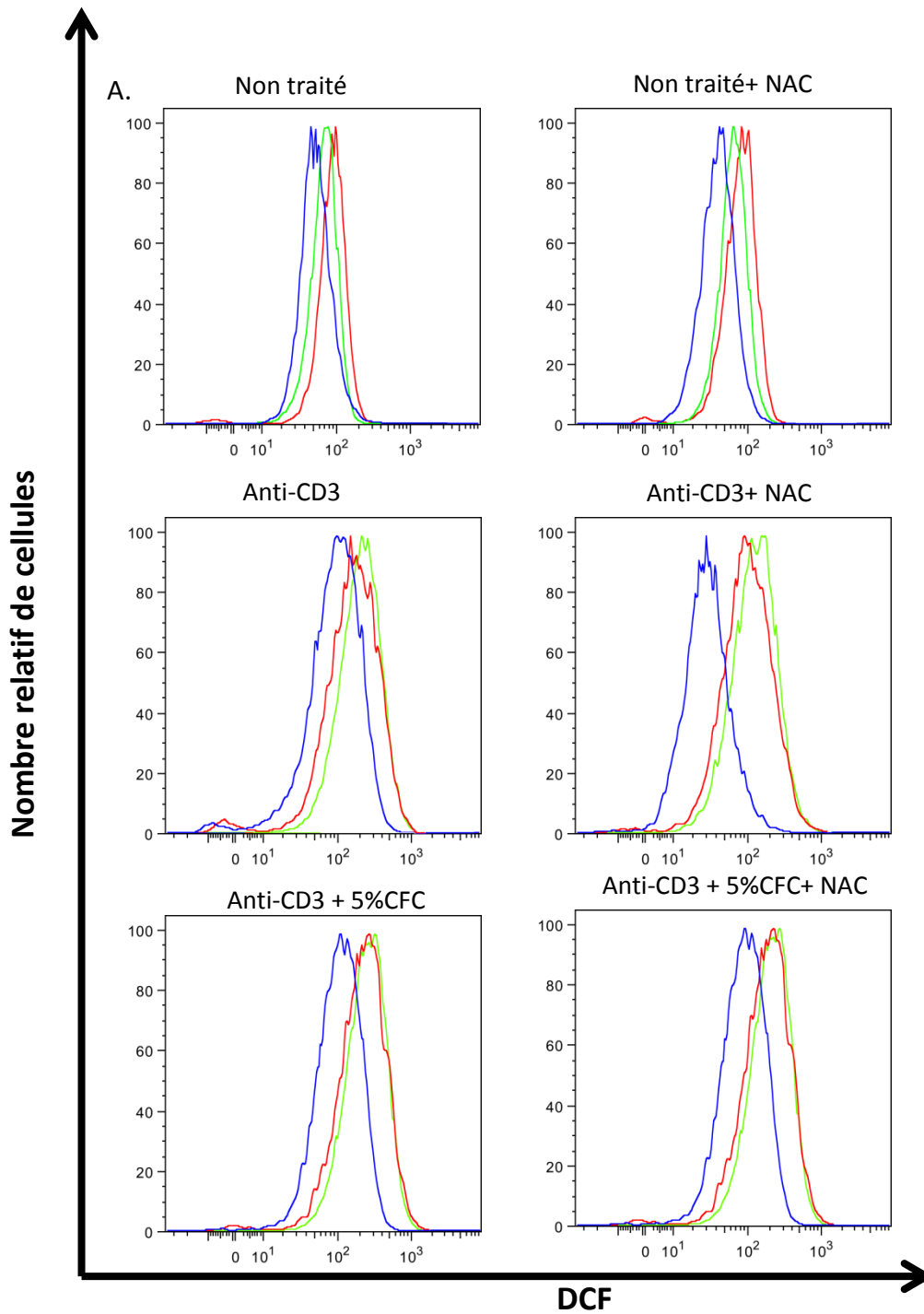
Résultat 27. Dosage d'ERO intracellulaires dans les sous-populations au sein de LTCD4+ triés exposées +/- CFC +/- NAC pendant 72h. Les TCD4+ triés magnétiquement, sont pré incubées ou non 2h avec 3mM de NAC puis sont traités ou (A) non par 5% de condensat de fumée de cigarette (CFC) puis marqués au niveau membranaire par anti-CD4/25/CD45RO/CCR6/ CD127, et intracellulaire avec H₂DCF-DA, lu en CMF à 72h, n=1



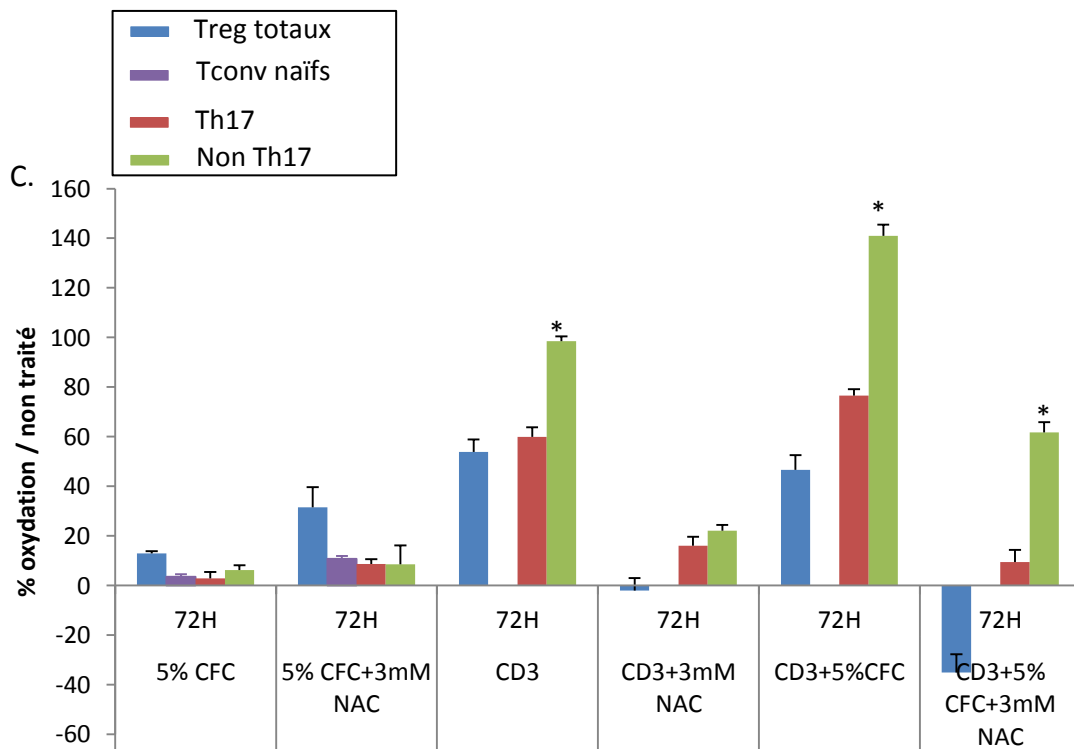
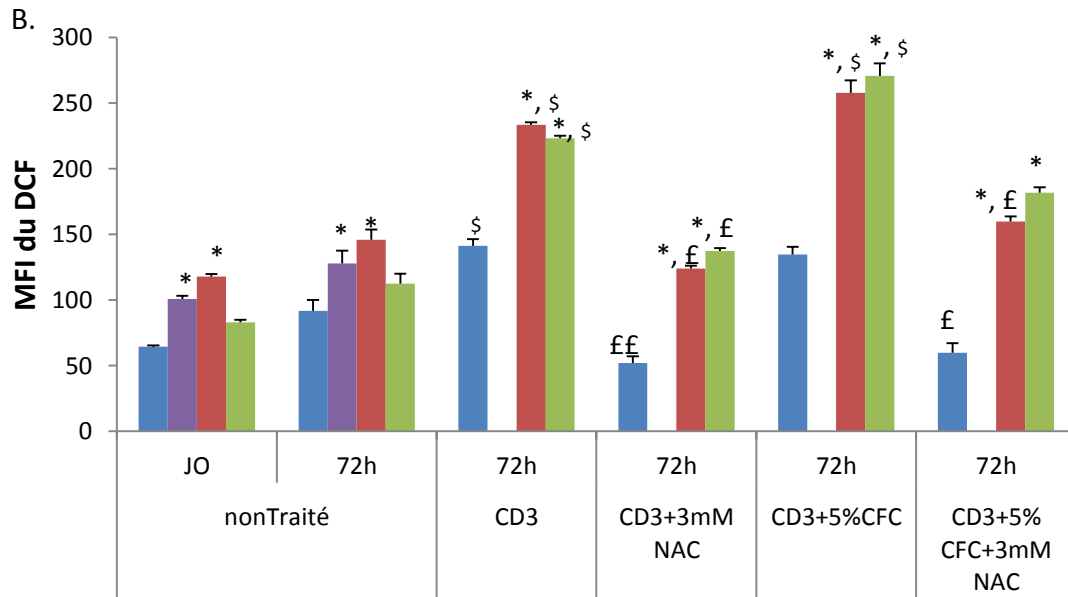
Résultat 27. Dosage d'ERO intracellulaires dans les sous-populations au sein de LTCD4+ triés exposés +/- CFC +/- NAC pendant 72h. Les TCD4+ triés magnétiquement, sont pré incubés ou non 2h avec 3mM de NAC puis sont traités ou (B) non par 5% de condensat de fumée de cigarette (CFC) puis marqués au niveau membranaire par anti-CD4/25/CD45RO/CCR6/ CD127, et intracellulaire avec H₂DCF-DA, lu en CMF à 72h, moyenne +/-SEM n=4; Mann-Whitney U test, Significativité *<p 0,05, **<p 0,01 par rapport à Treg.



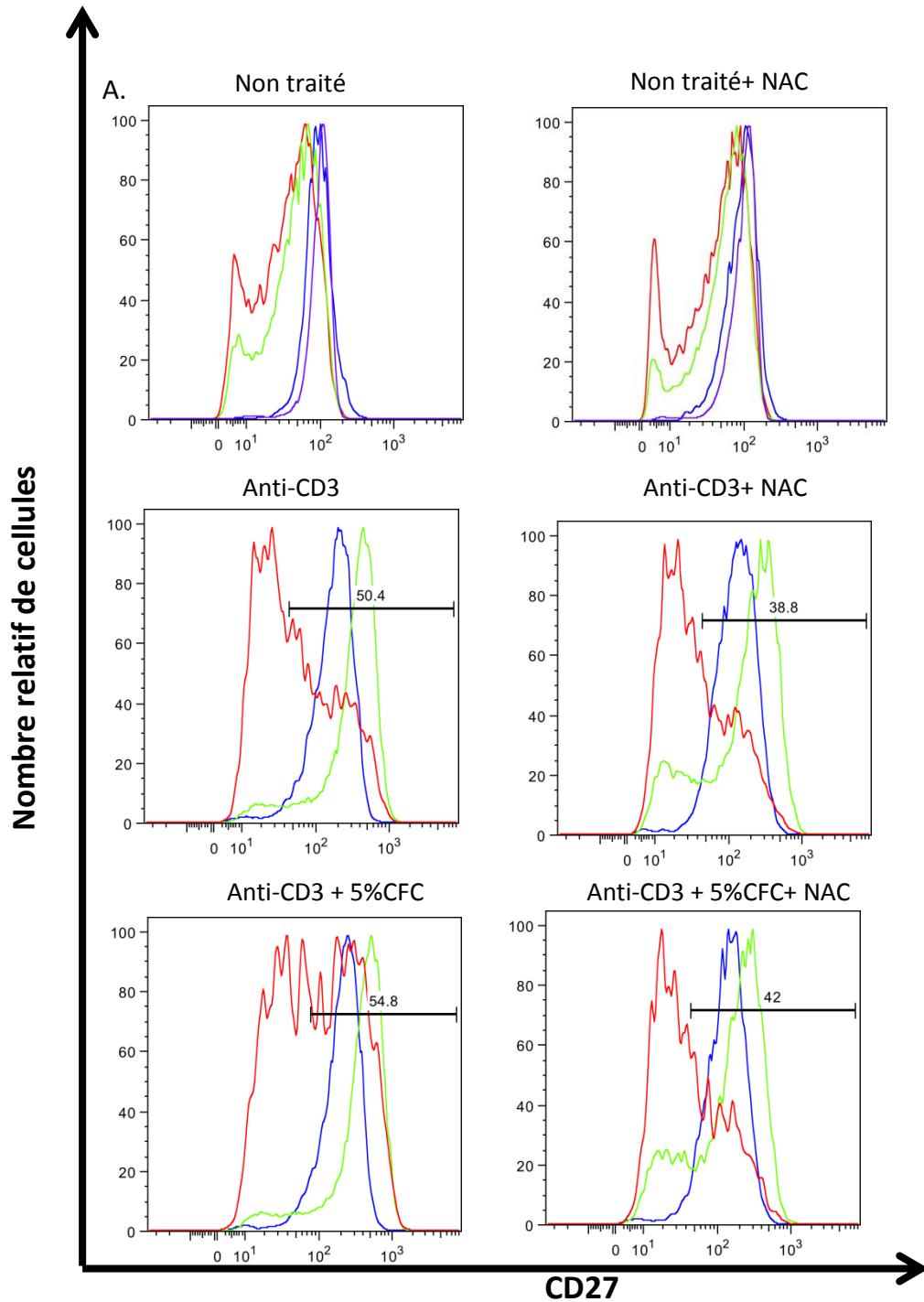
Résultat 28. Expression de CD27 dans les sous-populations au sein de LTCD4+triés. Les TCD4+ triés magnétiquement, sont pré incubées ou non 2h avec 3mM de NAC puis sont traités ou (A) non par 5% de condensat de fumée de cigarette (CFC) puis marqués au niveau membranaire par anti-CD4/25/CD45RO/CCR6/ CD127, et l'anti-CD27. Comparaison des MFI CD27 des Treg totaux, Tconv naïfs, Th17 et non Th17, Moyenne +/-SEM n=4 (B) et des % CD27 Moyenne +/-SEM n=4.



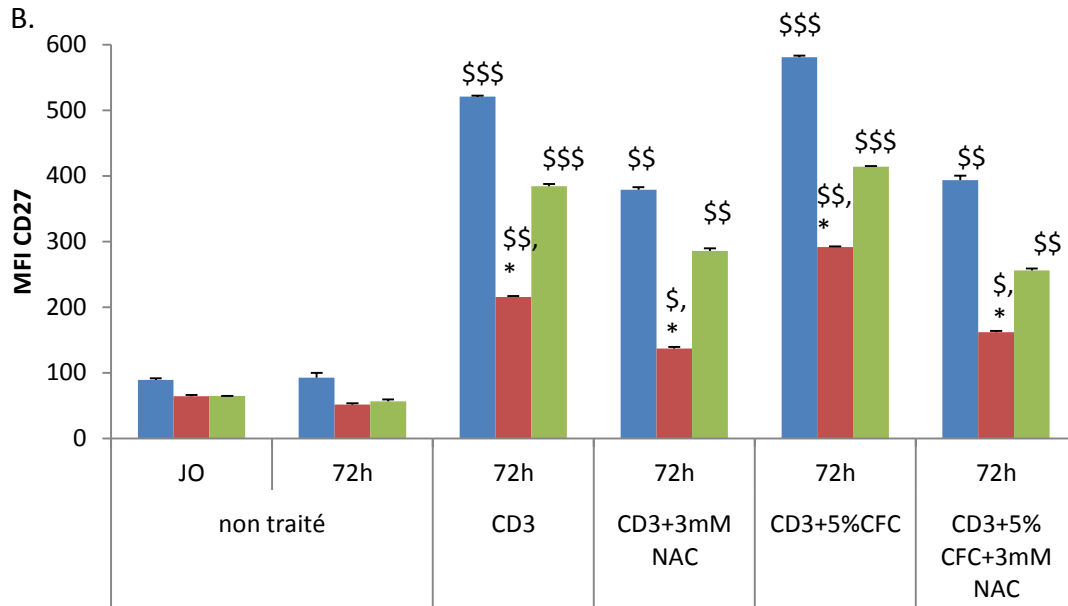
Résultat 29. Dosage d'ERO intracellulaires dans les sous-populations au sein de LTCD4+triés magnétiquement exposées +/- CFC+/- NAC pendant 72h et stimulées via anti-CD3. Les TCD4+ triés magnétiquement, sont pré incubées ou non 2h avec 3mM de NAC (A) et mis en culture dans une plaque coaté +/- 2µg/ml d'anti-CD3+/- 5% CFC ; A 72h les cellules sont marquées au niveau membranaire par anti-CD4/25/CD45RO/CCR6/ CD127, et intracellulaire avec H₂DCF-DA, lu en CMF à 72h, comparaison des MFI des Treg totaux, Tconv naïfs, Th17 et non Th17 n=1



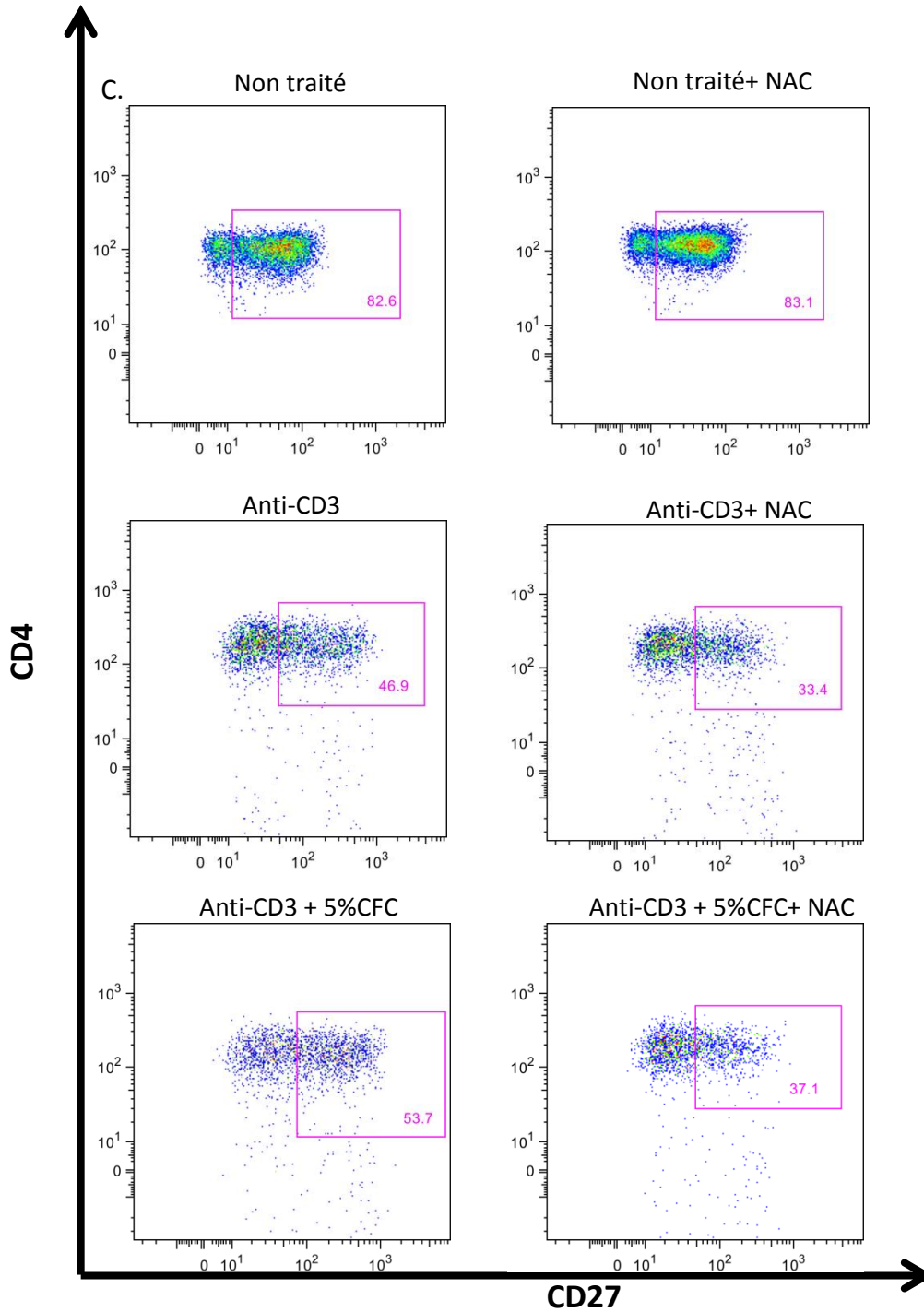
Résultat 29. Dosage d'ERO intracellulaires dans les sous-populations au sein de LTCD4+triés magnétiquement exposées +/- CFC +/- NAC pendant 72h et stimulées via anti-CD3. (B) Comparaison des MFI des Treg totaux, Tconv naïfs, Th17 et non Th17, moyenne +/-SEM n=4. (C) % oxydation : (MFI traité -MFI non traité)/MFI non traité x 100.Moyenne +/- SEM. n=4 ; Mann-Whitney U test, Significativité *<p 0,05, **<p 0,01 par rapport à Treg; \$<p 0,05, \$\$<p 0,01 par rapport au non traité ; £<p 0,05, ££<p 0,01 effet de la NAC



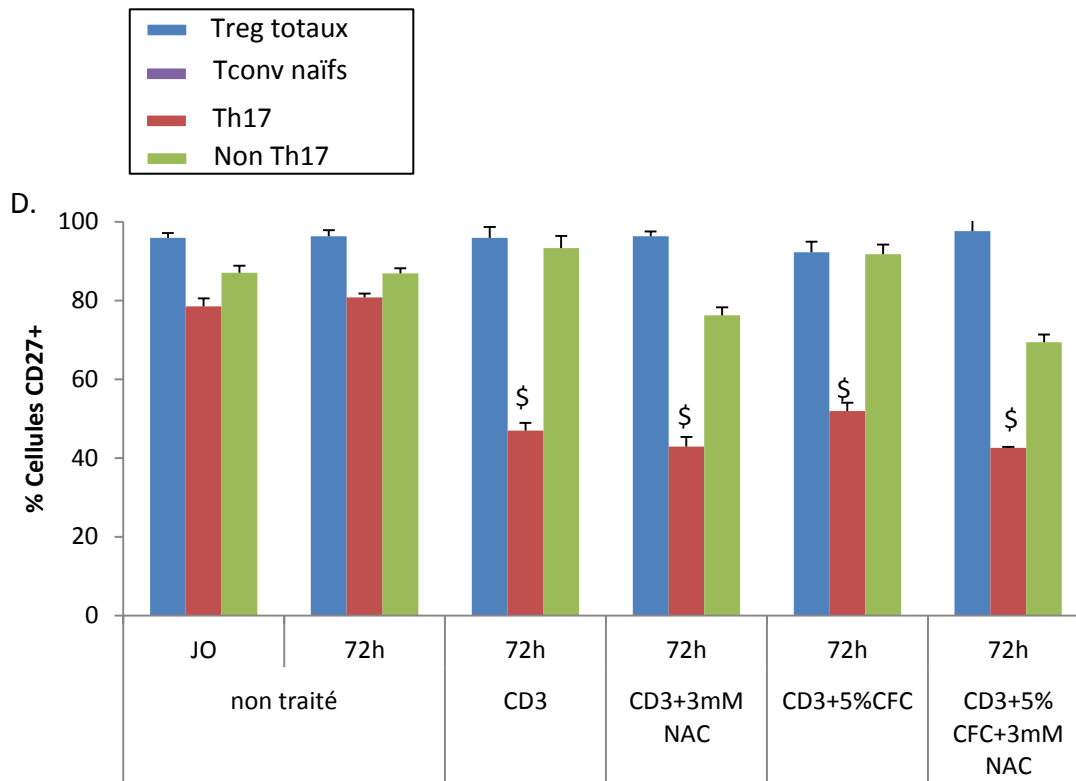
Résultat 30. Expression de CD27 dans les sous-populations au sein de LTCD4+ triés exposées +/- CFC +/- NAC pendant 72h et stimulées via anti-CD3. Les TCD4+ triés magnétiquement, +/- NAC +/- CFC +/- 2 μ g/ml d'anti-CD3 sont marqués au niveau membranaire par anti-CD4/25/CD45RO/CCR6/ CD127, et l'anti-CD27 à 72h. (A) Comparaison des MFI CD27 des Treg totaux, Tconv naïfs, Th17 et non Th17 n=1, les barres au niveau des histogrammes délimitent le marquage CD27 positif, les pourcentages indiqués concernent les Th17 exprimant CD27.



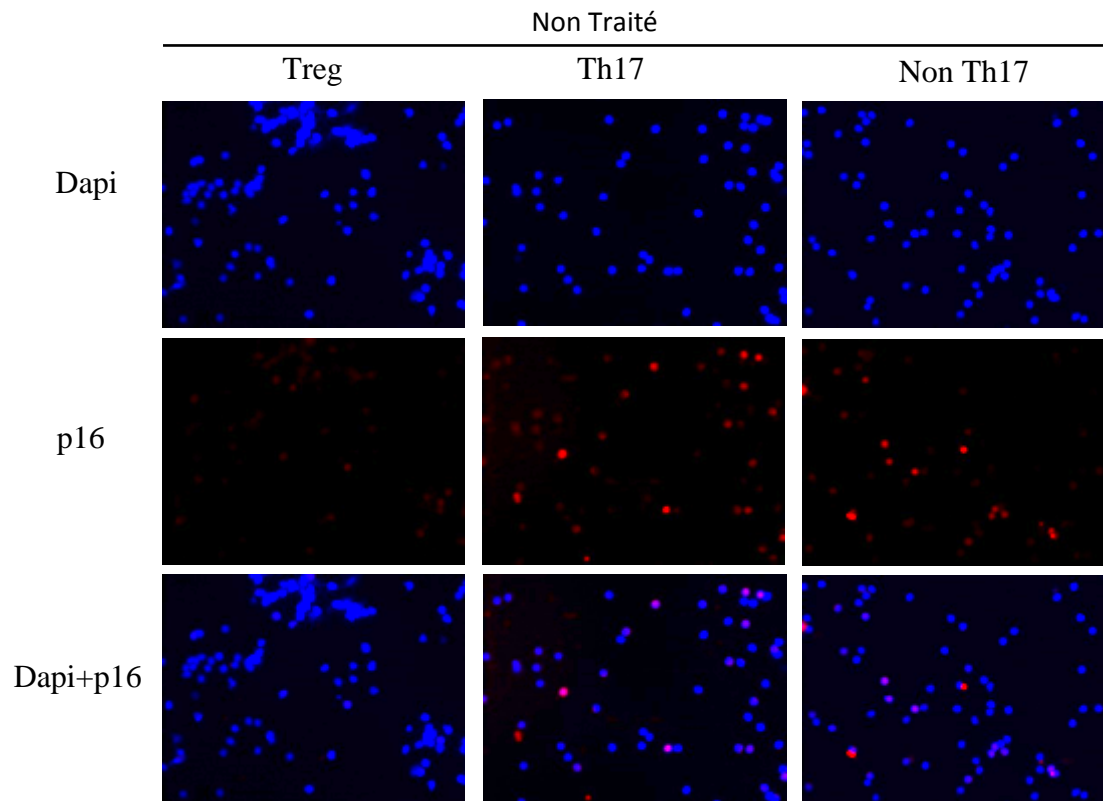
Résultat 30. Expression de CD27 dans les sous-populations au sein de LTCD4+triés exposées +/- CFC +/- NAC pendant 72h et stimulées via anti-CD3. Les TCD4+ triés magnétiquement, +/- NAC +/- CFC +/- 2µg/ml d'anti-CD3 sont marqués au niveau membranaire par anti-CD4/25/CD45RO/CCR6/ CD127, et l'anti-CD27 à 72h. Comparaison des MFI CD27 des Treg totaux, Tconv naïfs, Th17 et non Th17, Moyenne +/-SEM n=4 Significativité *<p 0,05, **<p 0,01 par rapport à Treg; \$<p 0,05, \$\$<p 0,01 par rapport au non traité.



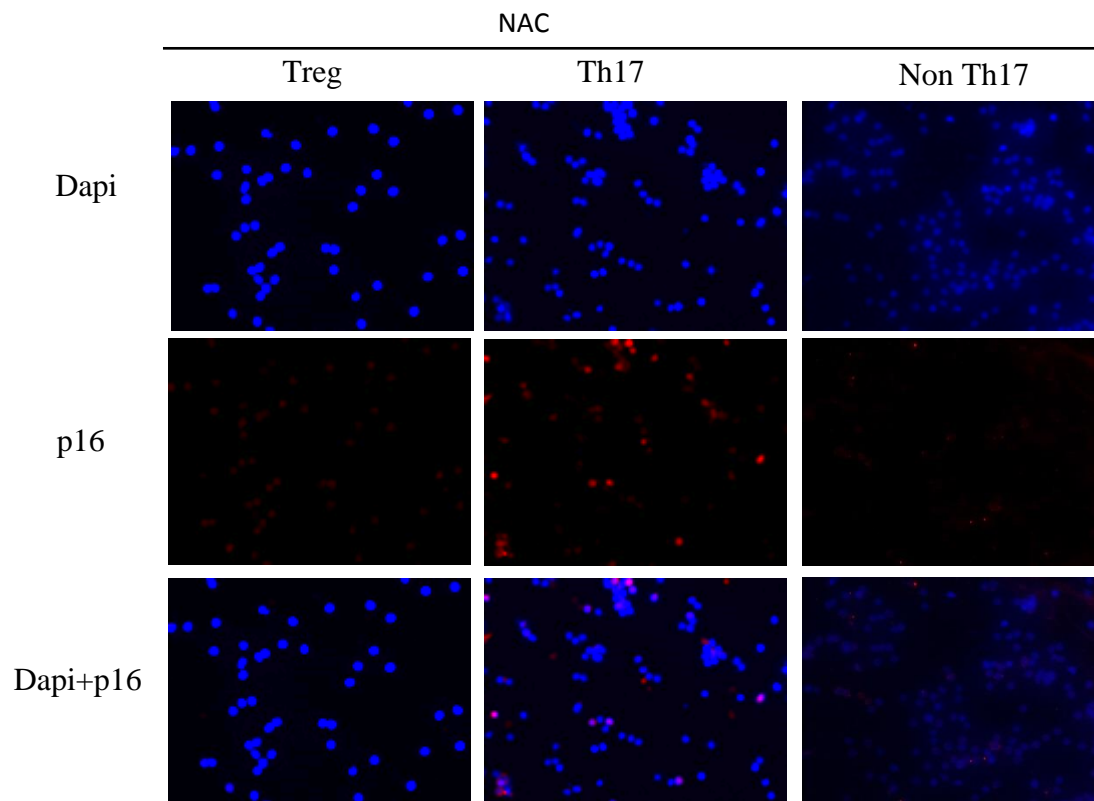
Résultat 30. Expression de CD27 dans les Th17 au sein de LTCD4⁺ triés exposées +/- CFC +/- NAC pendant 72h et stimulées via anti-CD3. (C) Comparaison des % CD27 des Th17, n=1



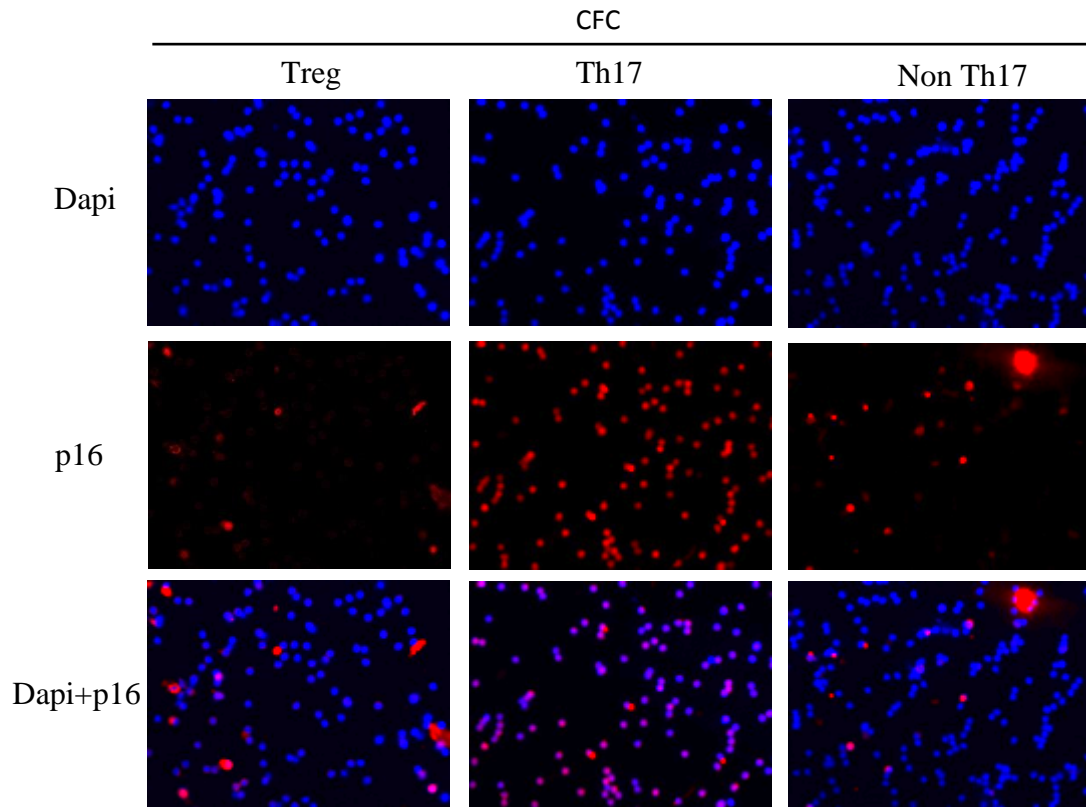
Résultat 30. Expression de CD27 dans les sous-populations au sein de LTCD4+ triés exposées +/- CFC +/- NAC pendant 72h et stimulées via anti-CD3. Les TCD4+ triés magnétiquement, +/- NAC +/- CFC +/- 2µg/ml d'anti-CD3 sont marqués au niveau membranaire par anti-CD4/25/CD45RO/CCR6/ CD127, et l'anti-CD27 à 72h. (D) Comparaison des % CD27 des sous-populations de TCD4+, Moyenne +/-SEM n=4. Mann-Whitney U test, Significativité *<p 0,05, **<p 0,01 par rapport à Treg; \$<p 0,05, \$\$<p 0,01 par rapport au non traité.



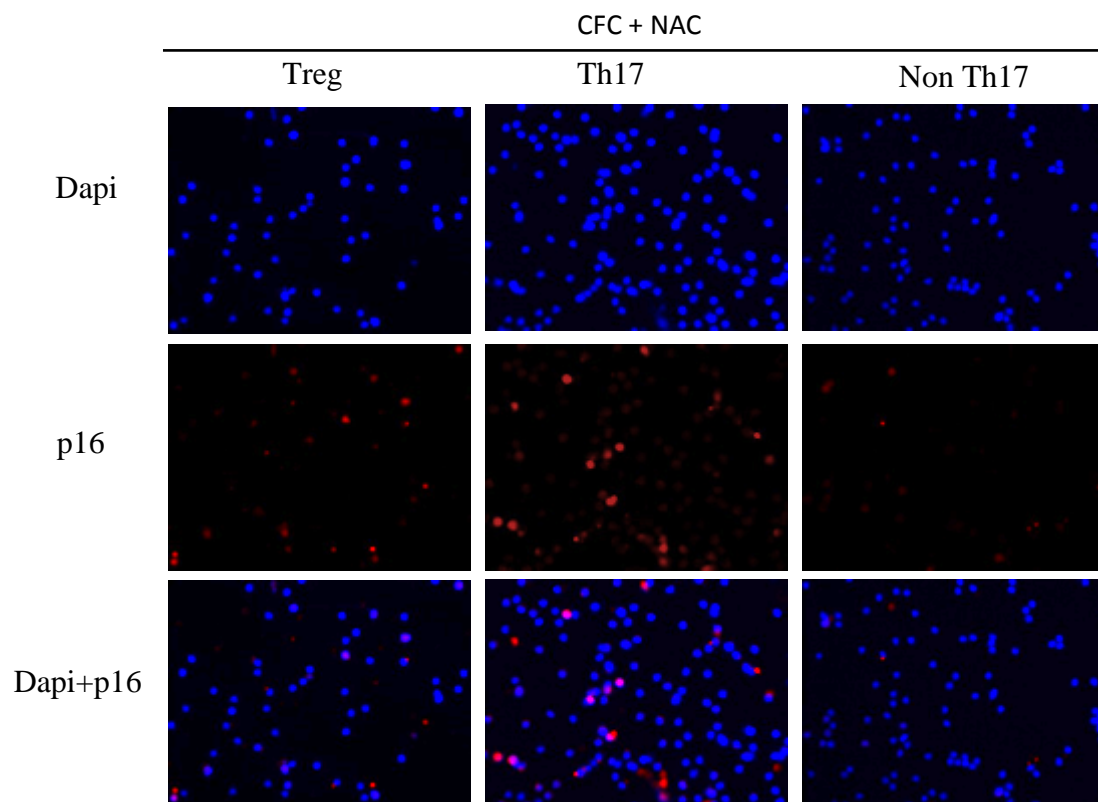
Résultat 31. – Expression de p 16 dans les sous-populations lymphocytaires isolées, en condition basale, n=1.



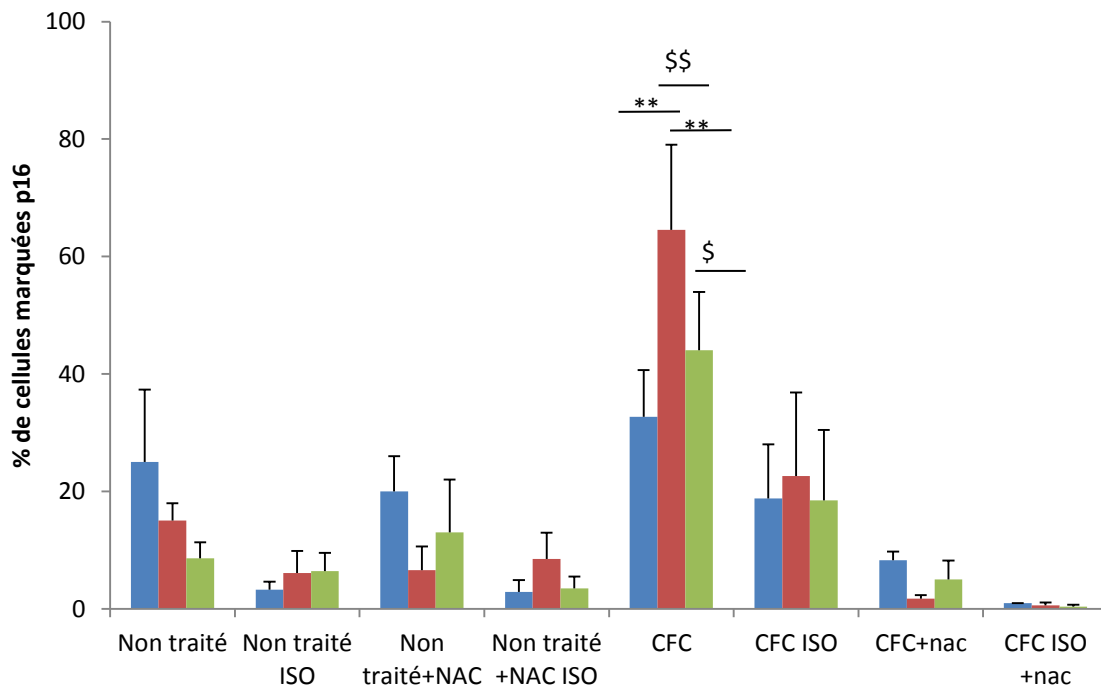
Résultat 31. – Expression de p 16 dans les sous-populations lymphocytaires isolées, en condition basale +traitement à la NAC, n=1.



Résultat 31. – Expression de p 16 dans les sous-populations lymphocytaires isolées, après exposition à 5% CFC pendant 24h, n=1.



Résultat 31. – Expression de p 16 dans les sous-populations lymphocytaires isolées prétraitées à la NAC puis exposées 24h au CFC, n=1.



Résultat 31. – Expression de p 16 dans les sous-populations lymphocytaires isolées. Les sous-populations lymphocytaires isolées traitées ou non par 5% CFC pendant 24h +/-NAC, par ICC et lu au microscope. Condition NS, NS ISO, FC et FC iso n=5 et les conditions avec la NAC n=2. Mann-Whitney U test, Significativité \$<p 0.05, \$\$<p 0.01 par rapport au non traité. *<p 0.05 et **<p 0.01 par rapport aux autres sous-populations.

Résultats supplémentaires

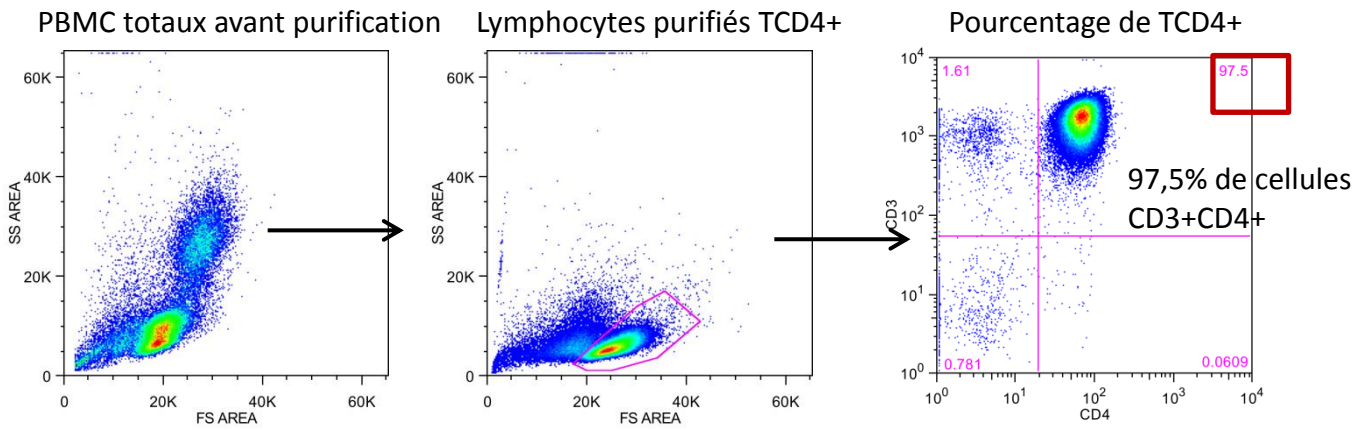


Figure. Vérification du tri TCD4+

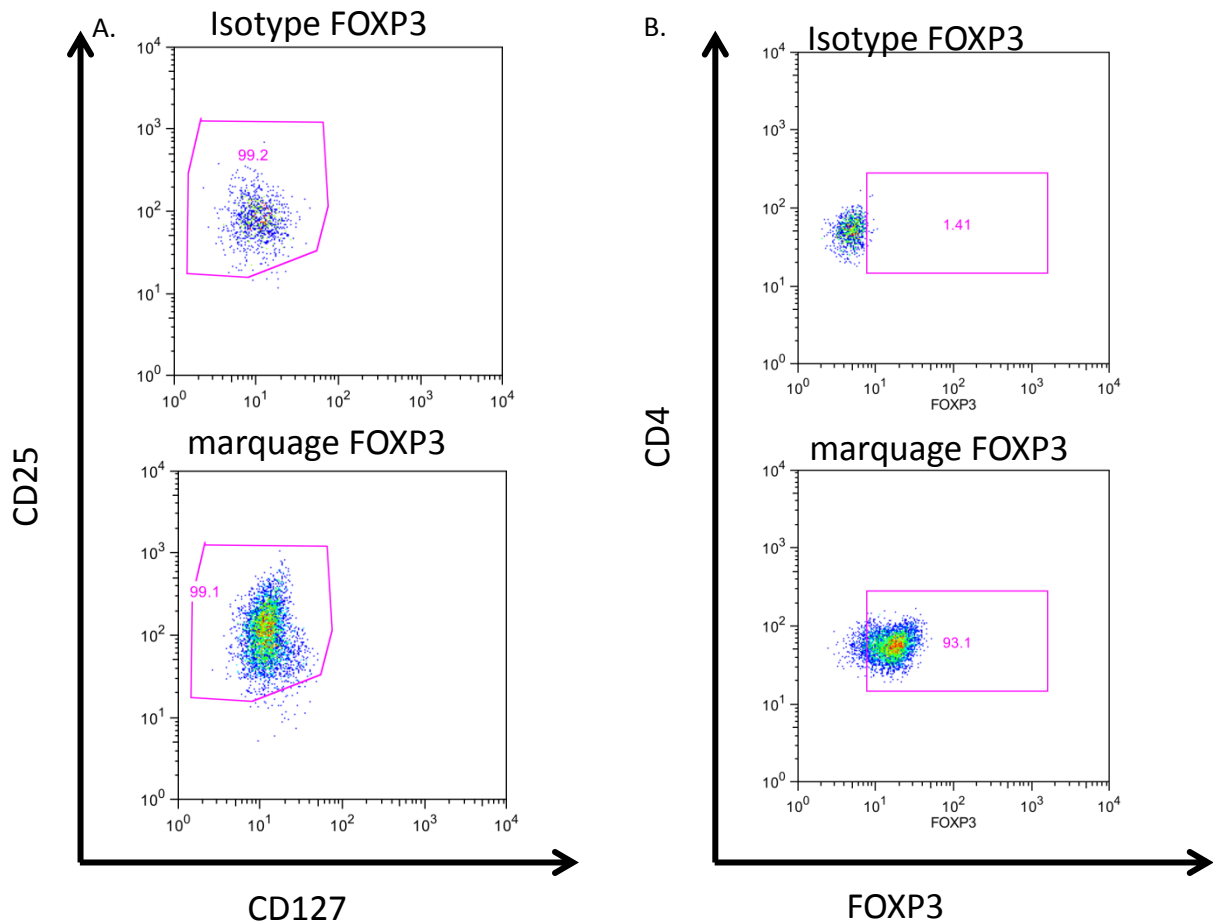


Figure. Vérification du tri Treg effectué par le trieur de cellules. Les cellules CD4+CD25^{high}CD127^{-/low} triées expriment le facteur de transcription FOXP3 (93,1%)

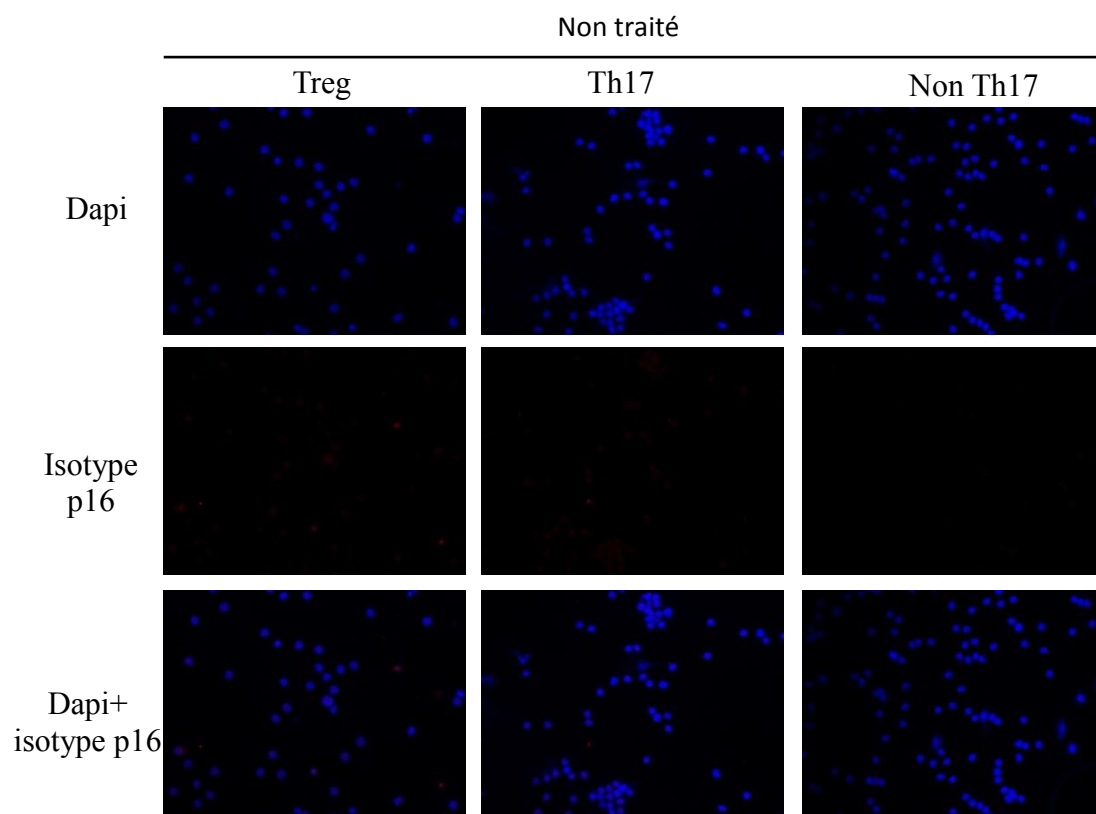


Figure. Contrôle isotype p 16 en condition basale

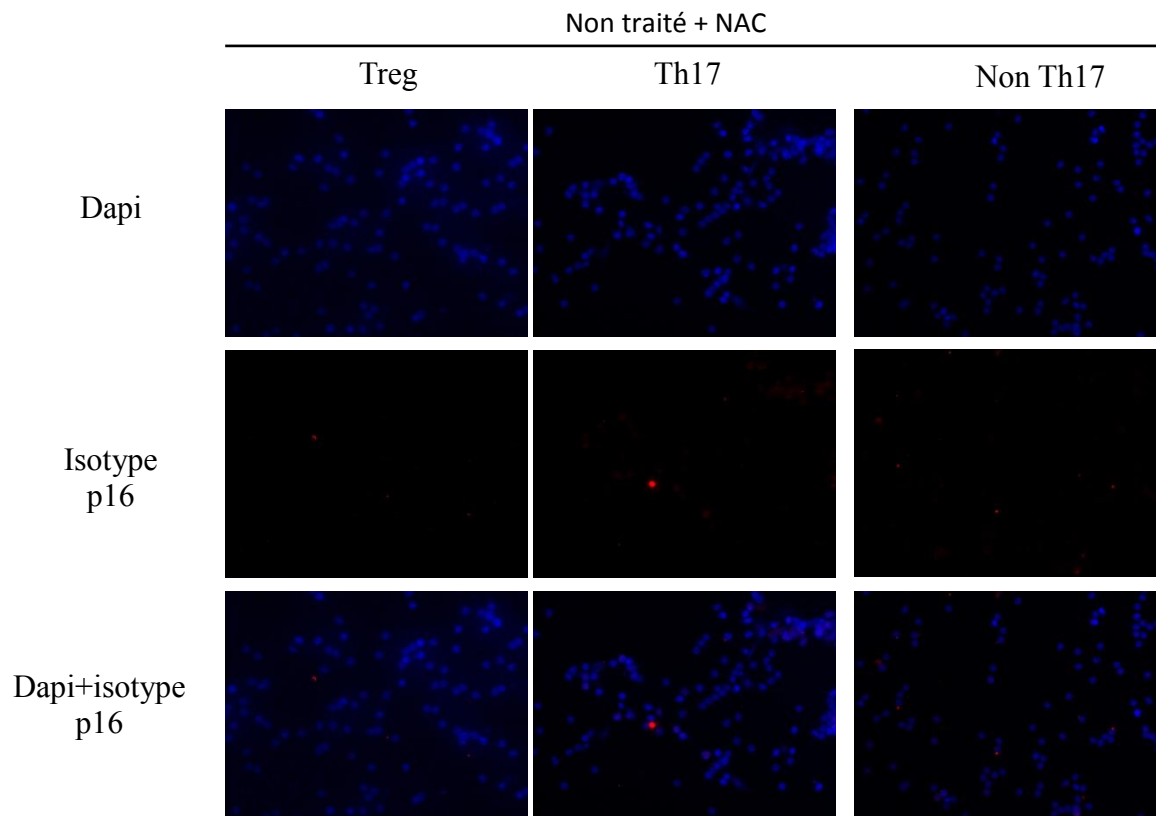


Figure. Contrôle isotype p 16 en condition basale +NAC

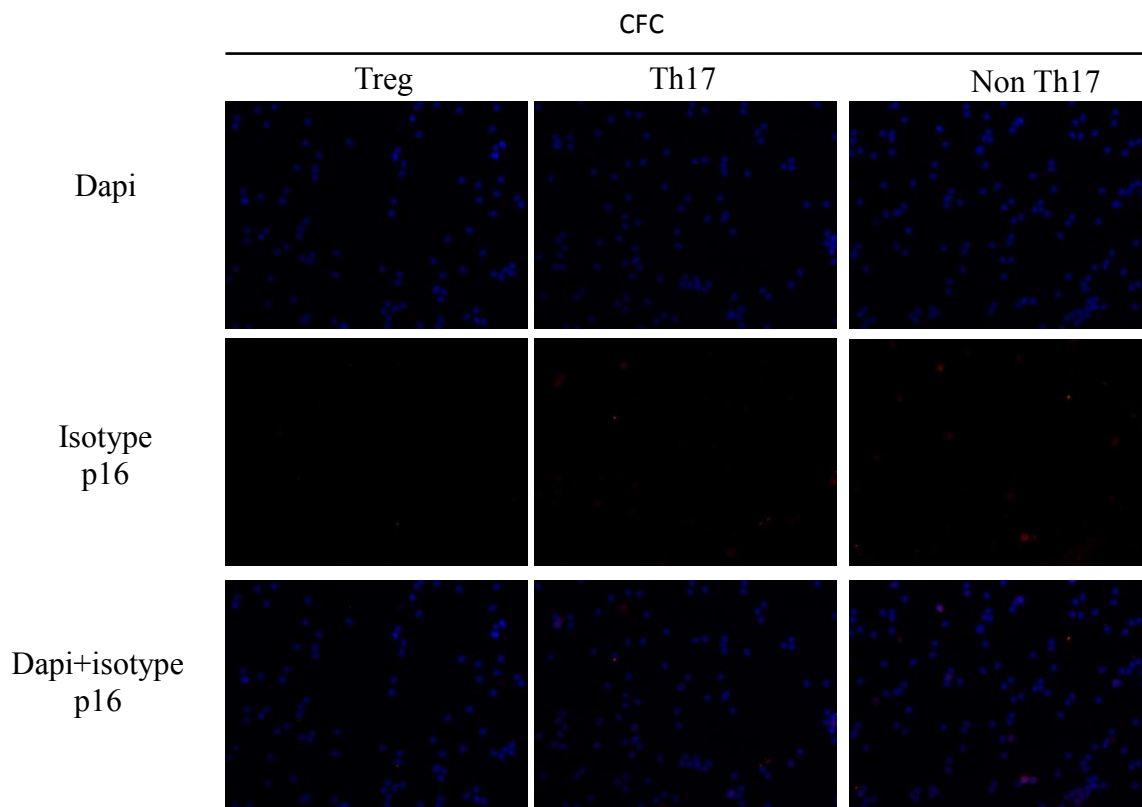


Figure. Contrôle isotype p 16 après traitement au CFC