



# L'exposition à la fumée de cigarette induit la sénescence des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Th17 humains

Stéphane Kerbrat

## ► To cite this version:

Stéphane Kerbrat. L'exposition à la fumée de cigarette induit la sénescence des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Th17 humains. Santé. Université Paris-Est, 2016. Français. NNT : 2016PESC1017 . tel-01622875

**HAL Id: tel-01622875**

**<https://theses.hal.science/tel-01622875>**

Submitted on 24 Oct 2017

**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 AgroParisTech

## 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*

**Stéphane KERBRAT**

le 10 novembre 2016

**L'exposition à la fumée de cigarette induit la sénescence  
des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Th17 humains.**

Directeur de thèse : **Sabine LE GOUVELLO**

### Jury

**M. Didier MORIN**, Docteur, UPEC

**M. Frédéric BATTEUX**, Professeur, Université Paris Descartes

**M. Germain ROUSSELET**, Docteur, CEA

**Mme. Sabine LE GOUVELLO**, Docteur, UPEC

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Directrice de thèse



**“Il n'y a qu'une façon d'apprendre, c'est par l'action.”**

De Paulo Coelho / L'Alchimiste

**“Un peu de folie est nécessaire pour faire un pas de plus.”**

De Paulo Coelho / Manuel du guerrier de la lumière

Cette thèse est dédiée à ma famille. Celle, ici et ailleurs, qui m’a soutenue au cours de ce long voyage et qui a été ma plus grande source de motivation.

## Remerciements

Pour commencer, je tiens à remercier Frédéric Batteux, Didier Morin et Germain Rousselet, membres de mon jury, d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse. Je remercie aussi les membres de mon comité de thèse, François Lemoine et Roberto Motterlini, pour leurs remarques, conseils et encouragements.

Il y a maintenant 5 ans, j'ai entrepris un projet de valorisation de mon parcours professionnel, tout d'abord en validant par une procédure de valorisation des acquis de l'expérience un master « Biologie moléculaire et cellulaire, spécialité immunologie, parcours « Immunotechnologies et biothérapies » « filière recherche » à l'UPMC. J'ai ensuite décidé de continuer cette démarche et d'aller au bout de ce projet professionnel et personnel, en réalisant ce travail de thèse à l'UPE.

Aussi, je voudrais remercier tout particulièrement le Docteur Sabine Le Gouvello, ma directrice de thèse, de m'avoir accordé sa confiance, dès mon arrivée en tant que jeune technicien en 2003, et donné l'opportunité de réaliser ce projet. Merci de vos conseils et encouragements, et de votre bonne rigueur scientifique qui m'auront permis d'aller au-delà de ce que j'aurais imaginé.

Merci également à Jorge Boczkowski et Sophie Lanone de m'avoir vous aussi accordé votre confiance et permis de réaliser ce travail de thèse dans votre laboratoire. De même je voudrais remercier l'UPEC et l'IMRB de m'avoir donné l'opportunité de progresser scientifiquement et académiquement.

Maintenant, voici peut-être la partie la plus difficile de ce travail de thèse, puisqu'il s'agit de remercier toutes les personnes que j'ai eu l'occasion de cotoyer durant ma carrière et ce travail de thèse, et elles sont nombreuses. Aussi, j'espère que personne ne s'offusquera d'un possible oubli.

Tout d'abord merci à tous les membres de l'équipe 4 de l'IMRB. Le Jean-Claude Paireon, Pascal Andujar, Laurent Boyer, Marie-Claude Bourin et Frédéric Schlemmer, dont les remarques pertinentes au cours des réunions d'équipe auront aussi contribué à faire avancer ce projet. Un énorme merci à Maylis Dagouassat pour ses précieux conseils scientifiques et techniques et son aide dans la validation des différentes techniques d'immunofluorescence. Une pensée pour mes co-religionnaires, Arnaud Tiendebreogo et Emmanuel Paul, eux aussi en fin de thèse, qui auront fait une thèse, comment disent-ils déjà ? « Trop stylée », ainsi que Maeva Zysman, Benjamin

Even et Quy Nguyen qui auront la dure tâche de faire au moins aussi bien que leurs aînés et auxquels je souhaite bon courage. Merci aussi à mes collègues de bureau : l'inénarrable Philippe Caramelle, Marie-Laure Franco-Montoya, Audrey Ridoux (merci d'avoir accepté de chasser pour moi les fautes d'orthographe dans ce long roman, j'ai « kiffé »), Shamila Vibushan et le docteur Alice Hadchouel, ma petite « famille » au travail. Merci pour vos conseils, pour les moments passés à refaire le monde, pour les pauses goûter, les fous rires dans le bureau. Je n'oublie bien sûr pas les autres membres de l'équipe, Stéphane Tchankouo, Bala Annangi, Mélanie et Lucie.

Merci également à ceux qui plus que d'anciens collègues sont maintenant des amis, Lucie, Esther, Angélique, Jean-Marie, Sandra et notre ancienne secrétaire Julia. Votre sérieux et votre implication dans votre travail auront contribué à me motiver et à enfin me lancer dans ce projet de thèse. Je n'oublie pas les bons moments passés ensemble au labo et en dehors. Merci également à Indou, qui m'a précédé sur cette thématique et qui a initié certaines bases techniques de ce travail. Merci aussi à tous les autres, étudiants en master, stagiaires, restés plus ou moins longtemps et avec lesquels j'ai apprécié travailler.

Je tiens également à remercier les membres, actuels ou passés, du laboratoire d'immunologie Biologique de l'hôpital Henri Mondor, et particulièrement Luc Lyonnet, Véronique Bierre, Catherine Poillet, Corinne Duprez et enfin François Bérrehar. Ce fut vraiment un plaisir de travailler et de progresser techniquement et scientifiquement ensemble. François nous a quitté bien trop tôt mais ses bons conseils en PCR quantitative auront largement contribué à la qualité du travail présenté dans ce manuscrit. Merci également à tous ceux que je croise encore régulièrement, Lili, Tony, Aurélie, Thomas, Catherine, Alexandre et Nathalie et vos petits mots d'encouragements quand vous passez dans la pièce de culture cellulaire.

Merci également aux membres de l'équipe de François Lemoine (CIMI-Paris UMR-S Inserm 1135, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière), Maude Guillot-Delost et Claude Baillou pour leur aide dans les tris cellulaires et les manips de CBA, et les bonnes idées pour faire avancer ce projet.

Merci à Adeline et Aurélie de la plateforme de cytométrie en flux pour votre investissement et la qualité de votre travail. Nos tentatives de record du monde du nombre de Th17 triés à partir d'un donneur volontaire sain auront peut-être échouées mais les Th17 triés par vos soins sont sûrement les plus beaux que l'on puisse rêver d'obtenir. Merci également de l'accueil que vous donnez aux utilisateurs de la plateforme. La cytométrie rend fou, mais plus on est de fous, plus on rit. Merci également à Xavier de la plateforme imagerie, sans qui je n'aurai pas ces belles images à vous présenter, et à Mathieu de la plateforme Luminex pour sa réactivité et la rapidité

avec laquelle il arrive à nous fournir des résultats. Merci également aux personnels des animaleries du centre (Sylviane Adubeiro, Virginie Fournier) et la de la plateforme d'exploration fonctionnelle du petit animal (Rachid Souktani) d'avoir pris soin des mes souris PEA-15.

Merci à l'équipe de Hervé Chneiweiss (INSERM U 894, Centre de Psychiatrie et Neurosciences, Paris), Marie-Pierre Junier et Silvina Dos Reis Tavares, de nous avoir fourni le modèle PEA-15 et pour leur aide dans la mise au point de l'analyse par immunocytofluorescence de l'expression et de la localisation de phospho-ERK1/2. Merci également à Benoit Vingert de l'équipe 2 de l'IMRB pour sa précieuse aide dans les manipulations d'alloimmunisation des souris déficientes pour PEA-15, et à Flavia Castellano de l'équipe 9 pour les dosages d'activité IL4I1.

Merci aussi au docteur Patrick Cormier de la station biologique de Roscoff qui m'aura permis de découvrir le monde de la recherche scientifique. Merci également aux membres de l'équipe du docteur Jacques Bertoglio et du professeur Marc Pallardy (Marie-Liesse Asselin-Labat, Fanny Boislève, Armelle Biolat-Vidamment, Hind Hassaf et Saadia Kerdine-Römer, et bien d'autres...). Je garde le souvenir d'une très bonne première expérience professionnelle qui aura énormément contribué à mon goût pour la recherche.

Un grand merci aux amis et à ma famille, mes deux sœurs Odile et Yvonne, mes nièces et petites nièces pour votre soutien même à distance.

Enfin, par ce que cette thèse n'est pas mon premier bébé, un grand merci et un énorme pardon à ma petite Lyana. Une première année de vie et une dernière année de thèse sont par nature incompatibles mais ton Papa aura tout fait pour être aussi présent à tes côtés. Promis, une fois la soutenance passée on aura plein de temps pour bien s'amuser. Tout ça bien sûr n'aura pas été possible sans le soutien indéfectible de ta Maman. A toi aussi Jennifer je dois dire un million de mercis et autant de pardons. Tu es entrée dans ma vie alors que je commençais à peine ma thèse et jusqu'à présent tu ne m'as connu qu'en tant qu'étudiant. Aujourd'hui, j'espère que tu seras fière de ton petit mari et de ses Th17. Toutes les deux vous représentez ma force et ma principale source de motivation, et j'espère que la finalisation de ce projet de thèse sera aussi le début d'une vie meilleure. Mon petit lapin, mon petit chat, je vous aime infiniment.

Enfin, une dernière pensée pour ceux qui me manquent chaque jour et depuis déjà trop longtemps, mon frère Jean-Yves, Papa et Maman, qui j'espère, de là haut, seront fiers de ce que j'ai accompli.

## Sommaire

|                                  |    |
|----------------------------------|----|
| Sommaire.....                    | 5  |
| Index des figures et tables..... | 16 |
| Abréviations.....                | 21 |
| Avant-propos. ....               | 24 |

## **Chapitre 1 : Synthèse Bibliographique..... 27**

### **I. Tabagisme et maladies : Le tabagisme, un facteur de risque démontré pour de nombreuses pathologies..... 28**

|                                                                                  |           |
|----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>A. BPCO.....</b>                                                              | <b>28</b> |
| <b>B. Autres maladies inflammatoires chroniques. ....</b>                        | <b>31</b> |
| <b>C. Maladies cardiovasculaires.....</b>                                        | <b>31</b> |
| <b>D. Infections microbiennes ....</b>                                           | <b>32</b> |
| <b>E. Tabagisme et VIH.....</b>                                                  | <b>33</b> |
| <b>F. Cancer. ....</b>                                                           | <b>34</b> |
| a) Cancers associés au tabagisme : poumon, bouche, larynx, œsophage et vessie. . | 34        |
| b) Cancer colorectal.....                                                        | 35        |
| c) Cancer du sein .....                                                          | 36        |
| d) Métastases des cancers. ....                                                  | 36        |
| e) Rôle du tabagisme sur la réponse immunitaire anti-tumorale.....               | 36        |

### **II. Exposition à la fumée de cigarette : un stress oxydant cellulaire ? ..... 38**

|                                                      |           |
|------------------------------------------------------|-----------|
| <b>A. Constituants de la fumée de cigarette.....</b> | <b>38</b> |
| <b>B. Les espèces réactives de l'oxygène ....</b>    | <b>40</b> |
| a) Les espèces radicalaires de l'oxygène. ....       | 41        |
| (2) L'anion superoxyde. ....                         | 42        |
| (3) Le radical perhydroxyle.....                     | 42        |
| (4) Le radical hydroxyle.....                        | 42        |
| (5) Les radicaux alkoxy et peroxy.....               | 43        |
| b) Les dérivés non radicalaires de l'oxygène. ....   | 43        |
| (1) Le peroxyde d'hydrogène.....                     | 43        |

|                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| (2) L'oxygène singulet. ....                                                                | 44 |
| <b>C. Les principales sources d'espèces réactives de l'oxygène</b> .....                    | 44 |
| a) Sources exogènes d'ERO. ....                                                             | 44 |
| b) Sources endogènes d'ERO. ....                                                            | 45 |
| (1) La chaîne respiratoire mitochondriale. ....                                             | 45 |
| (2) NADPH oxydases. ....                                                                    | 50 |
| (3) L'auto-oxydation de petites molécules. ....                                             | 52 |
| (4) Peroxysome ....                                                                         | 52 |
| (5) Le cytochrome P-450 et le réticulum endoplasmique ....                                  | 53 |
| (6) Xanthine oxydase ....                                                                   | 53 |
| (7) Lipooxygénase, cyclooxygénases et acide arachidonique.....                              | 53 |
| (8) Les aminoacides oxydases : l'IL4I1. ....                                                | 54 |
| <b>D. Espèces réactives de l'oxygène présentes dans le condensat de fumée de cigarette.</b> | 54 |
| a) L'anion superoxyde.....                                                                  | 55 |
| b) Le peroxyde d'hydrogène.....                                                             | 56 |
| c) Le peroxydinitrite ....                                                                  | 56 |
| d) Autres composants du CFC susceptibles d'induire une production d'ERO. ....               | 56 |
| <b>E. Réponse anti-oxydante.</b> .....                                                      | 57 |
| a) Systèmes antioxydants non enzymatiques : le glutathion (GSH). ....                       | 57 |
| b) Réponse anti-oxydante Nrf2 dépendante. ....                                              | 58 |
| c) Les systèmes antioxydants enzymatiques régulés par Nrf2. ....                            | 60 |
| (1) Le système thiorédoxine (Trx) / thiorédoxine réductase (TrxR). ....                     | 60 |
| (2) Superoxyde dismutase (SOD). ....                                                        | 62 |
| (3) Glutathion peroxydase (GPx) et glutathion réductase (GR). ....                          | 62 |
| (4) Glutamylcystéine synthétase (GCL ou GCS). ....                                          | 63 |
| (5) Catalase.....                                                                           | 63 |
| (6) Peroxyrédoxines (Prx). ....                                                             | 63 |
| (7) NADP(H) : quinone oxidoreductase 1 (NQO1). ....                                         | 64 |
| (8) Heme oxygénase (HO). ....                                                               | 64 |
| d) Anomalies de la réponse anti-oxydante chez les fumeurs et les patients BPCO. ....        | 65 |

### III. Les différentes populations lymphocytaires T CD4<sup>+</sup> ..... 66

|                                                                                     |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>A. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> dans la réponse immunitaire.</b>            | 66  |
| <b>B. Les lymphocytes auxiliaires/ « helpers » (Th).</b>                            | 67  |
| 1. Les lymphocytes Th1.                                                             | 69  |
| 2. Les lymphocytes Th2.                                                             | 70  |
| 3. Les lymphocytes Th17.                                                            | 72  |
| a) Découverte des Th17.                                                             | 72  |
| b) Phénotype et caractérisation des Th17.                                           | 73  |
| c) Différenciation des Th17.                                                        | 77  |
| (1) Environnement cytokinique.                                                      | 77  |
| (2) Rôle du métabolisme énergétique.                                                | 80  |
| (3) Autres facteurs influençant la différenciation des Th17.                        | 84  |
| (a) Flore microbienne                                                               | 84  |
| (b) AhR                                                                             | 85  |
| (c) Oxyde nitrique                                                                  | 86  |
| d) Rôle physiologique, cytokines et chimiokines produites par les lymphocytes Th17. | 86  |
| e) Plasticité fonctionnelle des Th17.                                               | 90  |
| (1) Th17/Th1 et Th17/Th2.                                                           | 90  |
| (2) Th17/Treg                                                                       | 91  |
| f) Implication des Th17 dans les désordres immunitaires.                            | 93  |
| (1) Th17 dans les maladies auto-immunes et inflammatoires chroniques.               | 93  |
| (2) Th17 et cancers                                                                 | 97  |
| 4. Les lymphocytes T régulateurs.                                                   | 98  |
| (1) Les lymphocytes T régulateurs naturels (nTregs).                                | 98  |
| (2) Les lymphocytes T régulateurs induits (iTregs)                                  | 99  |
| (3) Mécanismes de suppression des Tregs                                             | 100 |
| (a) Suppression par des cytokines ou des molécules sécrétées :                      | 100 |
| (b) Mécanismes nécessitant un contact cellulaire.                                   | 101 |
| (c) Déplétion du microenvironnement des lymphocytes T conventionnels.               | 102 |

#### **IV. Rôle de la voie de signalisation des MAP kinases dans l'activation et la différenciation fonctionnelle des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Th et régulation par les ERO.**

104

|                                                                                                                                          |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>A. Stimulation homéostasique du TCR et voies de signalisation des MAP kinases dans les lymphocytes T quiescents.</b>                  | 104 |
| <b>B. Rôle de la voie de signalisation des MAP kinases dans l'activation et la différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Th.</b> | 105 |
| <b>C. Rôle de ERK1/2 dans la prolifération des lymphocytes T CD4<sup>+</sup></b>                                                         | 107 |
| <b>D. Rôle de ERK1/2 dans la différenciation fonctionnelle des Th1/2/17.</b>                                                             | 108 |
| <b>E. Régulation de l'activité ERK1/2</b>                                                                                                | 109 |
| 1. Régulation de l'activité ERK1/2 par compartimentalisation sub-cellulaire                                                              | 109 |
| 2. Régulation de la phosphorylation de ERK1/2 par les ERO.                                                                               | 111 |
| <b>F. ERO et activation des lymphocytes.</b>                                                                                             | 113 |
| <b>G. Sensibilité aux ERO des différentes sous-populations de lymphocytes T</b>                                                          | 114 |
| <br><b>V. Effets généraux de la fumée de cigarette sur les cellules</b>                                                                  | 116 |
| A. Inflammation                                                                                                                          | 116 |
| B. Dommages de l'ADN                                                                                                                     | 118 |
| C. Autophagie                                                                                                                            | 119 |
| D. Mort cellulaire                                                                                                                       | 120 |
| E. Sénescence                                                                                                                            | 122 |
| a) Caractéristiques des cellules sénescences.                                                                                            | 123 |
| (1) Modifications morphologiques.                                                                                                        | 123 |
| (2) Activité $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence.                                                                            | 124 |
| (3) Arrêt du cycle cellulaire.                                                                                                           | 124 |
| (4) Résistance à l'apoptose.                                                                                                             | 124 |
| (5) Modifications de l'expression des gènes.                                                                                             | 125 |
| (6) Dommages de l'ADN.                                                                                                                   | 125 |
| b) Les différentes formes de sénescence cellulaire                                                                                       | 125 |
| (1) La sénescence répllicative.                                                                                                          | 126 |
| (2) La sénescence accélérée.                                                                                                             | 127 |
| c) Exposition à la fumée de cigarette et sénescence.                                                                                     | 128 |
| <br><b>VI. Effets de l'exposition à la fumée de cigarette sur les défenses immunitaires</b>                                              | 130 |

|                                                                                                |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>A. Conséquences <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> sur les cellules de l'immunité innée.</b> | 130 |
| 1. Macrophages alvéolaires                                                                     | 131 |
| 2. Neutrophiles.                                                                               | 132 |
| 3. Cellules dendritiques.                                                                      | 133 |
| 4. Cellules NK.                                                                                | 134 |
| <b>B. Exposition à la fumée de cigarette et réponse immunitaire adaptative</b>                 | 134 |
| 1. Lymphocytes T.                                                                              | 135 |
| 2. Lymphocytes B.                                                                              | 137 |

## **Chapitre 2 : Hypothèses et objectifs**..... 139

## **Chapitre 3 : Matériel et méthodes**..... 142

### **I. Milieux de culture** ..... 143

### **II. Isolement des cellules mononuclées du sang périphérique**..... 143

|                           |     |
|---------------------------|-----|
| <b>A. Principe</b>        | 143 |
| <b>B. Mode opératoire</b> | 143 |

### **III. Enrichissement en lymphocytes T CD4<sup>+</sup> par tri immuno-magnétique** 144

|                           |     |
|---------------------------|-----|
| <b>A. Principe</b>        | 144 |
| <b>B. Mode opératoire</b> | 145 |

### **IV. Identification et isolement des sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> par cytométrie en flux**..... 146

|                                                                                                         |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>A. Principe de la cytométrie en flux et fonctionnement d'un analyseur et d'un trieur de cellules</b> | 146 |
| <b>B. Caractérisation des sous-populations lymphocytaires : stratégie de « gating ».</b>                | 149 |
| <b>C. Mode opératoire</b>                                                                               | 152 |
| 1. Marquages des différentes sous-populations de lymphocytes T CD4 <sup>+</sup>                         | 152 |

|                                                                                                                                                                                                                |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 2. Tri cellulaire des différentes sous-populations de lymphocytes T CD4+.                                                                                                                                      | 154 |
| <b>V. Numération et analyse de la viabilité cellulaire par coloration au bleu de Trypan.</b>                                                                                                                   | 156 |
| A. Principe                                                                                                                                                                                                    | 156 |
| B. Mode opératoire                                                                                                                                                                                             | 156 |
| <b>VI. Analyse de l'activité <math>\beta</math>-galactosidase.</b>                                                                                                                                             | 157 |
| A. Principe                                                                                                                                                                                                    | 157 |
| B. Mode opératoire                                                                                                                                                                                             | 157 |
| <b>VII. Exposition à différents modes d'agression oxydante</b>                                                                                                                                                 | 158 |
| A. Préparation du condensat de fumée de cigarette et exposition <i>in vitro</i> .                                                                                                                              | 158 |
| B. Induction d'ERO par exposition au TBHP.                                                                                                                                                                     | 161 |
| <b>VIII. Traitement des cellules par différents inhibiteurs pharmacologiques.</b>                                                                                                                              | 161 |
| A. La N-acétylcystéine (NAC).                                                                                                                                                                                  | 161 |
| B. Le p-trifluoromethoxy-carbonyl-cyanide-phenyl hydrazone (FCCP).                                                                                                                                             | 162 |
| C. Antimycine et roténone.                                                                                                                                                                                     | 162 |
| D. Inhibiteurs des MAP kinases kinases : UO126 et PD98059.                                                                                                                                                     | 163 |
| <b>IX. Analyse par cytométrie en flux de la production d'espèces réactives de l'oxygène dans les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> exposés au condensat de fumée de cigarette.</b> | 163 |
| A. Principe                                                                                                                                                                                                    | 163 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                  |            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>B. Mode opératoire .....</b>                                                                                                                                                                                                                                                  | <b>164</b> |
| <br><b>X. Analyse par immunocytofluorescence de l'expression de différentes protéines dans les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> exposés au condensat de fumée de cigarette.....</b>                                                                 | <b>165</b> |
| A. Principe .....                                                                                                                                                                                                                                                                | 165        |
| B. Analyse de l'expression de p16 <sup>INK4a</sup> .....                                                                                                                                                                                                                         | 165        |
| C. Analyse par immunocytofluorescence de la phosphorylation et de la localisation de ERK1/2. ....                                                                                                                                                                                | 166        |
| <br><b>XI. Analyse de l'expression des gènes par réaction de polymérisation en chaîne après transcription inverse, quantifiée en temps réel (RT-qPCR) dans les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> exposés au condensat de fumée de cigarette.....</b> | <b>168</b> |
| A. Conditions de culture et exposition des cellules au condensat de fumée de cigarette.....                                                                                                                                                                                      | 168        |
| B. Principe de la qPCR.....                                                                                                                                                                                                                                                      | 168        |
| C. Design des couples d'amorces nucléotidiques utilisés pour la PCR. ....                                                                                                                                                                                                        | 170        |
| D. Déroulement d'une analyse de l'expression de gènes par RT- PCR quantitative en temps réel .....                                                                                                                                                                               | 171        |
| 1. Extraction des ARN .....                                                                                                                                                                                                                                                      | 172        |
| 2. « Reverse transcription » ou synthèse d'ADN complémentaire. ....                                                                                                                                                                                                              | 172        |
| 3. PCR et analyse des résultats.....                                                                                                                                                                                                                                             | 172        |
| <br><b>XII. Analyse du sécrétome des différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> exposées au condensat de fumée de cigarette.....</b>                                                                                                                          | <b>176</b> |
| A. Principe. ....                                                                                                                                                                                                                                                                | 177        |
| B. Quantification de protéines par la technique Cytometric Beads Array (CBA). ....                                                                                                                                                                                               | 178        |
| C. Quantification des protéines par la technique Luminex.....                                                                                                                                                                                                                    | 178        |

|                        |     |
|------------------------|-----|
| XIII.Statistiques..... | 178 |
|------------------------|-----|

|                                    |            |
|------------------------------------|------------|
| <b>Chapitre 4 : Résultats.....</b> | <b>180</b> |
|------------------------------------|------------|

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| I. L'exposition au condensat de fumée de cigarette induit une augmentation de différents marqueurs de sénescence dans les lymphocytes Th17 quiescents: augmentation de l'activité $\beta$ -galactosidase et de l'expression des inhibiteurs du cycle cellulaire p16 <sup>INK4a</sup> et ATF3..... | 181 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

|                                                                                                                                                                                           |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| II. L'exposition au CFC induit l'augmentation de la sécrétion de l'IL-8 par les lymphocytes Th17 quiescents, et une inhibition du secrétome spécifique des lymphocytes Th17 activés. .... | 188 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

|                                                                                                                                                                          |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| III. La voie des MAPKs ERK1/2 est impliquée dans la sur-expression de p16 <sup>INK4a</sup> dans les lymphocytes Th17 quiescents en réponse à une exposition au CFC. .... | 197 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

|                                                                                                                                                         |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| IV. Les espèces réactives de l'oxygène contribuent à la spécificité de l'activation de ERK1/2 dans les lymphocytes Th17 quiescents exposés au CFC. .... | 202 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

|                                                                                                                                                                      |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| V. Les lymphocytes Th17 quiescents exposés au condensat de fumée de cigarette produisent plus d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> que les « non Th17 » et les Tregs..... | 204 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

|                                                                                                                                                                                        |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| VI. La chaîne respiratoire mitochondriale est impliquée dans la sur-expression de p16 <sup>INK4a</sup> induite dans les lymphocytes Th17 quiescents lors d'une exposition au CFC. .... | 212 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

## **Chapitre 5 : Discussion, conclusion, perspectives ..... 221**

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| I. Rappel de la problématique et des principaux résultats. .... | 222 |
|-----------------------------------------------------------------|-----|

|                                                                                                                                                                                                                                                 |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| II. L'exposition au condensat de fumée de cigarette induit une augmentation de l'activité $\beta$ -galactosidase et de l'expression des inhibiteurs du cycle cellulaire p16 <sup>INK4a</sup> et ATF3 dans les lymphocytes Th17 quiescents. .... | 223 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

|                                                                                                                                         |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| III. La mitochondrie et la voie de signalisation ERK1/2 sont impliquées dans l'induction de la sénescence des Th17 exposés au CFC. .... | 227 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

|                                                                                                                        |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| A. Rôle de la voie de signalisation ERK1/2 dans l'induction de la sénescence des lymphocytes Th17 exposés au CFC. .... | 227 |
| 1. Rôle de ERK1/2 dans l'expression de p16 <sup>INK4a</sup> dans les cellules T CD4 <sup>+</sup> exposées au CFC. .... | 227 |
| 2. Rôle des ERO et place dans la cascade d'activation de ERK1/2. ....                                                  | 229 |
| B. Origine des ERO dans les lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> exposés au CFC. ....                                        | 231 |
| C. Effet des traitements antioxydants sur l'expression de p16 <sup>INK4a</sup> ....                                    | 236 |
| D. Rôle des ERO mitochondriales dans l'activation de la voie ERK1/2. ....                                              | 236 |

|                                               |     |
|-----------------------------------------------|-----|
| IV. Conclusion générale et perspectives. .... | 238 |
|-----------------------------------------------|-----|

|                                   |     |
|-----------------------------------|-----|
| Références bibliographiques. .... | 240 |
|-----------------------------------|-----|

|               |     |
|---------------|-----|
| Annexes. .... | 300 |
|---------------|-----|

|                                                                                                                                                                                                                                                                                       |            |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| I. Caractérisation des différentes sous-populations de lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> auxiliaires et expression du marqueur CCR6 à la surface des PBMCs de donneurs volontaires sains.....                                                                                            | 301        |
| II. Réponse antioxydante dépendante de Nrf2 et expression du gène codant pour l'IL4I1 dans les différentes sous-populations de lymphocytes CD4 <sup>+</sup> exposées à la fumée de cigarette.....                                                                                     | 302        |
| A. Réponse anti-oxydante dépendante de Nrf2 des différentes sous-populations de lymphocytes CD4 <sup>+</sup> exposées à la fumée de cigarette. ....                                                                                                                                   | 302        |
| B. Expression du gène IL4I1 dans les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> .....                                                                                                                                                                             | 306        |
| C. Séquences des primers utilisés. ....                                                                                                                                                                                                                                               | 307        |
| III. Article : L'absence de la protéine adaptatrice PEA-15 est associé à un profil de production des cytokines Th des lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> activés altéré <i>in vitro</i> , et à un défaut de la réponse alloimmune dirigée contre les globules rouges <i>in vivo</i> ..... | 309        |
| <b>Résumés .....</b>                                                                                                                                                                                                                                                                  | <b>328</b> |

## **Index des figures et tables.**

## Liste des figures

|                                                                                                                                                                     |         |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| <b>Fig.I 1.</b> Physiopathologie de la BPCO : Interface cellules pulmonaires et immunes dans l'emphysème pulmonaire. ....                                           | 30      |
| <b>Fig.I 2.</b> Composition de la fumée de cigarette totale. ....                                                                                                   | 38      |
| <b>Fig.I 3.</b> Production d'ERO mitochondriales. ....                                                                                                              | 48      |
| <b>Fig.I 4.</b> Structure de la NADPH oxydase.....                                                                                                                  | 51      |
| <b>Fig.I 5.</b> Les différentes NADPH oxydase.. ....                                                                                                                | 51      |
| <b>Fig.I 6.</b> Représentation schématique de l'activation de la réponse antioxydante dépendante de Nrf2 par un stress oxydant.. ....                               | 59      |
| <b>Fig.I 7.</b> Différenciation des lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> naïfs vers les phénotypes fonctionnels Treg, Th1, Th2 et Th17.....                               | 69      |
| <b>Fig.I 8.</b> Modèle de différenciation des lymphocytes Th1. ....                                                                                                 | 70      |
| <b>Fig.I 9.</b> Modèle de différenciation des lymphocytes Th2. ....                                                                                                 | 72      |
| <b>Fig.I 10.</b> Expression de CCR6 à la surface des lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> .....                                                                           | 75      |
| <b>Fig.I 11.</b> Conditions de polarisation des Th17 chez l'homme. ....                                                                                             | 78      |
| <b>Fig.I 12.</b> Aperçu du changement de métabolisme lors de l'activation des lymphocytes T ...                                                                     | 81      |
| <b>Fig.I 13.</b> Aperçu du métabolisme des différentes sous-populations de lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> .82                                                       |         |
| <b>Fig.I 14.</b> Production de cytokines, chimiokines et facteurs de croissance .....                                                                               | 89      |
| <b>Fig.I 15.</b> Balance entre lymphocytes Tregs et Th17. ....                                                                                                      | 92      |
| <b>Fig.I 16.</b> Il-17 et son implication dans diverses pathologies auto-immunes et inflammatoires chroniques. ....                                                 | 95      |
| <b>Fig.I 17.</b> Vue schématique de la voie de signalisation du TCR.....                                                                                            | 106     |
| <b>Fig.I 18.</b> Vue d'ensemble du cycle cellulaire. ....                                                                                                           | 108     |
| <b>Fig.I 19.</b> Structure de la protéine PEA-15. ....                                                                                                              | 111     |
| <b>Fig.I 20.</b> Vue schématiques des mécanismes responsables de la mort cellulaire lors d'une exposition au condensat de fumée de cigarette. ....                  | 122     |
| <b>Fig.I 21.</b> Voies de signalisation impliquées dans la sénescence répliquative et la sénescence accélérée. ....                                                 | 126     |
| <br><b>Fig. MM 1.</b> Principe de la cytométrie en flux. ....                                                                                                       | <br>148 |
| <b>Fig. MM 2.</b> Stratégie de tri permettant d'identifier ou d'isoler les lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> T régulateurs, T conventionnels « non Th17 » et Th17..... | 151     |
| <b>Fig. MM 3.</b> Dispositif de préparation et oxydants présents dans le condensat de fumée de cigarette. ....                                                      | 160     |
| <b>Fig. MM 4.</b> Déroulement des 4 premiers cycles d'une réaction de PCR. ....                                                                                     | 169     |
| <b>Fig. MM 5.</b> Quantification d'un gène d'intérêt dans une série de dilutions d'un même échantillon. ....                                                        | 174     |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Fig. MM 6.</b> Principe des techniques du Cytometric Bead Array et du Luminex. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 177 |
| <b>Fig. R 1.</b> L'exposition des Th17 à la fumée de cigarette n'induit pas leur prolifération mais n'a pas d'effet sur leur viabilité.....                                                                                                                                                                                                                                            | 181 |
| <b>Fig. R 2.</b> Expression des gènes pro- ou anti-apoptotiques des différentes sous-populations exposées à 5% de condensat de fumée de cigarette pendant 48H.....                                                                                                                                                                                                                     | 182 |
| <b>Fig. R 3.</b> Les lymphocytes Th17 exposés à 5% de condensat de fumée de cigarette pendant 48H présente une activité $\beta$ -galactosidase plus importante comparativement aux lymphocytes conventionnels « non Th17 » et aux Tregs. ....                                                                                                                                          | 184 |
| <b>Fig. R 4.</b> Expression de molécules impliquées dans l'arrêt de la progression dans le cycle cellulaire, p53, p21 <sup>Cdkn1a</sup> et ATF3, ou associée aux changements morphologiques caractéristiques des cellules sénescences, LMB1, dans les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> exposées à 5% de condensat de fumée de cigarette pendant 48H..... | 186 |
| <b>Fig. R 5.</b> Les lymphocytes Th17 exposés à 5% de condensat de fumée de cigarette pendant 48H expriment plus fortement p16 <sup>INK4a</sup> comparativement aux lymphocytes conventionnels « non Th17 » et aux Tregs.....                                                                                                                                                          | 187 |
| <b>Fig. R 6.</b> Expression des facteurs de transcription spécifiques des différentes sous-populations de lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> après exposition à 5% de condensat de fumée de cigarette pendant 48H.....                                                                                                                                                                     | 189 |
| <b>Fig. R 7.</b> L'expression du VEGF $\alpha$ est augmentée dans les lymphocytes Th17 exposées à 5% de condensat de fumée de cigarette pendant 48H. ....                                                                                                                                                                                                                              | 191 |
| <b>Fig. R 8.</b> La sécrétion d'IL-8 est induite par l'exposition au condensat de fumée de cigarette de lymphocytes Th17 en l'absence de stimulation du TCR.....                                                                                                                                                                                                                       | 193 |
| <b>Fig. R 9.</b> L'exposition à 5% de condensat de fumée de cigarette inhibe la sécrétion des chimiokines RANTES, MIG, MIP1 $\alpha$ et MIP1 $\beta$ par les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> activés par une combinaison pro-mitogénique d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28. ....                                                                        | 194 |
| <b>Fig. R 10.</b> L'exposition à 5% de condensat de fumée de cigarette inhibe la sécrétion de la chimiokine CCL20(MIP3 $\alpha$ ) par les sous-populations de lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> Th17 et « non-Th17 » activés par une combinaison mitogénique d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28. ....                                                                                      | 195 |
| <b>Fig. R 11.</b> L'exposition au condensat de fumée de cigarette pendant 48H inhibe l'expression de l'IL-21 et l'IL-22 dans les lymphocytes Th17 activés par une combinaison pro-mitogénique d'anti-CD3 et d'anti-CD28.....                                                                                                                                                           | 196 |
| <b>Fig. R 12.</b> L'exposition au condensat de fumée de cigarette pendant 48H inhibe l'expression du GM-CSF dans les lymphocytes Th17 et « non-Th17 » activés par une combinaison pro-mitogénique d'anti-CD3 et d'anti-CD28.....                                                                                                                                                       | 197 |
| <b>Fig. R 13.</b> Place de la voie ERK1/2 dans les voies de signalisation susceptibles d'induire la sénescence des cellules exposées au condensat de fumée de cigarette. ....                                                                                                                                                                                                          | 198 |
| <b>Fig. R 14.</b> Les inhibiteurs de la voie ERK1/2 préviennent la sur-expression de p16 <sup>INK4a</sup> induite dans les Th17 exposés au condensat de fumée de cigarette. ....                                                                                                                                                                                                       | 199 |
| <b>Fig. R 15.</b> L'exposition au CFC induit une activation et une translocation nucléaire de ERK1/2 plus importante dans les Th17.....                                                                                                                                                                                                                                                | 201 |

|                                                                                                                                                                                                                                   |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Fig. R 16.</b> Lors d'une exposition au CFC, les ERO sont responsables de l'activation de ERK1/2 et de sa translocation nucléaire dans les lymphocytes Th17. ....                                                              | 203 |
| <b>Fig. R 17.</b> Les lymphocytes Th17 ont un taux basal d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> plus élevé que les Tregs et « non Th17 ». ....                                                                                           | 205 |
| <b>Fig. R 18.</b> En réponse à une exposition au CFC, la production d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> est augmentée dans les Th17 et « non Th17 », Tregs, mais pas la production d'O <sub>2</sub> <sup>-</sup> mitochondrial. ....  | 207 |
| <b>Fig. R 19.</b> Effet du traitement anti-oxydant par la NAC, et des traitements par l'antimycine, la rotéonone et le FCCP sur la production d'ERO dans les lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> exposés à la fumée de cigarette. .... | 210 |
| <b>Fig. R 20.</b> La production d'ERO dans les lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> exposés au CFC, n'est pas modifiée par la présence d'inhibiteurs de MAPKK. ....                                                                     | 211 |
| <b>Fig. R 21.</b> L'expression de p16 <sup>INK4a</sup> induite dans les Th17 et les « non-Th17 » exposés au CFC est partiellement inhibée par la NAC. ....                                                                        | 213 |
| <b>Fig. R 22.</b> L'inhibition du complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale prévient la sur-expression de p16 <sup>INK4a</sup> dans les lymphocytes Th17 exposés au CFC. ....                                         | 215 |
| <b>Fig. R 23.</b> Le découplage de la chaîne respiratoire mitochondriale prévient l'expression de p16 <sup>INK4a</sup> dans les lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> exposés au CFC. ....                                               | 217 |
| <b>Fig. R 24.</b> Le découplage de la chaîne respiratoire mitochondriale prévient l'activation de ERK1/2 et sa translocation nucléaire dans les lymphocytes Th17 exposés au CFC. ....                                             | 219 |
|                                                                                                                                                                                                                                   |     |
| <b>Fig. A 1.</b> Fréquence des cellules exprimant le marqueur CCR6 au sein des PBMCs de donneurs volontaires sains. ....                                                                                                          | 301 |
| <b>Fig. A 2.</b> Expression des gènes codant pour les différents membres du système anti-oxydant Nrf2 après exposition au CFC. ....                                                                                               | 303 |
| <b>Fig. A 3.</b> Analyse de la réponse antioxydante dépendante de Nrf2 après exposition au CFC dans les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> ....                                                       | 305 |
| <b>Fig. A 4.</b> Analyse de l'expression de la L-phenylalanine oxydase IL4I1 dans les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> en absence de stimulation et après exposition à 5% de CFC. ....              | 306 |

## Liste des tables

|                                                                                                                                       |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Table I 1.</b> Espèces radicalaires de l'oxygène. ....                                                                             | 41  |
| <b>Table I 2.</b> Espèces non radicalaires de l'oxygène. ....                                                                         | 43  |
| <b>Table I 3.</b> Les enzymes anti-oxydantes régulées par Nrf2. ....                                                                  | 60  |
|                                                                                                                                       |     |
| <b>Table MM 1.</b> Anticorps utilisés pour l'identification des différentes sous-populations de lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> . .... | 152 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Table MM 2.</b> Descriptif des contrôles à réaliser lors d'un marquage permettant l'identification de différentes sous-populations de lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> .....                                                                                                                                       | 153 |
| <b>Table MM 3.</b> Anticorps utilisés pour l'identification des différentes sous-populations de lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> .....                                                                                                                                                                                | 155 |
| <b>Table MM 4.</b> Descriptif des contrôles à réaliser lors d'un marquage permettant l'identification des différentes sous-populations de lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> .....                                                                                                                                      | 155 |
| <b>Table MM 5.</b> Liste des amorces nucléotidiques utilisées pour l'analyse du transcriptome des différentes sous-populations de lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> exposés ou non au condensat de fumée de cigarette. ....                                                                                            | 176 |
| <b>Table R 1.</b> Cytokines, chimiokines et facteurs de croissance spécifiques de chaque sous-population de lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> , ou exprimés par toutes les sous-populations de lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> analysés dans ces cellules en absence d'exposition ou après 48H d'exposition au CFC..... | 190 |
| <b>Table A 1.</b> Liste des amorces nucléotidiques utilisées pour l'analyse de la réponse anti-oxydante des différentes sous-populations de lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> exposés ou non au condensat de fumée de cigarette.....                                                                                   | 308 |

## Abréviations

$\Delta\Psi_m$  : potentiel de membrane

## **A**

AhR : aryl-hydrocarbon receptor

Akt : Protein kinase B (PKB)

AMP: Adénosine Mono-Phosphate

AP-1: Activator protein 1

ARNm : acide ribonucléique messenger

ATF3: Activating Transcription Factor 3

ATM : Ataxia telangiectasia mutated

ATP : adénosine-5'-triphosphate

ATR :ataxia-telangiectasia related

## **B**

Bcl 2: B-cell lymphoma 2

BPCO : Broncho Pneumopathie Chronique Obstructive

## **C**

CamKII : Calcium/calmoduline kinase

CBA : cytometric beads array

CCL20 (MIP-3 $\alpha$ ) : Macrophage Inflammatory Protein-3

CCR6 : Chemokine receptor 6

CDK : kinases dépendantes des cyclines

CFC : condensat de fumée de cigarette

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CPA : cellule présentatrice d'antigène

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

## **D**

DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole

DC : cellule dendritique

DHE : Dihydroéthidine

DNP : 2,4 dinitrophénol

DUOX1: Dual oxidase 1

## **E**

EAE : encéphalomyélite autoimmune expérimentale

EGF : epidermal growth factor

ERK1/2 : Extracellular signal-regulated kinases 1/2

ERN : espèces réactives de l'azote

ERO: espèces réactives de l'oxygène

## **F**

FAD: Flavine adénine dinucléotide

FCCP : p-trifluoromethoxy-carbonyl-cyanide-phenyl hydrazine

FGF: fibroblast growth factor

FMO : Fluorescence Minus One

FOXP3 : Forkhead box P3

## **G**

GCLM : glutamate-cystéine ligase

GM-CSF : Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

GPx : Glutathion peroxydase

GR : glutathion réductase

GSH: glutathion réduit

## **H**

H2DCF-DA : 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : peroxide d'hydrogène

HO-1 : heme oxygénase

HUVEC : Human Umbilical Vein Endothelial Cells

ICAM-1 : Intercellular Adhesion Molecule 1

## **I**

IFN- $\gamma$  : Interféron- $\gamma$

Ig : immunoglobuline

IL-17 : Interleukine 17

IL4I1 : Interleukin 4 Induced 1

IL-8/CXCL8 : Interleukine 8

IP<sub>3</sub> : inositol 1,4,5-triphosphate

## **J**

JNK : c-Jun N-terminal kinase

## **K**

Keap1 : Kelch-like ECH-associated protein 1

## **L**

LAG-3 : Lymphocyte activation Gene-3

LBA : lavage broncho alvéolaire

## **M**

MAPK : Mitogen-activated protein kinase

MAPKK : kinase des MAPK

MCP-1/CCL2 : Monocyte chemotactic protein 1

MDM2 : murine double minute

MFI : Moyenne de fluorescence

MIP1 $\alpha$ /CCL3 : Macrophage Inflammatory Protein 1 alpha

MIP1 $\beta$ /CCL4 : Macrophage Inflammatory Protein 1 beta

MIP-3 $\alpha$ /CCL20 : Macrophage Inflammatory Protein 3 alpha

MitoSox :mitochondrial-targeted HE

MKPs : phosphatases des MAPKs

MMPs : métalloprotéases matricielles

mTOR : mammalian target of rapamycin

## **N**

NAC : N-acétyl Cystéine

NAD : Nicotinamide adenine dinucleotide

NFAT : Nuclear factor of activated T-cells

NF $\kappa$ B : nuclear factor-kappa B

NK : natural killer

NKT : lymphocyte natural killer T

NOX : NADPH oxydase

NQO1 : NAD(P)H :quinone oxydoréductase-1

NRF2 : Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2

## O

O<sub>2</sub><sup>-</sup> : anion superoxyde

•OH : radical hydroxyle

ONOO<sup>-</sup> : peroxynitrite

## P

PBS : phosphate buffer saline

PCR : polymerase chain reaction

PDGF : Platelet-derived growth factor

PDH : Pyruvate dehydrogenase

PEA-15 : Phosphoprotein Enriched in Astrocytes

PKC : Protein kinase C

PMA : phorbol 12-myristate 13-acetate

PMT : photomultiplicateur

PRR : récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires

Prx : Peroxyrédoxine

## R

RANTES/CCL5 : regulated on activation, normal T cell expressed and secreted

Rb : protéine du rétinoblastome

ROR $\gamma$ T/ RORC2: retinoic acid-related orphan receptor T

RT-qPCR : PCR quantitative en temps réel

## S

SFB : bactéries filamenteuses segmentées

SOD : Superoxyde Dismutase

STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription

## T

T CD4<sup>+</sup> : lymphocyte T CD4<sup>+</sup>

T CD8<sup>+</sup>: lymphocyte T CD8<sup>+</sup>

Tbet : T box expressed in T cells

Tconv : lymphocytes T CD4<sup>+</sup> conventionnels

TCR : récepteur des lymphocytes T spécifique d'antigène

TGF- $\beta$ : Transforming growth factor- $\beta$

Th : Lymphocytes T auxiliaires ou « helpers »

TBHP: *tert*-butyl Hydrogen peroxide

TLR :Toll like receptor

TNF- $\alpha$  : facteur de nécrose tumorale

TRAIL : tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand

Treg : Lymphocyte T régulateur

Trx : thiorédoxine

TrxR : thiorédoxine réductase

TSLP : Thymic stromal lymphopoietin

## U-Z

UCP : Uncoupling Protein

VEGF: Vascular endothelial growth factor

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

ZAP-70: Zeta-Chain (TCR) Associated Protein Kinase 70kDa

## Avant-propos.

Le tabac est une cause de morbidité et de mortalité très importante dans notre société et représente de loin le facteur de risque le plus simple à éviter pour de nombreuses pathologies. En plus de son rôle démontré dans certains cancers, le tabagisme est un facteur étiologique ou péjoratif important dans de nombreuses maladies inflammatoires chroniques, dont la bronchopneumopathie obstructive chronique (BPCO).

La plupart des composés de la fumée de cigarette sont connus pour leur effet carcinogène ou toxique pour les cellules. Les voies aériennes supérieures et les poumons sont les premiers organes exposés à la fumée de cigarette. Ce sont aussi un des principaux lieux d'exposition de l'organisme à des pathogènes et des antigènes environnementaux. Divers mécanismes de défenses de l'organisme, en particulier le système immunitaire sont impliqués dans l'éradication de ces agressions dans le poumon. Cependant, le tabagisme est à l'origine d'anomalies de la réponse immunitaire innée et adaptative, conduisant à une plus grande susceptibilité des fumeurs aux infections.

En effet, la consommation de tabac est associée à la production à la fois de médiateurs pro-et anti-inflammatoires par les cellules endothéliales pulmonaires. Cependant, la fumée de cigarette provoque une altération des fonctions des cellules mononucléées impliquées dans l'immunité innée : monocytes et macrophages, polynucléaires neutrophiles et cellules dendritiques. De plus, l'effet de l'exposition des cellules du système immunitaire adaptatif à la fumée de cigarette consiste en un mélange d'inflammation et d'immunosuppression. Un défaut de capacité de prolifération ajouté à une susceptibilité à l'apoptose accrue des lymphocytes T  $CD4^+$  Th1, serait la cause d'une susceptibilité plus importante des fumeurs à certaines infections virales ou bactériennes dépendant de la réponse Th1 et des lymphocytes T  $CD8^+$  cytotoxiques (Hernandez CP, 2013, Shaler CR, 2013).

D'autre part, chez les fumeurs asymptomatiques, on observe une augmentation en nombre et en proportion des lymphocytes Th17 dans les tissus pulmonaires et dans le sang périphérique, et cette augmentation est plus importante chez les fumeurs atteints de BPCO, maladie dont le principal facteur étiologique est le tabagisme (Di Stefano A, 2009, Shan M, 2009 & 2012, Doe C, 2010, Wang H, 2014). Les lymphocytes Th17 sont impliqués dans la défense immunitaire contre certains champignons et bactéries extracellulaires. Cependant, leur rôle pathogène a été mis en évidence dans différentes pathologies inflammatoires chroniques, parmi lesquelles la BPCO. La prolifération des lymphocytes Th17 est finement contrôlée afin de limiter leur

activité pro-inflammatoire dangereuse. Chez les fumeurs, et encore plus chez les patients atteints de BPCO, cette augmentation des lymphocytes Th17 est une composante importante de l'inflammation chronique observée, et est associée à la sévérité de la maladie. Cette augmentation des lymphocytes Th17 chez les fumeurs, contraste avec la rareté habituelle de ces cellules dans les tissus périphériques-sites d'inflammation. Le rôle pathogène de l'augmentation des Th17 dans les poumons de fumeurs atteints de BPCO a été confirmé à l'aide de modèles animaux d'exposition à la fumée de cigarette reproduisant l'augmentation des Th17 (Harrison OJ, 2008) ; les souris déplétées des populations cellulaires exprimant le récepteur CCR6 (Chemokine receptor 6), incluant les Th17, sont partiellement protégées de l'inflammation et de la destruction des tissus alvéolaires pulmonaires (Brusselle GG, 2006, Bracke KR, 2006, Shan M, 2012). Les mécanismes permettant d'expliquer l'augmentation des Th17 chez les fumeurs sont encore inconnus.

La sénescence consiste dans un arrêt permanent de la prolifération cellulaire en rapport avec le raccourcissement des télomères (sénescence répllicative), ou en réponse à plusieurs autres formes de stress (sénescence accélérée), mais les cellules sénescents restent métaboliquement actives. De plus le sécrétome des cellules sénescents présente un profil de type pro-inflammatoire. La sénescence des cellules pulmonaires est associée à la pathogénèse de la BPCO.

A l'instar de ce qui a été décrit dans différentes cellules pulmonaires (Tsuji T, 2004, Nyunoya T, 2006, Tomita K, Amsellem V, 2011, Aoshiba K, 2012, Dagouassat M, 2013) des données existent concernant des caractéristiques compatibles avec la sénescence des lymphocytes du sang périphérique de fumeurs sains ou atteints de BPCO : un raccourcissement des télomères a été observé dans les PBMCs de patients atteints de BPCO (Savale L, 2009, Houben JM, 2009) et dans les lymphocytes circulants de fumeurs asymptomatiques ou atteints de BPCO (Morlà M, 2006, Song Z, 2010).

Dans notre étude, nous avons donc fait l'hypothèse que les lymphocytes Th17 présentent une susceptibilité augmentée à la sénescence induite par le tabac, en comparaison des autres lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, qui serait responsable de l'augmentation en nombre et en proportion des Th17 chez les fumeurs, et contribuerait à aggraver les maladies inflammatoires chroniques impliquant les Th17 chez les fumeurs. Nous avons donc analysé la susceptibilité des Th17 à la sénescence induite par l'exposition à la fumée de cigarette, et le rôle de l'activation de la voie de signalisation ERK1/2 (Extracellular signal-regulated kinases 1/2) dans ce phénomène. Nous avons également analysé le rôle des espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui sont impliquées dans la régulation de l'activation de ERK1/2 (Finkel T, 1998, Griffith CE, 1998, Lee K, 2002,

Devadas S, 2002, Kwon J, 2003), et des médiateurs importants de la sénescence cellulaire (Michiels C, 1990, Wang Y, 2004, Duan J, 2005, Nyunoya T, 2006).

La première partie de ce document fait tout d'abord la synthèse bibliographique du rôle du tabac dans les maladies inflammatoires chroniques et certaines formes de cancer. Nous avons ensuite dressé un aperçu des constituants de la fumée de cigarette, en particulier des composants pouvant être à l'origine d'un stress oxydant cellulaire. Nous avons également décrits les sources endogènes d'ERO, et les principaux systèmes antioxydants existant dans la cellule, et susceptibles d'être altérés par l'exposition à la fumée de cigarette. Nous avons ensuite décrit les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ainsi que le rôle et la régulation de la voie ERK1/2 dans les lymphocytes T quiescents et activés. Enfin, nous abordons les effets délétères de la fumée de cigarette sur les cellules et en particulier sur les cellules du système immunitaire.

Les objectifs et les hypothèses sur lesquelles sont basées ce travail sont énoncés dans la deuxième partie. La troisième partie de ce document présente les différentes cellules et les techniques utilisées dans cette étude. Les résultats de ce travail sont présentés dans la quatrième partie, et font l'objet en cinquième partie d'une discussion, suivie d'une conclusion générale et des perspectives.

Ce travail de thèse a été réalisé sous la direction du docteur Sabine Le-Gouvello (MCU-PH), dans l'équipe 4 de l'unité Inserm 955/IMRB (Institut Mondor de Recherche Biologique), codirigée par le docteur Sophie Lanone et le professeur Jorge Boczkowski, à la Faculté de Médecine de l'Université Paris Est Créteil.

## **Chapitre 1 : Synthèse Bibliographique**

## **I. Tabagisme et maladies : Le tabagisme, un facteur de risque démontré pour de nombreuses pathologies**

Le tabac est une cause de morbidité et de mortalité très importante dans le monde et représente de loin le facteur de risque le plus simple à éviter pour de nombreuses pathologies. La consommation de tabac est une des addictions les plus communes, et le tabac a la particularité d'être le seul produit de consommation courante à l'origine du décès de la moitié de ses consommateurs réguliers (Bauer TM, 2013, Alwan A, 2011), ce qui représente plus de 5 millions de morts par an. Ainsi, l'exposition à la fumée de cigarette est le principal facteur étiologique de la bronchopneumopathie obstructive (BPCO), et augmente significativement les risques de développer des maladies cardiovasculaires, différents types de cancers, et diverses infections microbiennes. La consommation de tabac est aussi un facteur de gravité dans la maladie de Crohn et l'arthrite rhumatoïde (Sopori M, 2002, Mehta H, 2008), et est associé à un retard de la guérison de certaines blessures. De plus, la consommation de tabac est associée à des symptômes menstruels aigus chez les fumeuses, une plus grande probabilité de grossesses non menées à terme, de mettre au monde des nouveaux-nés de faible poids, de transmettre le virus VIH-1 (virus de l'immunodéficience humaine) au fœtus, et une plus grande incidence de l'ostéoporose (Sopori M, 2002).

### **A. BPCO.**

La BPCO est une maladie pulmonaire inflammatoire chronique dont le principal agent étiologique est le tabagisme dans les pays industrialisés. La BPCO représente un problème majeur de santé publique mondial, et sa prévalence est de plus en plus importante dans les pays développés. Au niveau mondial, la BPCO affecte environ 63 millions de personnes et était à l'origine de 3 millions de morts en 2004. D'ici 2020, la BPCO devrait représenter la troisième cause de mortalité dans les pays occidentaux. Outre le tabagisme, elle peut être causée par des gaz et des particules nocives de l'environnement, notamment dans les pays émergents. La prévalence de la maladie est forte chez les fumeurs (1 fumeur sur 4).

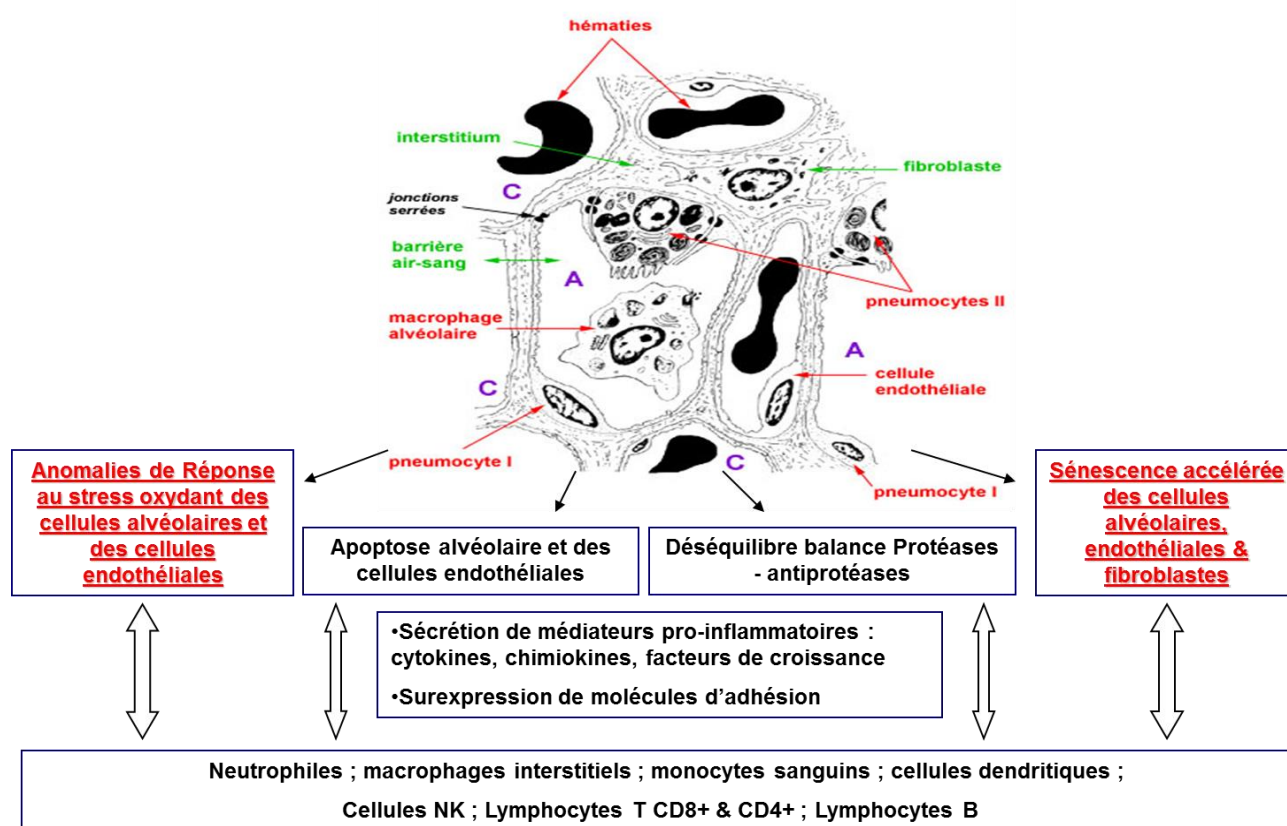
La BPCO est caractérisée par une augmentation progressive et non réversible de la taille des espaces aériens distaux conduisant à une réduction de la « pression élastique » et donc du débit expiratoire. Cette limitation est associée à un stress oxydant pulmonaire chronique, et à la présence d'un important infiltrat inflammatoire dans les voies aériennes et le parenchyme

pulmonaire, ainsi qu'à une destruction progressive des parois inter-alvéolaires, ou emphysème. Cet infiltrat inflammatoire est majoritairement constitué de neutrophiles et de macrophages, mais aussi de cellules dendritiques et de cellules T activées.

Le recrutement et l'activation des différentes cellules inflammatoires jouent un rôle majeur dans la progression de la BPCO. Le rôle des polynucléaires neutrophiles, macrophages et lymphocytes T CD8<sup>+</sup> est déjà bien décrit. Ces neutrophiles et macrophages sont capables de sécréter des médiateurs de l'inflammation (cytokines et chimiokines) et des protéinases telles que les métalloprotéinases matricielles (MMPs) ou l'élastase des neutrophiles qui jouent un rôle dans la destruction des tissus pulmonaires. Chez les patients atteints de BPCO une augmentation du nombre de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> dans les tissus pulmonaires est observée avec un ratio lymphocytes T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> en faveur des CD8<sup>+</sup>. Il existe une corrélation entre le degré de destruction des parois alvéolaires et l'augmentation du nombre de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (Barnes PJ 2004, Motz GT, 2008).

La fumée de cigarette contient plus de 4500 xénobiotiques et 10<sup>14</sup> radicaux libres capables d'endommager les cellules épithéliales. Les produits générés par ces cellules endommagées peuvent constituer des ligands pour les Toll-like receptors (TLR) 2 et 4. La fixation des ligands sur ces récepteurs, en activant la voie NF-κB, entraîne la production de facteurs pro-inflammatoires par les cellules épithéliales. Ces facteurs recrutent et activent les cellules de l'immunité innée dont les macrophages et les neutrophiles qui répondent en produisant des enzymes protéolytiques et accentuent les dommages causés aux tissus pulmonaires. D'autres événements tels des désordres des balances protéases/antiprotéases et oxydants/antioxydants peuvent aussi causer des dommages aux cellules. Il a été proposé que ceci pourrait avoir pour effet de mettre à jour des autoantigènes, modifier des protéines ou libérer l'ADN des cellules apoptotiques ; ces produits pourraient être reconnus par le système immunitaire adaptatif comme des antigènes étrangers et être à l'origine d'une réponse immunitaire autoimmune (Cosio MG, 2009). A l'instar d'autres pathologies chroniques inflammatoires, des études récentes indiquent que le lien entre la réponse immunitaire innée et la réponse adaptative est réalisée par les cellules dendritiques impliquées dans la pathogénèse de la BPCO (Demoor, T, 2009). Chez les patients atteints de BPCO une augmentation des cellules dendritiques matures est retrouvée dans les tissus pulmonaires (Cosio MG, 2009). Il est possible que dans les poumons de fumeurs ces cellules utilisent le matériel issu des cellules endommagées ou apoptotiques pour les présenter associés à des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et activer les cellules de l'immunité adaptative. La réponse immunitaire adaptative fait intervenir des lymphocytes B et T (CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>), activés par les

cellules dendritiques. Attirés par l'inflammation persistante des tissus sous-jacents, ces lymphocytes sont recrutés au niveau de l'endothélium vasculaire. La réponse adaptative peut s'installer dans le temps. Il s'agit d'une réponse inflammatoire chronique qui fait intervenir des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> effecteurs de type Th1 et des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (Cosio MG, 2009) (Fig I1).



**Fig.I 1. Physiopathologie de la BPCO : Interface cellules pulmonaires et immunes dans l'emphysème pulmonaire.**

Plus récemment, une proportion plus importante des populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sécrétant de l'interleukine 17 A (IL-17A), ou Th17, circulantes et pulmonaires a été retrouvée chez les fumeurs qu'ils soient atteints ou non de BPCO (Di Stefano A, 2009, Shan M, 2009, Doe C, 2011, Wang H, 2015). Cette augmentation 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). Les lymphocytes CD4<sup>+</sup> sécrétant de l'IL-17 (Th17) privilégient et renforcent la réponse des cellules de l'immunité innée.

A l'inverse, un petit nombre d'études ont montré que les poumons de personnes n'ayant jamais fumé ou de fumeurs possédant des fonctions pulmonaires normales contiennent un nombre plus important de lymphocytes T régulateurs (Tregs) par rapport aux poumons de patients atteints

de BPCO et d'emphysème, suggérant un déficit chez ces patients de la régulation de la réponse inflammatoire chronique (Barcelo, B, 2008, Roos-Engstrand E, 2009).

Ces différentes études sont en faveur d'un rôle majeur des Th17 dans l'inflammation associée à la BPCO. Cependant, le mécanisme causal de l'augmentation des Th17 chez les fumeurs avec ou sans BPCO n'est pas encore clairement défini.

## **B. Autres maladies inflammatoires chroniques.**

L'exposition à la fumée de cigarette majore la sévérité de nombreuses maladies inflammatoires chroniques telles que la sclérose en plaque (Riise T, 2003, Hernan MA, 2005), l'arthrite rhumatoïde (Saag KG, 1997) et certaines maladies inflammatoires chroniques de l'intestin telles que la maladie de Crohn (Cosnes J, 2010). De manière intéressante, ces maladies ont été associées à un rôle pathogène de la sous-population des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> de type Th17. En revanche, le tabagisme protège contre la rectocolite hémorragique et en atténue l'évolution (Bustamante M, 1998).

## **C. Maladies cardiovasculaires.**

Les maladies cardiovasculaires comprennent un ensemble de troubles affectant le cœur et les vaisseaux sanguins (cardiopathies coronariennes, maladies cérébro-vasculaires, artériopathies périphériques et rhumatismales, les thromboses veineuses, ...). La consommation de tabac est un des principaux facteurs de risque cardiovasculaire (Ezzati M, 2005). Elle augmente le risque coronaire (Kawachi I, 1994 ; 1997) et est souvent associée à la survenue d'accidents coronaires aigus chez des sujets jeunes et à la survenue des infarctus du myocarde avant 45 ans (Marques-Vidal P, 2001), et augmente le risque d'accident vasculaire cérébral (Shinton R, 1989).

L'inflammation et la réponse immunitaire adaptative participent à la pathogénèse de l'athérosclérose dès les stades les plus précoces et peuvent influencer la survenue et l'issue de syndromes coronaires aigus. Les polynucléaires neutrophiles prennent part aux processus athéroscléreux et il existe une corrélation statistique entre une augmentation du nombre de neutrophiles activés circulants et le risque d'infarctus du myocarde. Chez les fumeurs, on observe un plus grand nombre de polynucléaires circulants par rapport aux non-fumeurs. De plus chez les fumeurs, les neutrophiles ont des niveaux d'expression plus importants de myéloperoxydase et des intégrines CD11b, CD15 et CD63, qui sont respectivement des

marqueurs d'activation de ces cellules et permettent d'augmenter l'adhésion aux cellules endothéliales et l'accès au site inflammatoire (Gustafsson A, 2000). Les macrophages sont impliqués dans la progression des lésions athéroscléreuses. Ceux-ci participent à la dégradation de la matrice extracellulaire facilitant la rupture des plaques d'athérome (Caligiuri G, 2004). Chez les fumeurs, les monocytes montrent également une augmentation de l'expression des intégrines CD11b et CD18 facilitant leur infiltration dans les tissus inflammatoires où ils se différencieront en macrophages. Il n'existe pas de données sur l'effet de la fumée de cigarette sur cette différenciation (Gustafsson A, 2000). Enfin, les lymphocytes T, et en particulier les CD4<sup>+</sup> sont associés au développement de l'athérosclérose et des syndromes coronaires aigus (Zhao Z, 2011, Li Q, 2014). Les patients atteints de syndromes coronaires aigus montrent une augmentation importante du nombre de lymphocytes Th17, Th17/Th1 (IL-17A<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>) périphériques et une réduction du nombre de Tregs (Zhao Z, 2011). Néanmoins, à notre connaissance, il n'existe pas de données concernant un effet de la fumée de cigarette sur les populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> impliquées dans la pathogénese des maladies cardiovasculaires.

#### **D. Infections microbiennes**

Le risque de développer des infections microbiennes est plus important chez les fumeurs actifs, comparativement aux non-fumeurs, mais aussi chez les fumeurs passifs (avec une susceptibilité environ double de celle des non-fumeurs) (Bagaitkar J, 2008). Le tabagisme actif chez les parents est d'ailleurs fortement corrélé avec une augmentation de la fréquence des infections respiratoires d'origine bactérienne chez les enfants (Peat JK, 2001). Les fumeurs présentent une susceptibilité plus importante aux infections virales du tractus respiratoire (rhinovirus, influenza/varicella pneumonitis), ainsi qu'à des infections bactériennes, notamment par *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus Influenzae*, *Neisseria meningitis*, *Staphylococcus aureus*, *Legionella pneumophila* et *Mycobacterium tuberculosis*.

Les effets de la fumée de cigarette sur la susceptibilité aux infections sont le plus souvent attribuée à son effet sur les réponses immunitaires innées et adaptatives, mais un effet direct sur les pathogènes pourrait aussi être impliqué. La fumée de cigarette peut directement influencer le système mucociliaire et les mécanismes de la défense immunitaire innée contre les pathogènes, les macrophages alvéolaires et les cellules dendritiques, et avoir pour effet une absence des réponses immunitaires innées et adaptatives.

Parallèlement, les pathogènes bactériens exposés à la fumée de cigarette présentent une modification de leur phénotype et sont plus virulents (McEachern EK, 2015). Ces bactéries peuvent être présentes directement dans les cigarettes (Sapkota AR, 2010) et montrer une augmentation de l'expression d'enzymes histolytiques et de facteur d'adhérence (adhésine, protéine de liaison à la fibronectine, ...) (Baboni FB, 2009, Kulkarni R, 2012, Grigg J, 2012). Enfin, la présence de mutagènes dans la fumée de cigarette pourrait provoquer des mutations dans les génomes bactériens et être à l'origine d'une résistance aux antibiotiques (Miyahara, E, 2011). Il est à noter également que la BPCO est marquée par des épisodes d'exacerbations qui sont principalement provoquées par des pathogènes tels que *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* et *Moraxella Catarrhalis*. Ces organismes bactériens peuvent coloniser les voies respiratoires des patients BPCO entre les épisodes d'exacerbations et, puisque beaucoup de ces bactéries persistent entre les exacerbations, leur présence pourrait promouvoir une inflammation chronique au niveau pulmonaire participant ainsi à la pathogénèse de la BPCO.

La fumée de cigarette pourrait être également à l'origine d'une modification de la composition du microbiote des voies aériennes et du poumon. La relation entre le microbiote pulmonaire et le statut BPCO des patients est un sujet actuellement étudié par différentes équipes, et il n'existe pas encore de consensus sur une augmentation ou une diminution dans la diversité des communautés bactériennes (Hilty M, 2010, Erb-Downward JR, 2011, Pragman AA, 2012, Sze MA, 2012). Il a ainsi été montré, chez la souris, que la présence dans la muqueuse de l'intestin de bactéries Gram positif, de type filamentaire segmentée (SFB) telles que *Candidatus arthromitus*, est suffisante pour induire le développement de cellules Th17 productrices d'IL-17 et IL-22 (Ivanov II, 2009). Les bactéries SFB sont absentes chez l'homme, néanmoins, d'autres bactéries non encore identifiées mais présentant les mêmes propriétés pourraient être présentes. Une étude récente a montré que chez l'homme la présence des bactéries *Prevotella* et *Veillonella* dans les voies aériennes supérieures est associée à une augmentation du nombre de lymphocytes Th17 dans le lavage broncho alvéolaire (LBA) (Segal LN, 2016).

## **E. Tabagisme et VIH.**

Le VIH est à l'origine d'une maladie, le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA), caractérisée par une déplétion massive de la population de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> dans le tractus gastro-intestinal. Au sein de cette population digestive de T CD4<sup>+</sup>, les Th17 sont

particulièrement vulnérables (Brenchley JM, 2008). Au contraire, dans les tissus pulmonaires, les lymphocytes Th17 semblent plus résistants à la déplétion provoquée par le VIH (Brenchley JM, 2008).

La proportion de fumeurs chez les adultes positifs pour le VIH est forte (50 à 70%) (Feldman JG, 2006, Bernard A, 2007, Tesoriero JM, 2010). Chez les fumeurs positifs pour le VIH, le taux de mortalité est deux fois plus élevé que celui des non-fumeurs (Crothers K, 2005). De plus, chez les patients positifs pour le VIH et fumeurs, les effets des thérapies anti-rétrovirales sur la charge virale, la réponse immunitaire et la progression de la maladie sont moindres (Feldman JG, 2006, Lallo UG, 2016).

Le virus VIH et la consommation de tabac ont tous deux pour effet de supprimer les défenses immunitaires pulmonaires et sont associés à une probabilité plus importante de développer des maladies pulmonaires telles que des pneumonies d'origine bactérienne et la tuberculose (Tumbarello M, 1998, Miguez-Burbano MJ, 2005, Gordin FM, 2008). Les patients HIV positifs présentent de plus une susceptibilité plus importante et un âge de survenue plus précoce de développer une BPCO et un emphysème pulmonaire (Crothers K, 2006, Petrache I, 2008, Lallo UG, 2016).

Enfin, chez les patients VIH positifs fumeurs, en comparaison des patients non-fumeurs, l'incidence des cancers pulmonaires et cervicaux est élevée, et ces cancers apparaissent chez des sujets plus jeunes en comparaison de la population VIH négative (Kirk GD, 2007).

## **F. Cancer.**

### *a) Cancers associés au tabagisme : poumon, bouche, larynx, œsophage et vessie.*

La consommation de tabac est associée à un risque plus important par rapport aux non-fumeurs de développer des cancers du poumon (Sasco AJ, 2004), de la bouche, du larynx, du pharynx (Gandini S, 2008), du nasopharynx, de l'œsophage (Cook, MB, 2010), de l'estomac (Tredaniel J, 1997), du foie (Tanaka K, 2006), du pancréas (Bosetti C, 2012), du col de l'utérus (Slattery ML, 1989) et de la vessie (Brennan P, 2000). La plus forte association entre la consommation de tabac et le risque de survenue d'un cancer concerne logiquement les cancers du tractus respiratoire (poumon, larynx, pharynx,...)

La consommation de tabac est le facteur de risque le plus important pour le développement d'un cancer pulmonaire (Ezzati M, 2000). Les cancers du poumon sont une des principales causes de mortalité dans le monde, tant chez l'homme que chez la femme, et représentent un nombre de cas plus important que les cancers du sein, de la prostate et colorectaux réunis (Jemal A, 2008). Le rôle des nombreux composés toxiques contenus dans la fumée de cigarette dans la carcinogénèse pulmonaire a été démontré, et l'augmentation de la mortalité par cancer du poumon est étroitement liée à l'évolution de la consommation de tabac.

Le risque de survenue des cancers du tractus digestif, cancers de l'œsophage et cancers gastriques est également augmenté chez les fumeurs (Botteri E, 2008).

Enfin, la consommation de tabac augmente le risque de cancer dans des organes tels que le rein, la vessie, le col de l'utérus, le tractus urogénital et le pancréas, qui sont des organes exposés de manière indirecte à des produits de dégradation du tabac (Gandini S, 2008).

#### ***b) Cancer colorectal.***

Bien que le tabagisme soit associé à un risque augmenté de développer un adénome colorectal, la plupart des études concernant le tabagisme sur l'incidence et la mortalité par cancer n'associent pas le tabagisme à un risque augmenté de développer un cancer colorectal. Ceci est probablement dû à la durée importante du laps de temps nécessaire au développement de la tumeur, estimé à 30 à 40 ans après le début de la consommation de tabac. Néanmoins, aux Etats Unis, 15 à 20% des cancers colorectaux pourraient être liés à la consommation de tabac. Diverses analyses (Botteri E, 2008, Liang PS 2009, Tsoi KK 2009) ont ainsi montré que la consommation quotidienne de cigarette (38% d'augmentation du risque), la durée de la consommation (20% d'augmentation du risque), et l'âge de début (4% d'augmentation du risque) interviennent dans le développement du cancer colorectal.

La fumée de cigarette contient de nombreux carcinogènes susceptibles d'atteindre les muqueuses colorectales, soit *via* la circulation sanguine, soit directement par ingestion (Chan AT, 2011). De manière intéressante, il a été montré que l'incidence du cancer colorectal est plus importante chez les anciens fumeurs que chez les personnes consommant toujours du tabac. Ceci pourrait être en lien avec des événements précoces et irréversibles tels que des dommages d'ordre génétique (Botteri E, 2008).

### **c) Cancer du sein**

Le cancer du sein est le cancer le plus communément diagnostiqué chez les femmes aux Etats-Unis (DeSantis, C, 2011). Traditionnellement, le cancer du sein n'est pas un cancer associé à la consommation de tabac. Cependant, de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont permis de démontrer l'implication de l'exposition à la fumée de cigarette dans la carcinogénèse du cancer du sein (Reynolds P, 2013). De nombreuses études ont montré que l'association entre le tabagisme et le risque de développer un cancer du sein dépend du nombre d'années de consommation, de la quantité consommée et de l'âge de début de consommation (Passarelli MN, 2004).

### **d) Métastases des cancers.**

La fumée de cigarette contient de nombreux composés dont des « hydrocarbures aromatiques polycycliques » (PAHs) (Yoshino I, 2007), de la nicotine (Dasgupta P, 2009), et des espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Zhang H, 2012) susceptibles d'induire une transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) *via* différentes voies de signalisation. L'EMT est un mécanisme qui permet aux cellules épithéliales d'acquérir un phénotype de cellules mésenchymateuses et des capacités de migration augmentées. Un processus d'EMT contribue à la transformation maligne dans différentes formes de cancer, pour lesquels cette EMT est associée à un phénotype invasif et métastatique (Singh A, 2010). Les effets de la fumée de cigarette sur l'EMT ne sont pas limités aux cancers pulmonaires et peuvent concerner d'autres formes de cancer telles que le cancer du sein (Murin S, 2001), de l'œsophage (Abrams JA, 2008), de l'oropharynx (McBride SM, 2012) et de la prostate (Moreira DM 2014). En effet, le tabagisme est associé à un stade de la maladie plus avancé au moment de la prostatectomie (Moreira DM 2014).

### **e) Rôle du tabagisme sur la réponse immunitaire anti-tumorale.**

Le système immunitaire joue un rôle important dans l'élimination des cellules cancéreuses, dans le contrôle de la croissance tumorale et dans la formation des métastases. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>,  $\gamma\delta$  et des cellules NK (Natural Killer) et NKT (lymphocyte natural killer T) peuvent reconnaître et éliminer les nouvelles cellules transformées. Des données suggèrent que la fumée de cigarette compromet la surveillance antitumorale (Sopori M, 2002). Des données

ont ainsi montré que la surveillance antitumorale médiée par les cellules NKT est inhibée par l'exposition à la fumée de cigarette (Lu LM, 2008).

## II. Exposition à la fumée de cigarette : un stress oxydant cellulaire ?

### A. Constituants de la fumée de cigarette.

La fumée de cigarette contient plus de 45000 composés chimiques qui peuvent être des carcinogènes (benzopyrènes), des toxines (monoxyde de carbone et nicotine), des particules réactives (ions métalliques) ou des oxydants. Le contenu et la concentration des différents composés chimiques sont très variables d'une marque de cigarette à une autre. La fumée de cigarette génère énormément de composés à la fois dans les compartiments extracellulaires et dans la cellule, qui peuvent se présenter sous forme de particules, de composés solubles dans l'eau, ou de gaz. Les principaux composants de la fumée de cigarette à l'origine des effets délétères de la fumée de cigarette incluent la nicotine, les goudrons, l'ammoniaque, le monoxyde de carbone, le dioxyde de carbone, le formaldéhyde, l'acroléine, l'acétone, les benzopyrènes, l'hydroxyquinone, les oxydes nitriques et le cadmium (Rennars SI, 2004).

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 (Clunes LA, 2008).

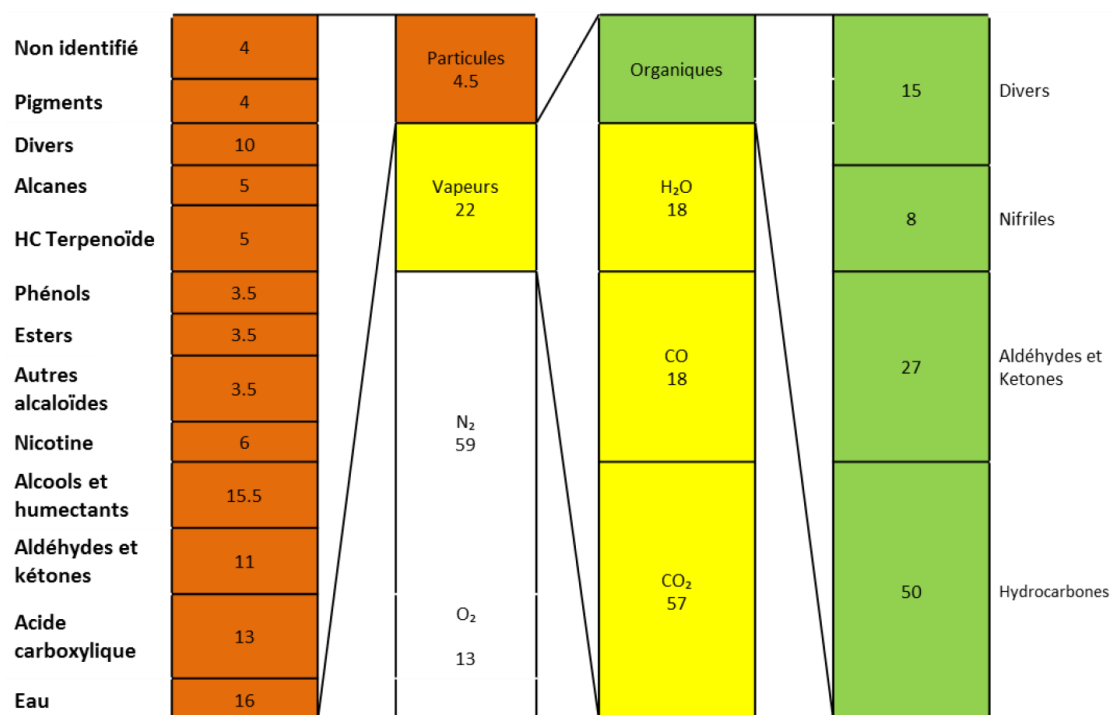


Fig.I 2. Composition de la fumée de cigarette totale.

L'analyse chimique de la composition de la fumée de cigarette se fait au moyen d'une machine à fumer et d'un filtre en verre, ou filtre de Cambridge, permettant la séparation de ses deux phases. Ici, nous nous intéresserons plus particulièrement à ses composants solubles. Dans la majeure partie des modèles d'exposition *in vitro* de cellules au condensat de fumée de cigarette, dont ce présent travail, les constituants solubles de la fumée sont récupérés à l'aide d'un système de « bullage » et ainsi mélangés au milieu de culture.

Parmi les composants solubles de la fumée de cigarette, dans la phase gazeuse on retrouve du monoxyde de carbone, des oxydes d'azote et des aldéhydes. Un des principaux composants solubles de la phase particulaire est la nicotine (Smith CJ, 2001). On retrouve également des sucres, qui, sous l'effet de la combustion de la cigarette, vont caraméliser et donner naissance à des acides organiques et des aldéhydes dont le formaldéhyde, l'acétaldéhyde et l'acroléine (Talhout R, 2006). La phase gazeuse et la phase particulaire de la fumée de cigarette réunies contiennent différentes espèces de radicaux libres et des composés non radicalaires. Le nombre total des ces espèces chimiques présentes dans la fumée de cigarette se chiffre en milliards (Hoffman D, 1997) et inclue des ERO et des espèces réactives de l'azote (ERN), dont l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), des radicaux hydroxyles, et du monoxyde d'azote (Hasnis E, 2007). Ces espèces réactives peuvent causer des dommages cellulaires dans les tissus pulmonaires, mais aussi entrer dans la circulation sanguine (Csiszar A, 2009). Néanmoins, étant donné la faible durée de vie des espèces réactives il est peu probable que ceux-ci aient un impact au niveau systémique. En revanche, les phases gazeuses et particulaires de la fumée de cigarette contiennent des substances stables telles que des aldéhydes saturés et insaturés susceptibles d'augmenter la production d'ERO/ERN intracellulaire lors d'une exposition à la fumée de cigarette dans des tissus éloignés des poumons (Rom O, 2012).

Les ERO et les ERN sont en effet produites physiologiquement par le métabolisme cellulaire. Ces ERO et ERN sont produites par des enzymes, dont l'activité est particulièrement contrôlée, telles que les différentes isoformes de la NADPH oxydase (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxydase), les complexes enzymatiques mitochondriaux de la chaîne respiratoire (ERO) et la NO synthase (ERN). Ces espèces réactives ont un rôle double, à la fois délétère et bénéfique. L'excès de radicaux libres, ou stress oxydant (ERO) et/ou stress nitrosatif (ERN), cause des dommages biologiques (altération des constituants lipidiques, protéiques ou de l'ADN cellulaire). Toutefois, les ERO/ERN à des doses faibles ou modérées physiologiques interviennent de manière bénéfique dans la défense contre des agents infectieux, la régulation de nombreuses voies de signalisation, la modulation de l'expression de gènes et la réponse mitogénique (revue dans Beaudeux JL, 2006 & Valko M, 2007). La régulation des taux

intracellulaires d'ERO/ERN se fait par les systèmes anti-oxydants constitutifs de la cellule et l'induction de gènes dont le produit possède une activité anti-oxydante, ou la répression de gènes dont le produit exprime une activité pro-oxydante. Plusieurs facteurs de transcription fondamentaux pour la cellule sont les cibles des ERO/ERN. Le stress oxydant est un acteur majeur de la sénescence des lymphocytes T (Holbrook NJ, 2002, Benz CC, 2008, Griffiths HR, 2011). Les voies des MAPkinases (Mitogen-activated protein kinases) sont les principales voies de signalisation impliquées dans la réponse au stress oxydant des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (revue dans Goronzy JJ, 2012). L'induction de la sénescence des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> est associée à la modulation des voies des MAPkinases p38 et ERK1/2 (Ye J, 2012). Dans ce travail, nous nous sommes donc focalisé sur les ERO.

Les principales ERO, les sources d'ERO, les ERO présentes dans le condensat de fumée de cigarette (CFC) et la réponse anti-oxydante seront décrits dans les prochains points de ce chapitre.

## **B. Les espèces réactives de l'oxygène**

Les ERO sont des espèces chimiques, issues de l'oxygène moléculaire, telles que des radicaux libres, ou des dérivés non radicalaires : des peroxydes et des ions oxygénés. Elles représentent la plus importante classe d'espèces réactives générées dans les organismes vivants en raison de l'importance du métabolisme aérobie.

Les ERO ont longtemps été considérées comme des dérivés nocifs du métabolisme cellulaire susceptibles de causer des dommages aux macromolécules telles que l'ADN, les protéines et les lipides. Les ERO sont également connues en tant qu'armes utilisées par les phagocytes contre certains pathogènes. Mais les ERO sont également présentes à concentration très faible dans la cellule et sont des produits essentiels au fonctionnement cellulaire, jouant un rôle important en tant que seconds messagers dans de nombreuses voies de signalisation, et seraient impliquées dans la prolifération cellulaire et la mort cellulaire programmée.

La chaîne respiratoire mitochondriale et les réactions enzymatiques impliquant les NADPH oxydases, la xanthine oxydase, les cyclooxygénases et les lipooxygénases sont des sources endogènes de production d'ERO. Des stimuli exogènes tels que les rayonnements ultra-violet (UV), certains polluants environnementaux et molécules chimiques peuvent également produire des ERO. Le taux d'ERO est maintenu en quantité nécessaire pour le bon fonctionnement cellulaire par des systèmes d'élimination des ERO qui empêchent l'excès

d'oxydation lié à un taux trop élevé. Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre en faveur de la production d'ERO qui conduit à une oxydation accrue des composants cellulaires essentiels. Il est observé lorsque la production des ERO dépasse les capacités de défense anti-oxydante de la cellule. Le déséquilibre pro/antioxydant peut être d'origine exogène, ou d'origine endogène lors de dysfonctionnements de certaines sources de production ou des systèmes d'élimination des ERO.

Les ERO regroupent un ensemble de dérivés radicalaires de l'oxygène, mais également des composés non radicalaires (hydroperoxydes, ROOH et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Les formes radicalaires de l'oxygène sont des intermédiaires de la transition O<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O. Ces différentes formes d'ERO ne sont pas indépendantes les unes des autres et agissent en cascade avec des degrés de réactivité différents.

#### a) **Les espèces radicalaires de l'oxygène.**

Comme tout radical libre, les espèces radicalaires de l'oxygène sont des espèces chimiques possédant un électron célibataire leur conférant une réactivité importante vis-à-vis d'autres molécules. Compte tenu de leur grande réactivité, leur durée de vie est très courte.

Parmi les espèces radicalaires de l'oxygène formées chez les êtres vivants, on peut distinguer des radicaux primaires comme l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), et des radicaux secondaires comme les radicaux peroxy (ROO<sup>•</sup>) et les radicaux alkoxy (RO<sup>•</sup>), issus de la réaction de radicaux primaires avec d'autres molécules (R : lipides, protéines, glucides) (Table I1).

| Nom                  | Formule chimique             |
|----------------------|------------------------------|
| Anion superoxyde     | O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> |
| Radical hydroxyle    | •OH                          |
| Radical perhydroxyle | HO <sub>2</sub> <sup>•</sup> |
| Radical peroxy       | ROO <sup>•</sup>             |
| Radical alkoxy       | RO <sup>•</sup>              |

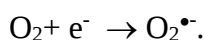
**Table I 1. Espèces radicalaires de l'oxygène.**

### **(1) L'anion superoxyde.**

La réduction de l'oxygène en eau nécessite 4 e<sup>-</sup> en provenance de la chaîne respiratoire mitochondriale.



Cependant, dans 2 à 5% des cas, en présence de métaux, de molécules organiques ou d'enzymes (oxydases ou complexes de la chaîne respiratoire), l'oxygène fait l'objet d'une réduction incomplète. Chaque molécule d'oxygène sera réduite par un seul électron, donnant naissance à un anion superoxyde O<sub>2</sub><sup>•-</sup>.



Les anions superoxydes ne sont pas très réactifs et ont une demi-vie courte, mais ils constituent des radicaux précurseurs et ils exercent leurs effets par la formation d'espèces radicalaires beaucoup plus réactives. Ils peuvent provenir de plusieurs sources présentes dans toutes les cellules présentant un métabolisme aérobie.

### **(2) Le radical perhydroxyle.**

Le radical perhydroxyle HO<sub>2</sub><sup>•</sup> est la forme protonée de l'anion superoxyde O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, et ces deux espèces radicalaires de l'oxygène sont en équilibre constant (Hool LC, 2006). Le radical perhydroxyle HO<sub>2</sub><sup>•</sup> est beaucoup plus oxydant que l'anion superoxyde O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Sous cette forme l'anion superoxyde peut être transformé soit spontanément, soit par la superoxyde dismutase en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### **(3) Le radical hydroxyle.**

Le radical hydroxyle <sup>•</sup>OH peut être formé par la scission homolytique de la liaison –O-O- de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ou par la réaction de Fenton (cf infra), ou encore par la réaction entre le monoxyde d'azote NO<sup>•</sup>, produit par certaines cellules, et O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Ce radical a une durée de vie de l'ordre de 10<sup>-11</sup> secondes et une très grande réactivité dans les milieux biologiques. Il est capable d'oxyder pratiquement toutes les macromolécules telles que les protéines, les acides nucléiques, les acides gras poly-insaturés et les glucides, mais n'agit que dans l'environnement de son site de production (Gutteridge JM, 1994, Bergendi L, 1999).

#### (4) Les radicaux alkoxy et peroxy.

Les radicaux alkoxy  $RO\cdot$  et peroxy  $ROO\cdot$  sont en toute fin de chaîne de production des ERO. Ils ont le résultat de l'action oxydante de  $\cdot OH$  sur les chaînes d'acides gras poly-insaturés. Ces deux ERO sont à l'origine des processus radicalaires en chaîne et en particulier de la peroxydation lipidique (Gutteridge JM, 1994, Bergendi L, 1999).

#### b) Les dérivés non radicalaires de l'oxygène.

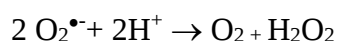
Les dérivés non radicalaires de l'oxygène ne possèdent pas d'électron célibataire mais sont des précurseurs des radicaux libres, et sont aussi réactifs que ceux-ci, notamment en raison de leur capacité à réagir avec des métaux (Table I2).

| Nom                  | Formule chimique |
|----------------------|------------------|
| Peroxyde d'hydrogène | $H_2O_2$         |
| Acide hypochloreux   | $HOCl$           |
| Ozone                | $O_3$            |
| Oxygène singulet     | $^1O_2$          |
| peroxynitrite        | $ONOO^-$         |

Table I 2. *Espèces non radicalaires de l'oxygène.*

#### (1) Le peroxyde d'hydrogène.

En présence de protons, l'anion superoxyde subit généralement une réaction spontanée de dismutation aboutissant à la formation d' $H_2O_2$  et d'oxygène :



En présence de métaux de transition sous forme réduite, l' $H_2O_2$  subit une réaction d'oxydo-réduction pour générer le radical hydroxyl  $\cdot OH$  (réaction de Fenton), un radical libre, comme dit précédemment, très réactif.



Contrairement à l' $\text{O}_2^{\bullet-}$ , l' $\text{H}_2\text{O}_2$  est relativement stable (Winterbourn CC, 2013). Il est également stable à l'extérieur de la cellule en raison d'un environnement plus réducteur (Rutault K, 1999). Pendant de nombreuses années il était admis que l' $\text{H}_2\text{O}_2$  pouvait librement traverser les membranes cellulaires de manière passive. Néanmoins des études ont montré qu'il existe des gradients d' $\text{H}_2\text{O}_2$  de part et d'autre des membranes plasmiques des cellules eucaryotes (Antunes F, 2000, Makino N, 2004). De plus, compte tenu de sa polarité plus importante que l'eau, l' $\text{H}_2\text{O}_2$  diffuse difficilement dans la bicouche lipidique hydrophobe. Des données expérimentales ont permis de montrer que la diffusion cellulaire de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  est facilitée par des aquaporines et fait l'objet d'une régulation active (revue dans Bienert GP, 2014). L' $\text{H}_2\text{O}_2$  a donc la possibilité de diffuser d'une cellule à l'autre et peut exercer un effet paracrine (van Reyk DM, 2001, Matsue H, 2003). Son impact dans la cellule est important car, il réagit de préférence avec des protéines comportant des résidus cystéines (SH). Ces résidus sont parmi les mieux conservés et les plus abondants dans les protéines.

## **(2) L'oxygène singulet.**

Sous l'influence de rayonnements ultraviolets (sources exogènes), la liaison entre les molécules d'oxygène est fragilisée et une inversion des spins 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, les lipides non saturés et les acides aminés. Au niveau de l'ADN, son interaction avec la guanine génère le 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodGuo), qui est utilisé comme marqueur de stress oxydant (Ravanat JL, 2000).

### **C. Les principales sources d'espèces réactives de l'oxygène**

#### **a) Sources exogènes d'ERO.**

Les sources exogènes d'ERO sont surtout d'origine physique et chimique (radiations X ou gamma, radiolyse de l'eau, UV 315-400nm, réactions photochimiques,...). De par notre mode de vie urbain et certaines habitudes, nous sommes exposés à divers composés présents dans l'air que nous respirons. Les gaz d'échappement des véhicules, les gaz rejetés par les usines ou les résidus de combustion du tabac inhalés par les fumeurs sont des sources exogènes d'ERO.

### ***b) Sources endogènes d'ERO.***

De nombreuses sources d'ERO ont été identifiées dans la cellule, dont l'importance varie selon les tissus. Ces ERO peuvent être de l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, qui peut être dismuté en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peut ensuite être clivé et générer le radical hydroxyl •OH par la réaction de Fenton :



Les ERO produites dans la cellule peuvent être produites par de nombreux systèmes enzymatiques. Dans la littérature scientifique, il est communément admis que la mitochondrie est la principale source d'ERO dans les cellules eucaryotes. Les résultats expérimentaux ne permettent pas de prouver cette idée reçue, mais vont tout de même dans le sens d'une contribution significative de la mitochondrie dans la production d'ERO (revue dans Brown GC, 2011). Cette production d'ERO mitochondriale a notamment des rôles physiologiques importants dans la signalisation cellulaire des lymphocytes T (Sena LA, 2013). L'autre site cellulaire majoritaire de production d'ERO est la membrane plasmique.

### **(1) La chaîne respiratoire mitochondriale.**

Les mitochondries sont des organites, de l'ordre du micron, présents dans toutes les cellules eucaryotes à l'exception des érythrocytes. Les mitochondries contribuent à l'essentiel de la production d'énergie cellulaire par la production d'ATP (adénosine-5'-triphosphate) au cours du cycle de Krebs, de la phosphorylation oxydative et de la β-oxydation des acides gras. Les mitochondries sont également impliquées dans le maintien de l'homéostasie calcique, le métabolisme des acides aminés, de l'hème et du fer, le transport des métabolites et du fer, la signalisation cellulaire et la régulation de la mort cellulaire programmée. Les mitochondries sont également la principale source d'ERO dans la cellule au repos (Kowaltowski AJ, 2009, Zorov DB, 2014).

Elles sont constituées d'une membrane interne et d'une membrane externe qui délimitent deux compartiments : un espace intermembranaire et la matrice mitochondriale. C'est dans cette membrane interne que l'on retrouve l'ATP synthase et les complexes de la chaîne respiratoire. La production d'énergie sous forme d'ATP se fait à partir du catabolisme des nutriments. Ceux-ci sont pris en charge par le cycle de Krebs, voie métabolique particulière qui libère très peu

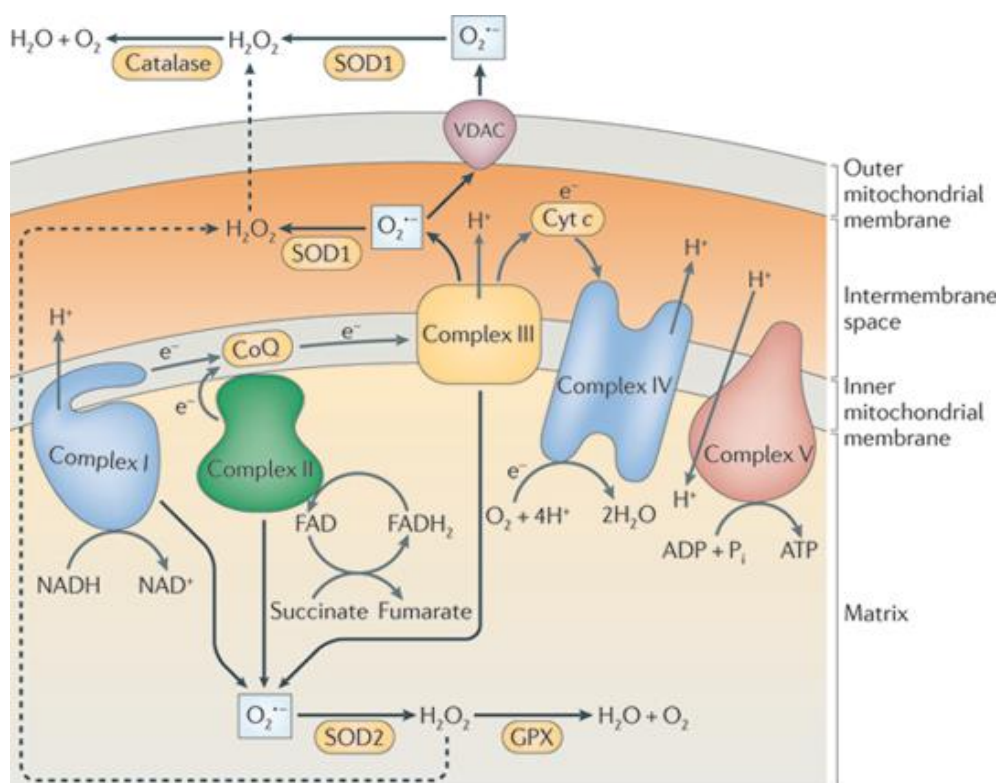
d'énergie sous forme de liaison phosphate mais permet l'oxydation complète de l'acétyl CoA. L'énergie ainsi libérée est transformée sous forme d'équivalents réduits,  $\text{NADH,H}^+$  et  $\text{FADH}_2$ , substrats donneurs d'électrons à la chaîne respiratoire mitochondriale. Les électrons sont transférés tout le long de la chaîne respiratoire au cours des réactions d'oxydoréduction jusqu'à l'accepteur final, l'oxygène et sa réduction en eau. Les formes réduites,  $\text{NADH,H}^+$  et  $\text{FADH}_2$ , cèdent respectivement leurs électrons au complexe I et II de la chaîne respiratoire mitochondriale

La chaîne respiratoire est donc un ensemble de complexes enzymatiques qui permet la réoxydation des co-enzymes  $\text{NADH,H}^+$  et  $\text{FADH}_2$  (Fig. I3). Chaque complexe contient plusieurs transporteurs d'électrons agissant séquentiellement:

- le complexe I : NADH-coenzyme Q oxydo-réductase, catalyse le transfert de  $2e^-$  du co-facteur NADH au coenzyme Q. Cette oxydation a lieu sur la face matricielle de la membrane par la NADH-déshydrogénase. Le transfert d' $e^-$  est accompagné par la translocation de  $4\text{H}^+$  de la membrane interne vers l'espace intermembranaire contribuant ainsi à la création d'un gradient de protons (Sazanov LA, 2007). L'activité du complexe I peut être inhibée par la roténone.
- le complexe II : succinate-coenzyme Q oxydo-réductase, oxyde le succinate en fumarate et permet le transfert de deux électrons au complexe III par l'intermédiaire de l'oxydation du  $\text{FADH}_2$  et d'un pool de coenzyme Q. Ce complexe fait à la fois partie de la chaîne respiratoire et du cycle de Krebs (Brière JJ, 2005) et son activité peut être inhibée par le malonate.
- le complexe III : coenzyme Q -cytochrome c oxydo-réductase, accepte les équivalents réduits produits par les complexes I et II, catalyse le transfert de  $2e^-$  du coenzyme Q, qui joue un rôle de transporteur mobile d' $e^-$ , au cytochrome c, un autre transporteur mobile situé dans l'espace intermembranaire, et permet d'atteindre le dernier complexe de la chaîne respiratoire. Ce transfert d' $e^-$  est associé au transport de  $4\text{H}^+$  de la membrane interne vers l'espace intermembranaire (Mitchell P, 1975). L'activité de ce complexe peut être inhibée par l'antimycine A.

- le complexe IV : cytochrome c oxydase : les  $e^-$  cédés par le cytochrome c entrent dans ce complexe enzymatique dans lequel s'effectue la liaison des  $e^-$  à l'oxygène et sa réduction en eau. Ce complexe permet également le transfert de 2  $H^+$  de la membrane interne vers l'espace intermembranaire (Wikström M, 2007). Contrairement aux transferts d' $e^-$  ayant lieu aux complexes I et III, le transfert des  $e^-$  dans le complexe IV est irréversible.

Parallèlement à la réoxydation des co-enzymes  $NADH, H^+$  et  $FADH_2$ , des protons sont pompés de la matrice vers l'espace intermembranaire par les complexes I, III et IV, créant ainsi un gradient électrochimique. Le complexe V ou  $F_0/F_1$ -ATP synthase est un complexe enzymatique multimérique fonctionnant comme une pompe ionique inversée, qui synthétise l'adénosine triphosphate (ATP) à partir du gradient électrochimique de protons entretenu par la chaîne respiratoire et d'adénosine diphosphate (ADP), ainsi que de phosphate inorganique ( $P_i$ ). Ce gradient va fournir à la  $F_0/F_1$ -ATP synthase l'énergie nécessaire à la phosphorylation de l'ADP en ATP. En effet, les protons retournent dans la matrice mitochondriale *via* l'ATP synthase. Ainsi, la synthèse d'ATP est directement couplée à l'oxydation des co-enzymes par la chaîne respiratoire mitochondriale.



**Fig.I 3. Production d'ERO mitochondriales (West AP, 2011).**

La chaîne de transport des électrons utilise des réactions d'oxydo-réduction consécutives dans les complexes mitochondriaux I à IV pour produire un gradient de protons qui permettra au final de produire de l'ATP par l'ATP synthase (complexe V). Certains électrons peuvent occasionnellement échapper à cette chaîne de transport et sont alors transférés sur un atome d' $O_2$  pour former un  $O_2^{\bullet-}$ . Les anions superoxydes sont produits ainsi par les complexes I, II et III directement à l'intérieur de la matrice mitochondriale, et par le complexe III dans l'espace intermembranaire. Les  $O_2^{\bullet-}$  produits à la fois dans la matrice et dans l'espace intermembranaire peuvent être converti en  $H_2O_2$  capable de diffuser au travers des membranes mitochondriales et de rejoindre le cytoplasme. Les  $O_2^{\bullet-}$  produits par le complexe III dans l'espace intermembranaire ont la possibilité de quitter la mitochondrie en passant par un canal à anion voltage-dépendant (VDAC) et d'être convertis en  $H_2O_2$  dans le cytoplasme.

La chaîne respiratoire est une source permanente d'ERO. En conditions physiologiques, lors du transport des électrons par la chaîne respiratoire, un certain nombre d'entre eux est perdu. Les  $e^-$  perdus vont produire une réduction partielle de l'oxygène aboutissant à la formation d'anion superoxyde. Des études ont montré qu'environ 1 à 3% de l'oxygène utilisé par la mitochondrie sont incomplètement réduits et vont être à l'origine de la production d'ERO (Boveris A, 1973).

Néanmoins, ces estimations ont été réalisées à partir de mesure *in vitro*, sur des mitochondries isolées et en conditions non physiologiques. La production d'ERO *in vivo* pourrait être plus faible et la réduction partielle ne concernerait que 0,4 à 0,8% de l'oxygène utilisé par la mitochondrie (Hansford RG, 1997).

L'anion superoxyde peut être généré par la mitochondrie aux complexes I, II et III de la chaîne respiratoire (Turrens JF, 2003). Les complexes I et II peuvent produire des  $O_2^{\cdot -}$  qui vont être émis dans la matrice mitochondriale où ils pourront être convertis en  $H_2O_2$  par la superoxyde dismutase 2 (SOD2). Cet  $H_2O_2$  peut diffuser librement au travers des membranes mitochondriales dans l'espace mitochondrial intermembranaire et dans le cytoplasme. Le complexe III émet lui des  $O_2^{\cdot -}$  à la fois dans la matrice mitochondriale et dans l'espace intermembranaire. Les  $O_2^{\cdot -}$  présents dans l'espace intermembranaire peuvent rejoindre le cytoplasme grâce à des canaux à anion voltage dépendant (VDAC) sans conversion préalable en  $H_2O_2$ , et seront convertis en  $H_2O_2$  dans le cytoplasme (Han D, 2003, Muller FL, 2004, Murphy MP, 2009).

Dans le complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale, une fuite d' $e^-$  a lieu au cours du cycle du coenzyme Q. La durée de vie du radical ubisemiquinone (Co-HQ $^{\cdot}$ ) est un élément déterminant. Si la chaîne électronique mitochondriale tourne lentement, la durée de vie de cet intermédiaire augmente et favorise la production d' $O_2^{\cdot -}$ . Au contraire, une vitesse plus élevée de transfert des  $e^-$  diminue la durée de vie du Co-HQ $^{\cdot}$ , la probabilité de fuite d' $e^-$ , et la production d'ERO (Chen Q, 2003). L'afflux de calcium, dépendant de la stimulation anti-CD3, d'abord dans le cytoplasme, puis dans la mitochondrie *via* des canaux calciques (CRAC/ Calcium release-activated channels) est un élément essentiel pour la production d'ERO dans les lymphocytes T. Des enzymes du cycle de Krebs sont régulées par le calcium (pyruvate dehydrogenase, isocitrate dehydrogenase,  $\alpha$ -cétoglutarate dehydrogenase). L'afflux de calcium dans la cellule pourrait donc être à l'origine d'une augmentation d'activité du cycle de Krebs, d'une augmentation de la production d'équivalents réduits, NADH,  $H^+$  et  $FADH_2$ , et d'une augmentation du flux d' $e^-$  dans la chaîne de transport mitochondriale.

A cette notion de vitesse des  $e^-$  dans la chaîne de transport mitochondriale, il faut ajouter celle d'un découplage partiel (mild uncoupling). Comme décrit précédemment, des protons sont pompés activement de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire, et ce phénomène est couplé au passage des  $e^-$  dans la chaîne de transport mitochondriale. Ceci a pour effet de polariser la membrane mitochondriale interne et de créer un potentiel de membrane ( $\Delta\Psi_m$ ). Un  $\Delta\Psi_m$  élevé est associé à une production d'ERO plus importante et pourrait être lié à une vitesse de transport des  $e^-$  plus faible. Cette idée est confirmée par l'observation que la

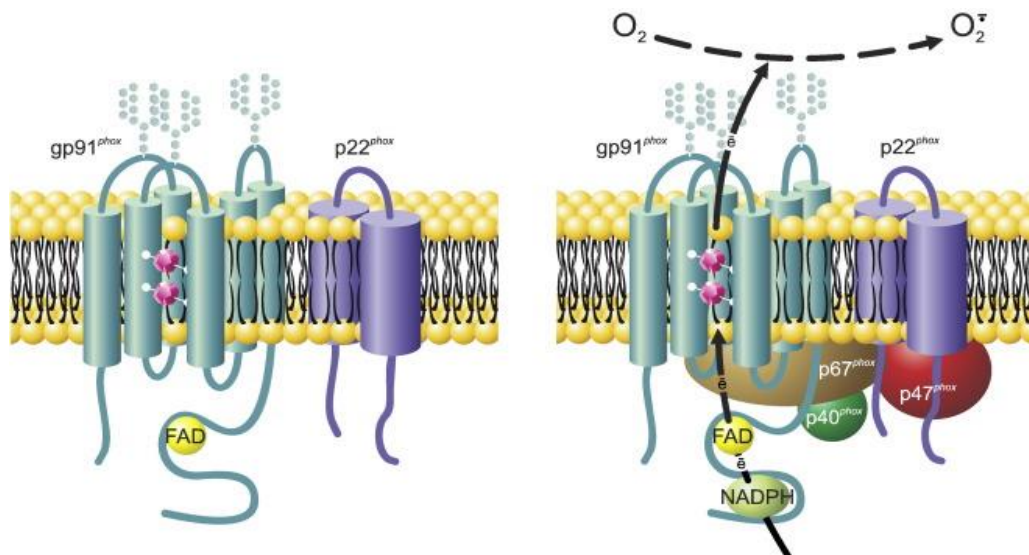
production d'ERO mitochondriales est diminuée quand le  $\Delta\Psi_m$  est dissipé, soit à l'aide d'agents découpleurs chimiques tels que le 2,4 dinitrophénol (DNP), le CCCP (carbonylcyanide-m-chlorophénylhydrazone) ou le FCCP (p-trifluoromethoxy-carbonylcyanide-phenyl hydrazine), soit l'expression de protéines découplantes mitochondriales ou UCP (Li, X, 2013, Sy Cho, 2014).

## (2) NADPH oxydases.

La nicotinamide adenine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase, ou «Neutrophil oxydase» (NOX), est un complexe multimérique, présent de manière constitutionnelle dans toutes les cellules. La NADPH oxydase a initialement été décrite 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.

Le complexe multimérique NOX2 est composé d'un hétérodimère appelé flavocytochrome *b558* associé à la membrane, composé de la sous-unité catalytique gp91<sup>phox</sup>/NOX2 et de la protéine régulatrice p22<sup>phox</sup>, et de 3 sous-unités régulatrices localisées dans le cytosol et formant un complexe (p40<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>/Ncf1, et p67<sup>phox</sup>), avec une stœchiométrie 1 :1 :1 (Lapouge K, 2002), ainsi que de la protéine GTPase Rac2. La NADPH oxydase ne devient fonctionnelle, lors d'une activation, qu'après assemblage du complexe cytosolique p47<sup>phox</sup>/NCF1-p67<sup>phox</sup>- 40<sup>phox</sup>, au cytochrome *b558* membranaire (Groemping Y, 2005) (Fig I4).

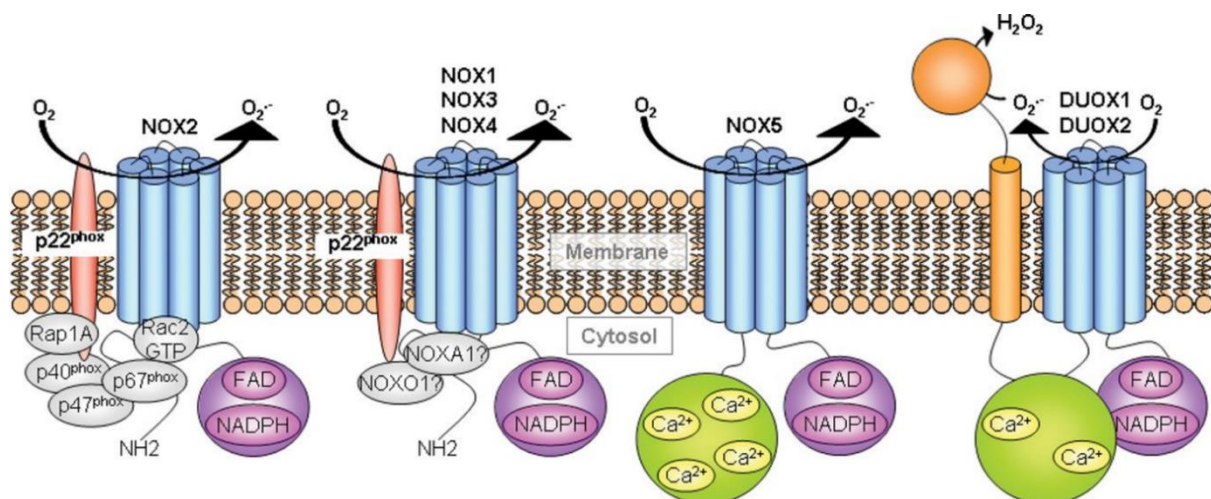
Ce complexe catalyse la réduction mono-électronique de l'oxygène en utilisant le NADPH comme donneur d'électrons, pour produire 2 molécules d'anions superoxyde O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (Segal BH, 2000). La sous-unité catalytique gp91<sup>phox</sup>/NOX2 contient une molécule de FAD (Flavine Adénine Dinucléotide) et deux groupements héminiques. Deux électrons en provenance du NADPH sont transférés à la molécule de FAD, suivie d'une seconde étape *via* les groupements héminiques pour finalement réduire l'oxygène et former 2 molécules d'anion superoxyde O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (Cross AR, 2004). De plus, la NOX 2 agit comme une transférase permettant le transport d'un électron donné par une molécule de NADPH cytoplasmique au travers d'une membrane plasmique vers l'oxygène comme accepteur d'électron (Nauseef WM, 2014). L'anion superoxyde produit est ensuite rapidement dismuté en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



**Fig.I 4. Structure de la NADPH oxydase (Nauseef WM, 2014).**

*A gauche, état non stimulé, à droite structure du complexe assemblé après stimulation.*

Plusieurs homologues de gp91<sup>phox</sup>/NOX2 ont été identifiés dans différents tissus : NOX1, NOX3, NOX4, NOX5 et les *dual oxidases* 1 et 2 (DUOX1 et 2) (Griendling KK, 2000) (Fig I5). NOX2 illustre de nombreuses caractéristiques structurales et fonctionnelles des différentes protéines NOX. Néanmoins, des différences importantes existent dans la composition, la distribution sub-cellulaire, et l'activité des oxydases non-phagocytaires selon leur localisation tissulaire et leur fonction.



**Fig.I 5. Les différentes NADPH oxydase (Guichard C, 2008).**

Tous les membres de la famille NOX possèdent 6 hélices transmembranaires dont quatre résidus histidine permettent la liaison avec les groupements hémiques, et une région C-terminale cytosolique contenant les sites de fixation hautement conservés du FAD et du

NADPH. Les NOX1, 3 et 4 ont des tailles quasiment identiques (564, 568 et 578 acides aminés respectivement). NOX1 et NOX3 présentent 60% d'homologie de séquence avec NOX2 tandis que NOX4 n'en possède que 39%. NOX 5 et les DUOX diffèrent beaucoup plus de NOX2. NOX 5 possède une extension N-terminale supplémentaire contenant quatre motifs EF-hand permettant chacun la fixation d'une molécule de calcium. La production d'ERO par NOX5 est donc calcium dépendante, *via* ces motifs EF-hand (Banfi B, 2004).

Les DUOX 1 et 2 possèdent également une extension N-terminale, contenant deux motifs de liaison du calcium EF-hand suivis d'une hélice transmembranaire supplémentaire et d'un domaine peroxydase-homologue sur la face externe de la membrane plasmique. Les DUOX sont non seulement capables de générer des  $O_2^{\cdot-}$ , mais aussi de les transformer directement en  $H_2O_2$  à l'aide de leur propre domaine peroxydase (Ameziane-El-Hassani R, 2005). Récemment, il a de plus été montré que, pour être activées, les DUOX nécessitent la présence d'une autre protéine appelée DUOXA dont la fonction serait d'activer la fonction oxydase des DUOX et de stabiliser le complexe (Morand S, 2009).

### **(3) L'auto-oxydation de petites molécules.**

L'auto-oxydation de molécules comme la dopamine, l'adrénaline, les flavines et les hydroquinones peut représenter une source d'ERO cellulaire. Le produit direct de ces auto-oxydations est souvent l'anion superoxyde. Néanmoins, l'impact de ces auto-oxydations sur la régulation du stress oxydant est encore mal ou peu défini.

### **(4) Peroxysome**

Le peroxysome est un organite ubiquitaire contenant de nombreuses enzymes impliquées dans différentes réactions métaboliques, dont la  $\beta$  oxydation des acides gras, certaines générant du  $H_2O_2$ , c'est donc une importante source de production de cette ERO. L' $H_2O_2$  produit est utilisé comme substrat par la catalase peroxysomale dans des réactions de peroxydation d'autres substrats (phénols, acide formique, formaldéhyde et alcools). Ces réactions sont particulièrement importantes dans les processus de détoxification hépatiques et rénaux. Seule une faible quantité d' $H_2O_2$  produite au niveau du peroxysome pourrait échapper à la catalase.

## **(5) Le cytochrome P-450 et le réticulum endoplasmique**

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<sub>2</sub>, un atome d'oxygène étant transféré au substrat (RH) et l'autre étant réduit. Au cours de la réaction de mono-oxygénation de l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> et de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peuvent être produites.

Le réticulum endoplasmique a, entre autres fonctions, de détoxifier l'organisme des drogues liposolubles et d'autres produits métaboliques toxiques, et contient donc des enzymes impliquées dans la catalyse de ces réactions. La plus connue de ces enzymes est le cytochrome P450 impliqué dans le métabolisme de composés lipophiles d'origine endogène ou exogène, et qui oxyde les acides gras insaturés et les xénobiotiques. Ces réactions conduisent à la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Zangar RC, 2004), lequel pourrait avoir un rôle dans la régulation des fonctions du réticulum telles que la sécrétion de protéines.

## **(6) Xanthine oxydase**

La xanthine oxydase est une enzyme soluble impliquée dans le catabolisme de la purine qui génère des ERO en réduisant l'hypoxanthine en xanthine, et la xanthine en acide urique impliquant la réduction d'O<sub>2</sub> et la production d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (Harrison R, 2002).

## **(7) Lipooxygénase, cyclooxygénases et acide arachidonique**

L'hydrolyse des phospholipides par la phospholipase A2 produit de l'acide arachidonique. Ce dernier est un substrat des lipooxygénases (LOX) et des cyclooxygénases (COX) pour, respectivement, la synthèse des leucotriènes et des prostaglandines dont la prostaglandine E2 (PGE2). Cette synthèse met en jeu une série d'oxydations qui implique la libération d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (Kuehl FA, 1980, Cai H, 2000, Kim C, 2008).

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 ; 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).

#### **(8) Les aminoacides oxydases : l'IL4I1.**

Les L-acides aminés oxydases (LAAO) ou amine oxydases sont impliquées dans la dégradation des acides aminés via l'oxydation directe de l'acide aminé. Ces enzymes catalysent la désamination oxydative des amines primaires aliphatiques et aromatiques issus des acides aminés, ainsi que des amines secondaires et tertiaires. Ces différentes amines oxydases présentent une spécificité particulière pour un acide aminé substrat. Ces enzymes utilisent des coenzymes, la Flavine Mono Nucléotide (FMN) ou la FAD. A l'issue de la désamination, la forme réduite des cofacteurs FMNH<sub>2</sub> ou FADH<sub>2</sub>, est réoxydée par l'O<sub>2</sub> pour former de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Mondovi B, 1984, Gaweska H, 2011). Les LAAO sont généralement localisées au niveau de la membrane externe des mitochondries (Upadhyay AK, 2008, Gaweska H, 2011). Elles sont impliquées dans des mécanismes cellulaires tels que la prolifération, la différenciation cellulaire et l'apoptose (Vindis C, 2000, Toninello A, 2004, Polgar E, 2007).

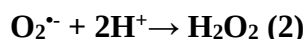
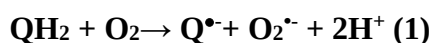
Les LAAO sont classées en trois groupes :

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

Parmi les MOA, des travaux récents issus de l'équipe de F. Annunziato et S. Romagnani (Santarlaschi V, 2012), de l'équipe de F. Castellano et V. Molinier-Frenkel (Cousin C, 2015) et de la nôtre (Kerbrat S, 2015) ont montré que l'IL4I1 (Interleukin-4-induced gene 1), dont l'activité consiste dans la déamination de la L-phénylalanine en phénylpyruvate et produit de l'ammonium et du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, est exprimée par les lymphocytes Th17. Originellement décrite dans les cellules myéloïdes (Boulland ML, 2007), l'expression de l'IL4I1 dans les Th17 réduit leur capacité de prolifération contribuant à la faible proportion des Th17 dans les sites inflammatoires (Santarlaschi V, 2012).

#### **D. Espèces réactives de l'oxygène présentes dans le condensat de fumée de cigarette.**

Parmi les composants solubles de la fumée de cigarette, on retrouve la nicotine, l'acroléine, des dérivés nitrés et oxygénés, le benzène et le nickel (Hoffman D, 1997). La phase gazeuse contient d'importantes quantités de radicaux libres. En particulier, l'oxydation du NO par l'O<sub>2</sub> conduit à la formation de NO<sub>2</sub> qui est capable de réagir avec d'autres composants de la fumée de cigarette tels que les composés isoprènes, et est à l'origine de l'apparition de radicaux libres «entrés sur le carbone » (R<sup>•</sup>) qui pourront à leur tour réagir avec l'O<sub>2</sub> pour former des radicaux peroxy (ROO<sup>•</sup>). La phase particulaire présente de fortes concentrations de radicaux (10<sup>17</sup> spins/g) dont une semiquinone (Q<sup>•</sup>), dérivée du dihydrobenzène présent dans cette phase, en équilibre avec des quinones (Q) et des hydroquinones (QH<sub>2</sub>). Ce système des quinones est soluble en milieu aqueux et est retrouvé dans les préparations de condensat de fumée de cigarette. Ce système réduit l'oxygène en O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (équation 1) qui ensuite est dismuté en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (équation 2). De plus, en présence de métaux, *via* une réaction de Fenton, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peut générer de l'OH<sup>•</sup> (équation 3) (Pryor WA, 1993, Wooten JB, 2006, Valavanidis A, 2009).



Le système de « bullage » reproduit les conditions rencontrées lors de la consommation d'une cigarette. Lorsqu'un fumeur inhale une bouffée de cigarette, la fumée se retrouve dans un environnement particulièrement humide et se dépose dans le fluide recouvrant les cellules épithéliales du tractus respiratoire. Des ERO et des ERN sont retrouvées dans les solutions aqueuses de CFC, mais ne se forment pas toutes dans la cigarette en combustion. Au contraire, elles se forment en solution aqueuse ou dans les fluides physiologiques à la suite de réaction entre les différents composés de la fumée de cigarette entre eux, ou avec l'oxygène en solution (Wooten JB, 2006).

#### a) *L'anion superoxyde.*

L'utilisation de 5-(Diethoxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline N-oxide (DEPMPO, 2), un « piège » à radicaux de l'oxygène a permis d'identifier la présence d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> dans le condensat de fumée de cigarette (Frejaville C, 1995).

#### **b) Le peroxyde d'hydrogène.**

Des méthodes polarographiques ont montré que le CFC réalisé par « bullage » dans une solution phosphate (PBS/phosphate buffer saline) présente des niveaux élevés d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Au bout de 4h les concentrations passe de 37 à 123µM. Cependant, la technique fluorimétrique AMplex Red a montré que les niveaux d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> du CFC réalisé par « bullage » dans du PBS sont négligeables par rapport à ceux issus de la fumée totale (Yan F, 2005).

#### **c) Le peroxynitrite**

Le NO et le ONOO<sup>-</sup> 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'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> qui réagit avec le NO pour former le ONOO<sup>-</sup> (Pryor WA, 1983 & 1984, Church DF, 1985, Halliwell B, 1999). Ce composé est identifié comme un marqueur du stress oxydant (ou nitrosant) 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), les guanines ou les lipides (Müller T, 1994, 1997 & 1998).

#### **d) Autres composants du CFC susceptibles d'induire une production d'ERO.**

Certains composés réactifs de la cigarette (ERO ou acroléine) peuvent interagir avec les composants cellulaires pour former des espèces comme le 4-hydroxynonenal ou des ERO intracellulaires. En effet, des composants comme l'acroléine sont capables d'induire une production d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> via la xanthine oxydase ou la NADPH oxydase des cellules endothéliales (Czernin J, 1995, Jaimes EA, 2004, Orosz Z, 2007). L'acroléine et le ONOO<sup>-</sup> contenus dans le CFC induisent également un stress oxydant au niveau de la mitochondrie des cellules épithéliales pulmonaires (Anbarasi K, 2005, Jia L, 2007, Slebos DJ, 2007, Pacher P, 2007, Hara H, 2013). Ces composés activent de plus des voies de signalisations sensibles aux concentrations élevées d'ERO, comme la voie des MAPK (Pacher P, 2007) et la voie NFκB (nuclear factor-κB) (Csiszar A, 2005, Orosz Z, 2007). De plus, l'activation de la voie NFκB des PBMCs totaux issus de fumeurs est plus importante que 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).

### **E. Réponse anti-oxydante.**

Afin de limiter la cytotoxicité et faire face à la grande réactivité des ERO, les cellules ont développé des systèmes antioxydants afin d'éliminer ces ERO. Ces systèmes ont pour stratégie d'empêcher les interactions entre espèces chimiques, de transformer les oxydants en espèces moins toxiques, ou de prévenir ou réparer les lésions oxydatives provoquées. Ils peuvent être non-enzymatiques et enzymatiques, et en conditions homéostatiques, suffisent à prévenir le stress oxydant qui pourrait résulter du métabolisme aérobie.

Des anomalies des systèmes antioxydants ont été décrites chez les fumeurs et chez les patients atteints de BPCO, aussi nous avons voulu présenter ici les principaux systèmes antioxydants.

#### **a) *Systèmes antioxydants non enzymatiques : le glutathion (GSH).***

Les antioxydants non enzymatiques réagissent directement avec les ERO pour les réduire ou en limiter les effets toxiques. Ces molécules sont produites par l'organisme et/ou apportées par l'alimentation.

Le glutathion est un tripeptide composé d'acide glutamique, de cystéine et de glycine. Il est impliqué dans de nombreux processus cellulaires, comme la synthèse d'ADN, et la prévention de l'oxydation des groupements thiols grâce à son pouvoir réducteur. En effet, la cystéine qu'il contient présente un groupement thiol (R-SH) à l'origine de ses propriétés antioxydantes. Le glutathion est ainsi le thiol majoritaire au niveau intra-cellulaire ( $10^{-4}$  à  $10^{-3}$ M), où il est présent essentiellement sous forme réduite (GSH), la forme oxydée (GSSG) étant présente à une concentration au moins 10 fois plus faible (Dröge W, 2002).

Le glutathion, sous sa forme réduite, est capable de réagir in vitro avec les radicaux hydroxyles, alkoxyles, peroxydes, des radicaux centrés sur le carbone (C•) mais aussi l'acide hypochloreux, le peroxyne, l'oxygène singulet,

La glutathion 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).

Environ 20% des stocks intracellulaires de glutathion sont localisés dans la mitochondrie. Le glutathion joue donc un rôle essentiel dans la protection contre les ERO produites constamment par la chaîne mitochondriale de transport des électrons (Meister A, 1995).

Le glutathion participe à l'activité des glutathion peroxydases impliquées dans la détoxification du  $H_2O_2$  et d'autres hydroperoxydes. La réduction des hydroperoxydes est couplée à l'oxydation d'un substrat réducteur. La régénération de la fonction thiol GSH à partir de la forme oxydée GSSG se fait grâce à la glutathion réductase (GR) et nécessite un apport de NADPH,  $H^+$  par la voie des pentoses phosphates (Delattre J, 2005).

Des travaux récents ont montré qu'un environnement réducteur, riche en GSH, favorise la prolifération des lymphocytes T. De plus, les lymphocytes T effecteurs sont incapables de produire leur propre GSH intracellulaire et dépendent des cellules dendritiques qui leur fournissent les cystéines. Les Tregs interfèrent dans ce mécanisme en inhibant les cellules dendritiques et ce mécanisme constituerait l'un des mécanismes immunosuppresseurs des cellules Treg. (Yan Z, 2010).

Le glutathion pourrait également jouer un rôle dans la sénescence cellulaire. Des études sur des fibroblastes humains montrent qu'une baisse des niveaux intracellulaires de glutathion a un rôle significatif dans la progression du vieillissement cellulaire dans la peau chez l'homme (Alaluf F, 2000).

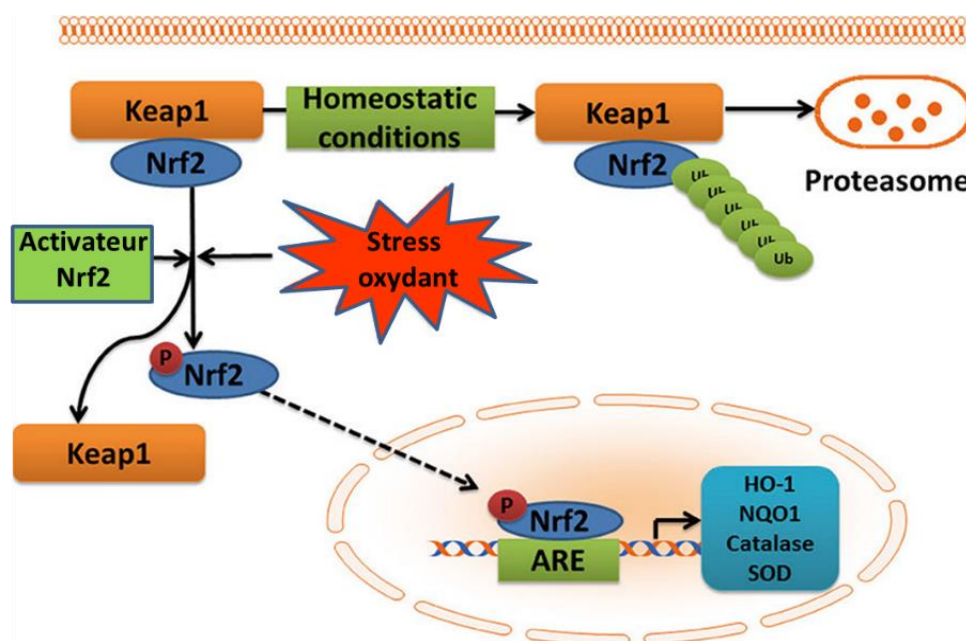
A ce système antioxydant non enzymatique peuvent être ajoutés de nombreux autres composés à action antioxydante telles que l'acide urique, les vitamines A, E et C, les mélanines, la mélatonine, l'acide lipoïque, la bilirubine, l'albumine,...

#### ***b) Réponse anti-oxydante Nrf2 dépendante.***

Au niveau cellulaire, la voie Nrf2/Keap1 (Nuclear factor erythroid 2 [NF-E2]-related factor 2)/[Kelch-like ECH-associated protein 1]) a un rôle majeur dans le contrôle de la détoxification de xénobiotiques électrophiles, d'oxydants et de composés chimiques prooxydants. Le facteur de transcription Nrf2 est ubiquitaire et constitutivement actif, mais son activité est fortement augmentée par des inducteurs chimiques aux propriétés électrophiles. Le facteur de transcription Nrf2 est capable d'augmenter la capacité anti-oxydante de la cellule en régulant l'expression de différents gènes d'antioxydants et des enzymes dites « de phase II ».

L'activité de Nrf2 est majoritairement contrôlée *via* la régulation de la stabilité de cette protéine. Keap1 est une protéine cytoplasmique qui régule négativement l'activité de Nrf2 en induisant

sa dégradation par le protéasome 26S. L'inhibition du complexe ubiquitine ligase Cul3-Keap1 responsable de l'ubiquitination de Nrf2 conduisant à sa dégradation par le protéasome, permet de stabiliser Nrf2. Les nombreux résidus cystéines de Keap1 peuvent être oxydés par les ERO conduisant à un changement de conformation de la protéine mettant fin à la liaison entre Nrf2 et Keap1, et stabilisant Nrf2 (Taguchi K, 2011) ; ainsi, Keap1 constitue un véritable senseur de l'état redox de la cellule. Nrf2, échappant à la dégradation, peut s'accumuler et transloquer vers le noyau ; Nrf2 est ensuite capable de se lier aux séquences ARE (antioxidant response element) pour induire la transcription des gènes antioxydants et régulateurs de Nrf2 (Fig. I6).



**Fig.I 6. Représentation schématique de l'activation de la réponse antioxydante dépendante de Nrf2 par un stress oxydant (Chen J, 2014).**

L'activité de Nrf2 est également contrôlée par phosphorylation. Nrf2 peut être phosphorylé par PERK, une des kinases contrôlant la réponse de stress de surcharge du réticulum, ou UPR (Unfolded Protein Response), ce qui a pour effet d'inhiber la liaison entre Nrf2 et Keap1. L'activation de Nrf2 par le stress UPR aurait pour effet d'augmenter la synthèse de GSH (Cullinan SB, 2004). Nrf2 peut également être régulé *via* sa phosphorylation par d'autres kinases parmi lesquelles la glycogène synthase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), la tyrosine kinase p59Fyn, dont Nrf2 est le substrat direct (Jain AK, 2007), ainsi que par la protéine kinase C (PKC) (Huang HC, 2000).

L'utilisation de modèles murins déficients pour le gène codant pour Nrf2, et plusieurs études utilisant une approche génomique par puces à ADN, ont permis de montrer l'existence d'une

régulation de plusieurs gènes cibles par Nrf2. La nature de ces gènes confirme en particulier le rôle de Nrf2 dans la protection cellulaire contre les xénobiotiques, les stress environnementaux, le stress oxydant, et dans le contrôle de l'homéostasie redox intracellulaire. Les principaux gènes cibles de Nrf2 impliqués dans le contrôle de l'homéostasie redox intracellulaire peuvent être classés dans différentes sous-catégories listées dans le tableau suivant (Table I3).

| Enzymes anti-oxydantes régulées par Nrf2                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Enzymes de la balance redox intra-cellulaire</b><br><i>maintien du niveau intra-cellulaire de glutathion et réduction du niveau d'ERO</i>                   | Superoxyde Dismutase (SOD1, 2, 3)<br>Catalase,<br>Glutathion Peroxidase (GPx1, 2, 3,4)<br>Glutathion réductase (Gr)<br>Thiorédoxine (Trx)<br>Thiorédoxine Réductase (TrxR)<br>Peroxi-rédoxine (Prx1, 3)<br>Glutamate Cysteine Ligase (GCL) |
| <b>Enzymes de détoxification de phase II</b><br><i>catalysent les réactions de conjugaison pour augmenter la solubilité et donc l'élimination des toxiques</i> | Glutathion-S-Transférase (GSTs, GSTA, GSTT, GSTP, GSTM, GSTO)<br>UDP-glucoronyl transferase (UGT)<br>Epoxide hydrolase<br>NADP(H) : quinone oxydoréductase 1 (NQO1)                                                                        |
| <b>Enzymes et protéines cytoprotectives</b>                                                                                                                    | Heme oxygénase 1 (HO-1), Ferritine                                                                                                                                                                                                         |
| <b>Transporteurs</b><br><i>Contrôle de l'efflux des substances intra-cellulaires et des xénobiotiques</i>                                                      | Multidrug Resistance-associated Protein (MRP)                                                                                                                                                                                              |
| <b>Facteurs de transcription</b>                                                                                                                               | MAFF, MAFG et Nrf2 lui-même                                                                                                                                                                                                                |

**Table I 3. Les enzymes anti-oxydantes régulées par Nrf2.**

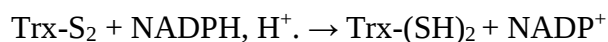
**c) Les systèmes antioxydants enzymatiques régulés par Nrf2.**

**(1) Le système thiorédoxine (Trx) / thiorédoxine réductase (TrxR).**

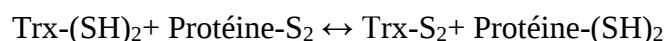
Le système Trx/TrxR est un système antioxydant majeur comprenant les thiorédoxines réductases (TrxR), les thiorédoxines (Trx) et le NADPH, H<sup>+</sup>. Les thiorédoxines sont des dithiols-disulfides (SH)<sub>2</sub> oxydoréductases. Les thiorédoxines réductases sont des flavoprotéines

membres de la famille des nucléotides-disulfides oxydoréductases comme les glutathion réductases.

Les thiorédoxines catalysent la réduction des disulfures en leurs formes sulfhydryles correspondantes. Les thiorédoxines oxydées (Trx-S<sub>2</sub>) présentent dans leur site actif un pont disulfure qui peut être réduit en deux groupements thiols par les thiorédoxines réductases en présence de NADPH, H<sup>+</sup>.



Les thiorédoxines réduites Trx(SH)<sub>2</sub> permettent ensuite la réduction de disulfures protéiques (Arnér ES, 2009).



Les thiorédoxines et les thiorédoxines réductases existent sous trois isoformes : Trx1 et TrxR1 sont cytoplasmiques, Trx2 et TrxR2 sont mitochondriales et Sp-Trx (Human spermatid-specific thioredoxin) et TRG (thiorédoxine/glutathion réductase) sont présentes dans les testicules chez les hommes. Contrairement aux TrxR1 et TrxR2, TRG est capable de réduire le glutathion oxydé, d'où sa dénomination (Arnér ES, 2009).

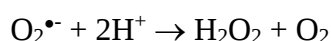
Les TrxR sont les seules protéines connues capables de réduire les Trx. Elles sont également capables de réduire directement certains autres disulfures protéiques possédant un ou plusieurs sites actifs dont le motif « Cys-Xxx-Xxx-Cys » est similaire à celui des thiorédoxines.

Le système Trx/TrxR joue un rôle essentiel dans le maintien du statut redox intracellulaire. En plus de leur rôle dans la réparation des dommages oxydants que peuvent subir couramment l'ensemble des protéines, les Trx permettent de maintenir l'activité enzymatique d'autres systèmes antioxydants. En effet, les Trx réduisent les peroxyrédoxines, et les glutathion peroxydases. Il existe donc une interaction entre les deux systèmes antioxydants les plus importants dans la cellule, le système du glutathion et le système Trx/TrxR (Casagrande S, 2000, Kang S, 2005).

Les travaux de Mougiakakos ont montré que dans les Tregs, le contenu en thiol est plus important que dans les populations T effectrices, ce qui les protège de la mort cellulaire induite par un stress oxydant (Mougiakakos D, 2009). Une étude complémentaire de la même équipe montre que les niveaux de Trx et de fait de la thiorédoxine réductase sont responsables de cette résistance à la mort cellulaire induite par le stress oxydant (Mougiakakos D, 2011).

## (2) Superoxyde dismutase (SOD).

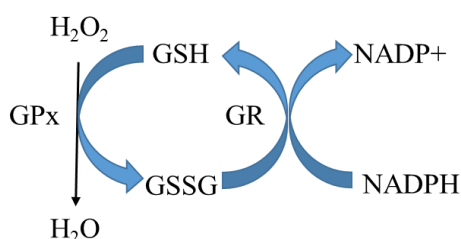
Les SOD catalysent la dismutation de l' $O_2^{\bullet-}$  en  $H_2O_2$  :



L' $H_2O_2$  produit pourra être pris en charge par des enzymes à activité peroxydase. Il existe trois isoformes de SOD chez les mammifères : une forme cytosolique et nucléaire associée aux ions cuivre et zinc (Cu/Zn-SOD ou SOD1), une forme mitochondriale associée au manganèse (Mn-SOD ou SOD2), et une forme extracellulaire (EC-SOD ou SOD3). La forme mitochondriale SOD2 permet la dismutation quasi instantanée de l' $O_2^{\bullet-}$  produit par la chaîne mitochondriale de transport des électrons en  $H_2O_2$ .

## (3) Glutathion peroxydase (GPx) et glutathion réductase (GR).

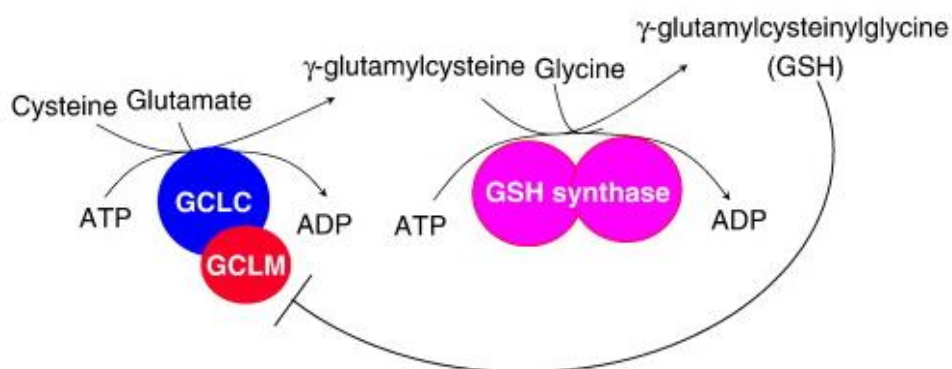
La glutathion peroxydase est une sélénoprotéine comprenant 5 isoformes (GPx 1, 2, 3, 4 et 6). La GPx fait partie d'un système complet jouant un rôle central dans l'élimination du  $H_2O_2$ , et également impliqué dans la prise en charge des lipides peroxydés (Arthur JR, 2000). La GPx permet la réduction de l' $H_2O_2$  par le GSH en  $H_2O$  et en disulfure de glutathion (GSSG). Ce GSSG produit est à son tour réduit par la GR, une flavoprotéine membranaire, qui utilise le NADPH comme donneur d'électron.



La GPx1 est ubiquitaire et présente dans le cytoplasme et la mitochondrie. Elle permet d'éliminer l' $H_2O_2$  et les hydroperoxydes lipidiques. La GPx2 est présente au niveau de l'épithélium intestinal alors que la GPx3 est une enzyme extracellulaire glycosylée retrouvée dans le plasma. La GPx4 est présente dans le cytoplasme, la mitochondrie et le noyau. Elle protège contre l'oxydation des phospholipides membranaires. La GPx6 est exprimée dans l'épithélium olfactif (Brigelius-Flohe R, 2013). Parmi ces GPx, la GPx2 semble être celle dont la régulation par Nrf2 est la plus importante (Singh A, 2006).

#### (4) Glutamylcystéine synthétase (GCL ou GCS).

La glutamylcystéine synthétase est composée de deux sous-unités, une unité catalytique, la GCLC, et une unité régulatrice, la GCLM (glutamate-cystéine ligase). Ce complexe enzymatique catalyse la synthèse du GSH par la formation de  $\gamma$ -glutamyl cystéine à partir du glutamate et de la cystéine en présence d'ATP. La glycine est ensuite ajoutée à ce dipeptide par la GSH synthase pour donner le GSH (Lu SC, 2013).



Une étude utilisant un activateur de Nrf2, le sulforaphane, montre une augmentation de l'expression protéique de GCLC et GCLM dans une lignée cellulaire de kératinocytes humains HaCat (MacLeod AK, 2009), et suggère que les différentes enzymes impliquées dans ce système sont régulées par Nrf2.

#### (5) Catalase.

La catalase est une hémoprotéine contenant quatre groupements hème. Elle est ubiquitaire et localisée principalement dans le peroxyosome, mais peut être retrouvée également dans le cytoplasme. Cette enzyme, catalyse l'élimination de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$  et  $\text{O}_2$  (Le Bras M, 2005).

#### (6) Peroxyrédoxines (Prx).

Les peroxyrédoxines, ou thiorédoxine peroxydases, sont au nombre de six chez les mammifères. Elles sont localisées dans le cytosol, les mitochondries, les peroxyosomes, ou sont associées au noyau et aux membranes. Elles exercent un rôle antioxydant en réduisant l' $\text{H}_2\text{O}_2$ , le peroxy-nitrite, de nombreux hydroperoxydes, mais également les alkyl hydroperoxydes, le peroxy-nitrite et les hydroperoxydes dérivés de phospholipides ou d'acides gras en utilisant la

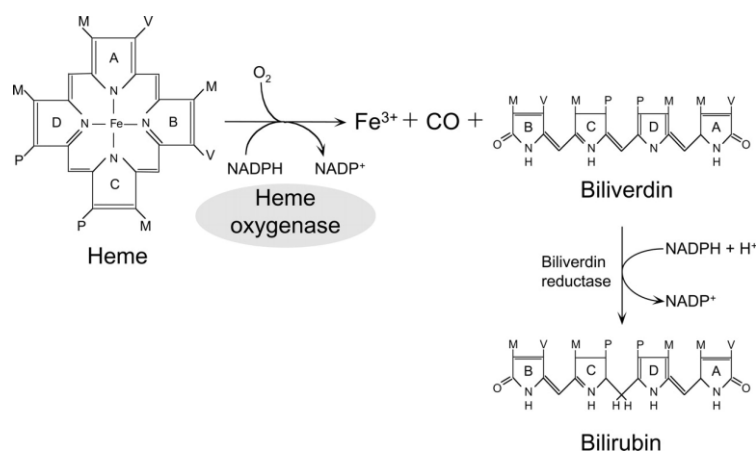
Trx comme réducteur (Rhee SG, 2005). Les peroxyrédoxines présentent une plus faible efficacité catalytique par rapport à la GPx et la catalase, néanmoins, elles pourraient jouer un rôle majeur dans l'élimination des hydroperoxydes du fait de leur représentation importante (0,1 à 0,8% des protéines solubles cellulaires) et de leur large distribution dans la cellule. De plus, les Prx joueraient un rôle important dans le développement pulmonaire et en réponse à un stress oxydant pulmonaire (Kim, HS, 2001).

#### (7) NADP(H) : quinone oxydoréductase 1 (NQO1).

La protéine NQO1 appartient à la famille des flavoprotéines homodimériques. C'est une enzyme ubiquitaire retrouvée dans le cytoplasme. Elle catalyse la réduction, par deux électrons, des quinones en hydroquinones (Siegel D, 2012).

#### (8) Hème oxygénase (HO).

L'hème oxygénase (HO) est une enzyme considérée comme un élément antioxydant qui catalyse la première étape d'une chaîne de réactions permettant la dégradation de l'hème. Cette première réaction produit plusieurs métabolites de façon équimolaire, du fer libre, du monoxyde de carbone (CO) et de la biliverdine qui est par la suite convertie en bilirubine par la biliverdine réductase. Ce sont les produits du métabolisme de l'HO, la bilirubine (Stocker R, 1987) et dans une moindre mesure le CO qui ont une action antioxydante.



L'HO est une protéine de choc thermique (Heat Shock Protein), formée de deux hélices qui encadrent une molécule d'hème. Les HO sont ancrées à la membrane du réticulum

endoplasmique par la partie C-terminale de l'enzyme, région dépourvue d'activité catalytique. Il existe trois isoformes de l'HO, notés HO-1, HO-2 et HO-3. Alors que HO-2 et HO-3 sont des isoformes constitutifs, l'expression et l'activité de HO-1 sont induites par différents stress dont le stress oxydant.

***d) Anomalies de la réponse anti-oxydante  
chez les fumeurs et les patients BPCO.***

L'expression de certains systèmes anti-oxydants est diminuée dans le poumon de patients emphysémateux. Ainsi, 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 asymptomatiques (Maestrelli P, 2003). De même, l'expression de Nrf2 est plus faible dans les tissus pulmonaires de patients emphysémateux par rapport au poumon de sujets fumeurs asymptomatiques ou non-fumeurs (Goven D, 2008). Enfin, l'analyse de prélèvements sanguins issus de fumeurs en comparaison à ceux issus de non-fumeurs montre une augmentation chez les fumeurs de la forme oxydée du glutathion GSSG (Muscat JE, 2004) et une diminution importante du GSH (Rahman I, 1995 & 2000, Morrison D).

Cependant, l'expression pulmonaire d'autres systèmes anti-oxydants semble augmentée au niveau des cloisons alvéolaires au cours de cette pathologie, dont l'hème-oxygénase 2 (Maestrelli P, 2003) ou la SOD2 (Harju T, 2004). Les niveaux des 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).

La résultante nette de la somme de la baisse d'expression de certains systèmes anti-oxydants et de la surexpression de certains autres en termes de capacité anti-oxydante pulmonaire au cours de la BPCO n'est pas connue. Cependant, le défaut de plusieurs systèmes anti-oxydants (HO-1, Nrf2) est associé à une aggravation de l'emphysème induit par exposition à la fumée de cigarette dans les modèles murins, suggérant un rôle important de la défaillance des systèmes anti-oxydants dans la genèse de la maladie (Rangasamy T, 2004).

### III. Les différentes populations lymphocytaires T CD4<sup>+</sup>.

#### A. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> dans la réponse immunitaire.

Chaque jour, l'organisme humain est confronté à diverses agressions : virus, bactéries, micro-organismes, particules présentes dans la pollution environnementale... Le système immunitaire est un système biologique complexe composé d'une multitude de cellules et de molécules composant un réseau dynamique capable de reconnaître spécifiquement et d'éliminer un grand nombre de micro-organismes étrangers ou de cellules exprimant des signaux de danger. Ce système est organisé en trois niveaux : des barrières anatomiques et physiologiques, l'immunité innée et l'immunité acquise.

Les barrières anatomiques et physiologiques sont une première protection contre les agressions extérieures et sont constituées par la peau et les muqueuses, le mucus et ses mécanismes de clairance, le pH stomacal et de la transpiration, les lysozymes bactériolytiques des larmes, la salive et autres sécrétions ou encore la barrière hémato-encéphalique.

L'immunité innée permet d'augmenter la protection offerte par les barrières anatomiques et physiologiques. Elle comporte des acteurs cellulaires, comme les phagocytes, mais aussi des composants antimicrobiens, et des molécules solubles comme les interférons et les facteurs du complément. Elle repose sur une reconnaissance du soi et du non-soi, ou de signaux de danger, est d'intervention immédiate, n'est pas spécifique d'antigène, et ne comporte pas de mémoire immunologique de l'agression. Cette reconnaissance du danger repose sur la capacité des cellules à reconnaître des groupes ou « patterns » de molécules retrouvées fréquemment sur certains pathogènes *via* des récepteurs appelés PRR (Pattern Recognition Receptors). Ces récepteurs permettent la reconnaissance de molécules aux motifs structuraux conservés, présents à la surface des microorganismes mais absents des cellules eucaryotes, les PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns). Parmi les PRR, la famille la plus connue est à ce jour celle des TLR. Les TLR sont exprimés par tous les leucocytes, mais aussi les cellules épithéliales et endothéliales. Les monocytes, macrophages et cellules dendritiques sont les cellules exprimant la plus large variété de TLR. La stimulation des TLR à la surface des cellules présentatrices d'antigène induit la synthèse de cytokines pro-inflammatoires, de chimiokines, d'interférons de type I, l'augmentation de l'expression de molécules de co-stimulation ainsi que la maturation des cellules présentatrices d'antigène permettant de faire le lien avec l'immunité acquise.

L'immunité innée n'est pas toujours suffisante pour éliminer un danger. C'est alors qu'intervient l'immunité acquise ou adaptative. Cette réponse immunitaire est hautement spécifique de l'antigène, et douée de mémoire. Elle nécessite la communication entre deux types de populations cellulaires, des cellules présentatrices de l'antigène, et les lymphocytes. Ces lymphocytes comprennent des lymphocytes B, impliqués dans la réponse immunitaire humorale, et des lymphocytes T, exprimant les molécules membranaires CD3, CD4<sup>+</sup> et/ou CD8<sup>+</sup>, impliqués dans la réponse immunitaire à médiation cellulaire. Chez l'homme adulte les organes lymphoïdes primaires, moelle osseuse et thymus, assurent la production de toutes les lignées cellulaires du système immunitaire dont les lymphocytes. La moelle osseuse rouge ou hématogène assure la production des différentes populations de lymphocytes et la maturation des lymphocytes B. Les précurseurs des cellules T quittent la moelle osseuse et rejoignent le thymus qui fournit un microenvironnement favorable à leur maturation. Les différents lymphocytes matures exprimant à leur surface des récepteurs capables de reconnaître spécifiquement l'antigène quittent ensuite les organes lymphoïdes primaires pour les circulations sanguine et lymphatique, et recirculent en permanence dans différents organes lymphoïdes secondaires dans l'attente d'une éventuelle rencontre avec un antigène.

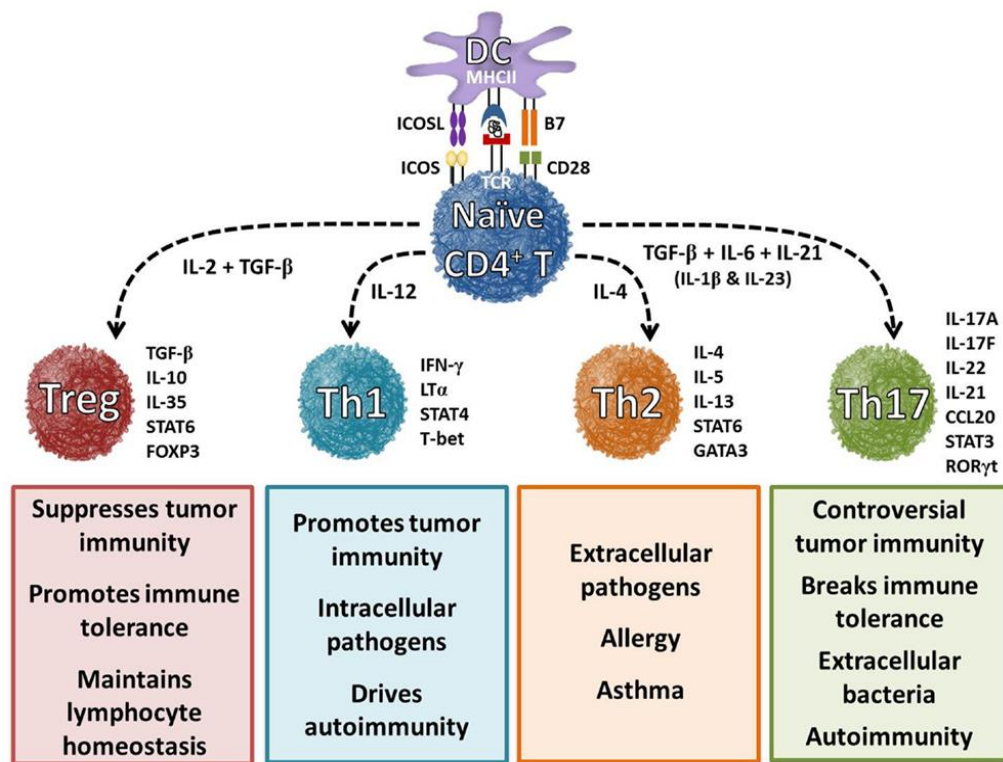
## **B. Les lymphocytes auxiliaires/ « helpers » (Th)**

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ont un rôle central dans l'organisation d'une réponse immunitaire dirigée spécifiquement contre un pathogène. Ils constituent une classe de lymphocytes T subdivisée en plusieurs sous-populations caractérisées par différents phénotypes. Ces sous-populations sont différemment impliquées dans la régulation des réponses immunes, principalement par la production de cytokines qui vont contribuer à stimuler ou inhiber d'autres types cellulaires de l'immunité innée ou adaptative, ou avoir un effet sur les cellules stromales, en particulier épithéliales, endothéliales ou fibroblastiques. Ces lymphocytes sont également impliqués dans la pathogénèse de nombreuses maladies auto-immunes ou allergiques.

Lors d'une activation du récepteur des cellules T (TCR) par un complexe peptide-CMH approprié présent à la surface d'une cellule présentatrice d'antigène (CPA), et en présence d'un environnement cytokinique approprié, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs peuvent se différencier en au moins 4 lignées de lymphocytes effecteurs : Th1, Th2, Th17 et en lymphocytes T régulateurs induits (iTregs). Ces différents types de lymphocytes CD4<sup>+</sup> Th se distinguent l'un de l'autre par des profils de production cytokinique et des fonctions immunologiques qui leur sont propres.

Bien que l'environnement cytokinique et la nature de la costimulation jouent un rôle important dans la différenciation fonctionnelle des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, la progression dans le cycle cellulaire est un signal intrinsèque majeur dans la détermination de l'expression des cytokines par les lymphocytes Th. En effet, la réplication de l'ADN permet un remodelage de la chromatine et la déméthylation des *loci* codant pour les cytokines spécifiques des différentes sous-populations de lymphocytes Th (Bird JJ, 1998, Gett AV, 1998, Gudmundsdottir H, 1999, Richter A, 1999). Cependant d'autres études ont suggéré que la réplication de l'ADN n'était pas associée à la spécification des cytokines Th (Laouar Y, 2000, Ben-Sasson SZ, 2001). Parallèlement, différentes voies de signalisation en aval du TCR, telles que NFAT (Nuclear factor of activated T-cells) et AP-1 (Activator protein 1) sont impliquées dans la détermination de l'expression des cytokines par les lymphocytes Th (Rooney JW, 1995). En particulier, le rôle de la voie de signalisation ERK1/2 dans la polarisation fonctionnelle des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> a été montré par plusieurs études dans lesquelles les auteurs montraient que la force et la durée de l'activité de ERK1/2 contrôle l'émergence d'un profil Th1/Th2 d'une part (Jorritsma PJ, 2003, Schade AE, 2004, Yamashita M, 2005, Yamane H, 2005, Goplen N, 2012, Chang CF, 2012), et Th17/Treg d'autre part (Luo X, 2008, Mor A, 2008, Tan AH, 2010, Liu H, 2013) (voir paragraphe IV.D). De plus, ERK1/2 est impliquée dans la régulation de la progression dans la phase G1 du cycle cellulaire (Meloche S, 2000).

Ensuite, la nature du milieu cytokinique au moment de la présentation antigénique joue un rôle important dans la différenciation des lymphocytes Th. Les protéines STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) sont les principales molécules impliquées dans la signalisation en réponse au milieu cytokinique, et contribuent à induire l'expression de facteurs de transcription spécifiques et déterminants dans l'établissement de chacune des sous-classes de lymphocytes Th. Cependant, l'induction des protéines STAT n'intervient que lors d'une activation du TCR.



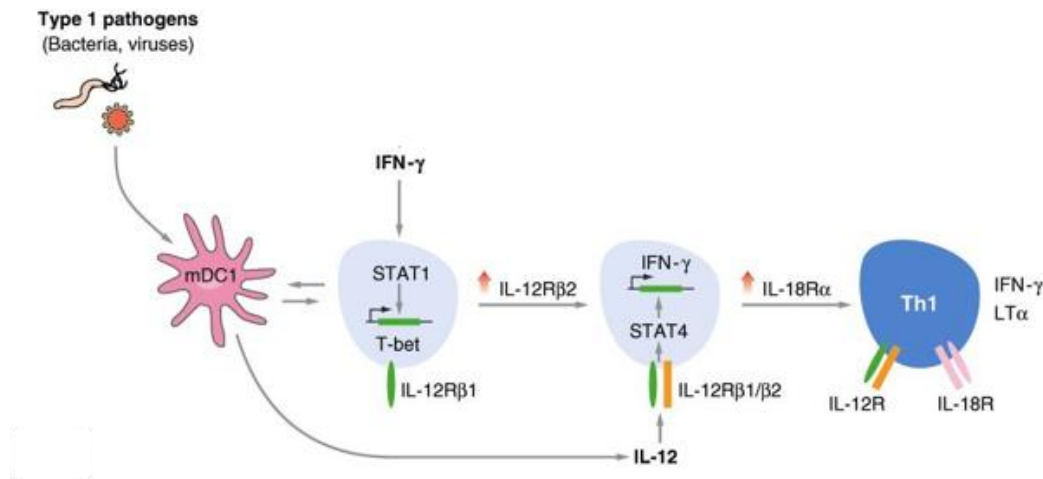
**Fig.1 7. Différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs vers les phénotypes fonctionnels Treg, Th1, Th2 et Th17 (Bailey SR, 2014).**

### 1. Les lymphocytes Th1.

Initialement, seuls deux phénotypes possibles de lymphocytes CD4<sup>+</sup> Th avaient été décrits ; les lymphocytes CD4<sup>+</sup> Th pouvaient être de type 1, ou Th1, ou de type 2 (Th2) (Del Prete 1991). Les premiers, les lymphocytes CD4<sup>+</sup> Th1 interviennent dans l'immunité à médiation cellulaire et l'inflammation dépendante des phagocytes. Ils sont majoritairement impliqués dans la défense de l'hôte contre les infections intracellulaires (agents microbiens et virus). Les lymphocytes Th1 sont caractérisés par leur sécrétion d'IFN-γ (Interféron-γ) et l'expression du facteur de transcription Tbet (T-box expressed in T cells, TBX21) (Lighvani AA, 2001) et du récepteur IL-18R1 (Zhu J, 2010).

Une stimulation du TCR par un antigène approprié, et la stimulation des voies de signalisation en aval des récepteurs à l'IFN-γ et l'IL-12 (p70), produits par les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques, sont essentiels pour la différenciation fonctionnelle des Th1. La stimulation du TCR induit une activation de la voie de signalisation ERK, et en réponse à une forte stimulation du TCR, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs expriment fortement EGR1, une cible transcriptionnelle de ERK impliquée dans l'expression de Tbet (Shin HJ, 2009). L'IFN-γ et

l'IL-12 (p70) induisent l'activation, respectivement, des facteurs de transcription STAT1 et STAT4 favorisant la transcription du facteur de transcription Tbet. Tbet stimule l'expression de l'IFN- $\gamma$  (Szabo SJ, 2000) et de la chaîne  $\beta 2$  du récepteur à l'IL-12 (IL-12R $\beta 2$ ) nécessaires à la différenciation des lymphocytes Th1. La stimulation du récepteur IL-12R $\beta 2$  augmente l'expression de l'IFN- $\gamma$  et de Tbet (Afkarian M, 2002, Biedermann T, 2004), induit l'expression de la chaîne IL-18R $\alpha$ , et inhibe l'expression de l'IL-4 et de l'IL-5 (Lighvani AA, 2001) (Fig. I8).



**Fig.I 8. Modèle de différenciation des lymphocytes Th1 (Weaver CT, 2007).**

Les lymphocytes CD4<sup>+</sup> Th1 représentent la principale source d'IFN- $\gamma$ , d'IL-2 et de TNF $\beta$  (LT $\alpha$ ). Ces cytokines spécifiquement produites par les Th1 induisent l'activation des macrophages et polymorphonucéaires (PMNs) impliqués dans la destruction des pathogènes bactériens intracellulaires, et celle des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques et des cellules NK responsables de la réponse immunitaire cellulaire contre les virus et les cellules tumorales (Romagnani S, 1997, Mosmann TR, 1996). Cette réponse immunitaire cellulaire peut être associée à une production d'anticorps par les lymphocytes B.

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Th1 sont également impliqués de façon délétère dans des maladies auto-immunes telles que la sclérose en plaque, le diabète de type 1 et l'arthrite rhumatoïde. Ils sont également impliqués dans les réactions d'hypersensibilité retardée (Mosmann TR, 1996).

## 2. Les lymphocytes Th2.

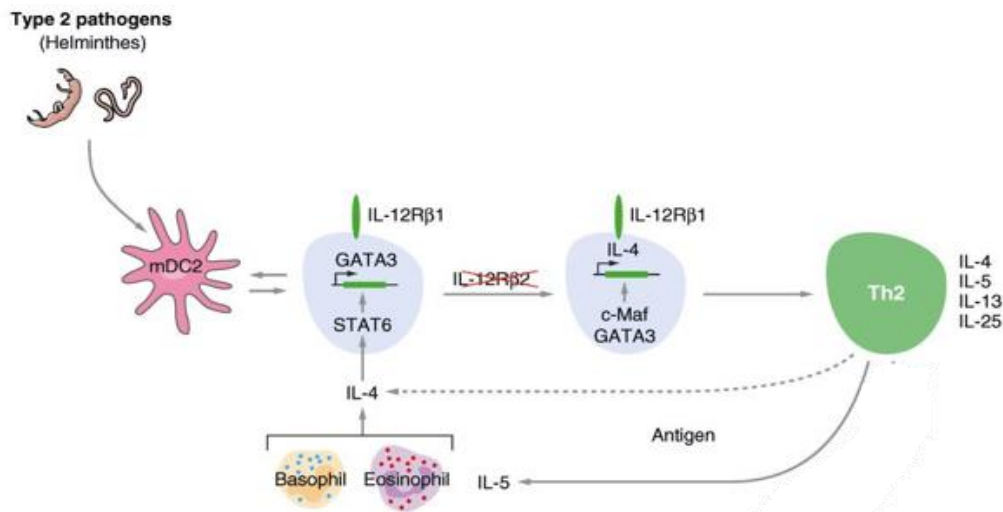
Les lymphocytes CD4<sup>+</sup> Th2 interviennent dans la réponse immunitaire médiée par les anticorps ou immunité adaptative humorale. Ils permettent de lutter contre les parasites, les bactéries

extra-cellulaires, les allergènes et les toxines. Les lymphocytes Th2 sont caractérisés par la production d'IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 et IL-13 et l'expression du facteur de transcription GATA3 (Zheng W, 1997, Agarwal S, 1998, Zhu J, 2004) et du récepteur IL-33R (Zhu J, 2010).

GATA3 joue également un rôle important à différentes étapes du développement des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mais est considéré comme le facteur de transcription « maître » des lymphocytes Th2 (Ho IC, 2009). La différenciation Th2 est impossible dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> périphériques n'exprimant pas GATA3 (Messi M, 2003, Pai SY, 2004). La stimulation du TCR induit une activation de la voie de signalisation ERK impliquée dans la différenciation fonctionnelle des lymphocytes Th2. L'IL-4 joue également un rôle essentiel. L'IL-4, *via* son récepteur, active la phosphorylation du facteur de transcription STAT6 et conduit à la transcription du facteur de transcription GATA3 (Nelms K, 1999, Zhu J, 2004 & 2010). L'activation de ERK induit une phosphorylation de STAT6 et celle-ci potentialise la signalisation en aval du récepteur de l'IL-4 (IL-4R $\alpha$ ) en présence de faibles doses d'IL-4 durant la phase initiale de la différenciation Th2 (Yamashita M, 1999) (Fig. I9). De plus, l'activation de la voie ERK en réponse à une stimulation du TCR favorise la stabilisation de GATA3 *via* l'inhibition de sa dégradation par le protéasome (Yamashita M, 2005). GATA3 stimule ensuite la production des cytokines IL-4, IL-5 et IL-13 (Zhang D.H, 1997). GATA3 est de plus capable d'induire sa propre expression une fois atteint un certain seuil d'expression (Ouyang W, 2000, Zhu J, 2010). D'autres cytokines dont l'IL-2, l'IL-7 et TSLP (Thymic stromal lymphopoietin), sont également impliquées dans la différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Th2. Les travaux de Zhu J *et al* ont montré que l'activation de STAT5 par l'IL-2 est essentielle pour la différenciation des Th2 *in vitro* et *in vivo* (Zhu J, 2003, Cote-Sierra J, 2004). GATA3 est capable de réprimer l'expression de STAT4, et l'IL-4 permet également de supprimer les réponses Th1 et Th17. 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). Plus récemment, il a été montré que l'IL-33, une cytokine de la famille de l'IL-1 produite par les cellules épithéliales, joue également un rôle dans la promotion des réponses de type Th2 en induisant la production d'IL-5 dans ces cellules (Murakami-Satsutani, 2014, N Endo Y, 2015).

L'activation de la voie de signalisation ERK en réponse à une stimulation du TCR est indispensable à la génération des Th2 à partir de cellules CD4<sup>+</sup> naïves. Néanmoins, l'intensité de cette activation est également fonctionnellement importante. Il a été montré qu'une stimulation du TCR par des peptides de faible affinité conduit à une activité faible de ERK, une augmentation de la production d'IL-4 et au final à une polarisation fonctionnelle de type Th2.

Au contraire, une stimulation forte de ERK par des peptides de forte affinité conduit à l'apparition de lymphocytes Th1 (Jorritsma PJ, 2003, Yamane H, 2012).



**Fig.I 9. Modèle de différenciation des lymphocytes Th2 (Weaver CT, 2007).**

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Th2 sont responsables d'une forte production d'anticorps et sont les médiateurs majeurs de la commutation de classe des immunoglobulines (Ig) E dans les lymphocytes B (Annunziato F, 2009), de l'activation et du recrutement sur le site inflammatoire des éosinophiles et basophiles en réponse à des allergènes ou des toxines, et permettent de lutter contre de nombreuses bactéries extra-cellulaires et des vers parasites (helminthes) (revue dans Zhu J, 2010). Les Th2 sont également responsables de l'inhibition de nombreuses fonctions des macrophages (Romagnani S, 1999). Les lymphocytes Th2 sont également impliqués dans la pathogénèse de l'asthme et d'autres maladies inflammatoires d'origine allergique.

### 3. Les lymphocytes Th17.

#### a) Découverte des Th17.

Pendant près de 20 ans la classification Th1/Th2 a permis d'expliquer de nombreux aspects de l'immunité et de l'inflammation. La découverte dans les années 2000 d'une nouvelle sous-population de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> au caractère pro-inflammatoire et produisant de l'IL-17 est le fait des travaux des équipes de Kastelein R. A. (Oppmann B, 2000) et Sedgwick J.D (Cua DJ, 2003). Ces travaux ont montré que l'IL-23, et non l'IL-12, est la principale responsable des désordres autoimmuns dans les modèles murins. L'IL-23 est une cytokine pro-inflammatoire

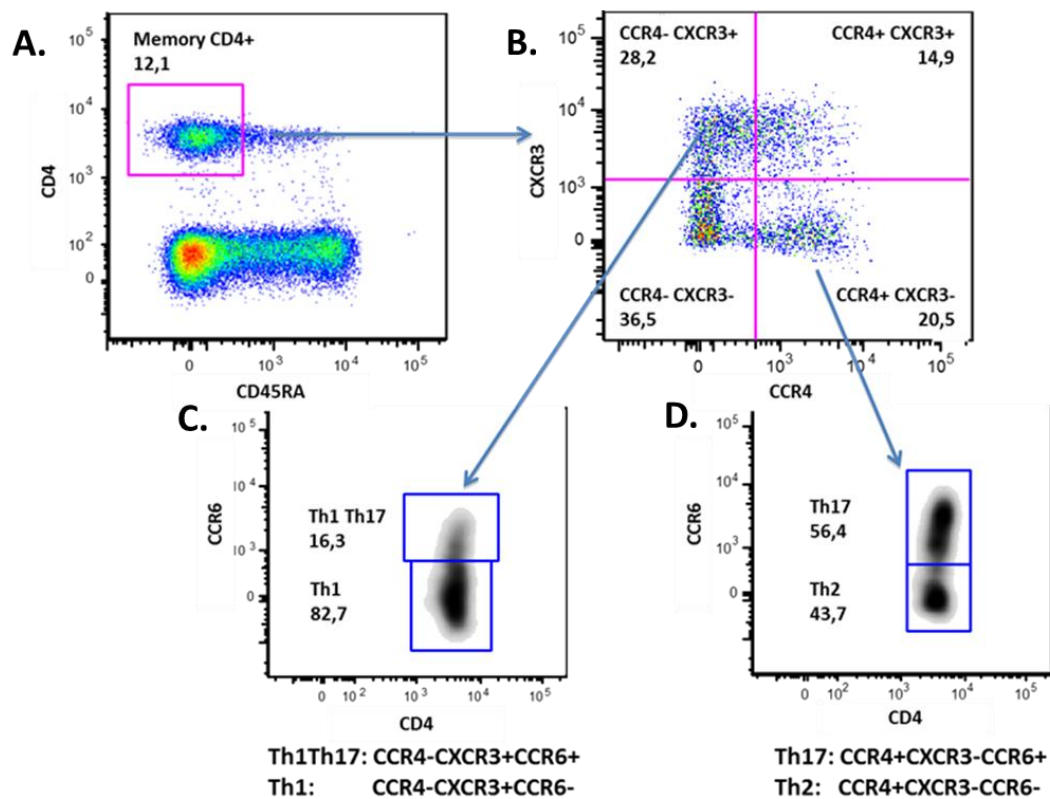
hétérodimérique composée d'une sous-unité p40, commune à l'IL-12, et d'une sous-unité p19 (Oppmann B, 2000, Kastelein R.A, 2007). Les souris déficientes en IL-23 (p19<sup>-/-</sup>) apparaissent alors comme totalement protégées contre l'encéphalomyélite autoimmune expérimentale (EAE), tandis que les souris déficientes en IL-12 (p35<sup>-/-</sup>) restent susceptibles de développer la maladie malgré un défaut dans le développement des cellules Th1 (Cua D.J, 2003, Murphy CA, 2003). Il a ensuite été démontré que l'IL-23 était impliquée dans la génération d'une population de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> T effecteurs produisant de l'IL-17A et que ces cellules étaient impliquées dans le développement de l'EAE médiée par l'IL-23 (Aggarwal S, 2003, Langrish CL, 2005). Néanmoins, il a alors été observé que l'IL-23 seule ne permettait pas de générer des cellules productrices d'IL-17A à partir de cellules naïves *in vitro*, et la notion de Th17 restait alors hypothétique. Les travaux de 3 équipes (Littman, Kuchroo et Stockinger) ont permis de décrire chez la souris les conditions de différenciation *in vitro* des cellules Th17 exprimant l'IL-17A à l'aide d'une combinaison d'IL-6, IL-21 et TGFβ1 (Betteli E, 2006, Ivanov I.I, 2006, Veldhoen M, 2006, Zhou L, 2007, Korn T, 2007).

#### **b) Phénotype et caractérisation des Th17.**

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Th17 ont récemment été décrits comme des cellules T effectrices caractérisés par la production d'IL-17A, et d'IL-17F, et exprimant le facteur de transcription RORγt chez la souris et RORC2 chez l'homme (retinoic acid-related orphan receptor T) (Ivanov II, 2006, Chen Z, 2007, Yang XO, 2008). Ces cellules sont également caractérisées par la sécrétion d'IL-21, IL-22 et CCL20 (MIP-3α/Macrophage Inflammatory Protein-3), et par l'expression du récepteur à l'IL-23 (IL-23R) (Harrington L, 2005, Park H, 2005, Yamaguchi T, Sakaguchi S, 2006). Les Th17 expriment également le récepteur à l'IL-1β (IL1R1) (Cosmi L, 2008, Kleinschek MA, 2009, LeeWW, 2010). Les cellules Th17 se comportent comme des cellules dont la durée de vie est importante, capables d'auto-renouvellement et de conserver la capacité à sécréter de l'IL-17A ; elles présentent des caractéristiques communes à des cellules souches (Muranski P, 2011) (expression de HIF1α, accumulation de β-catenin et expression de Tcf7) (Staal FJ, 2008, Kryczek I, 2011, Dang EV, 2011, Shi LZ, 2011).

Chez l'homme, les lymphocytes T mémoires (CD45RO<sup>+</sup>) du sang périphérique sécrétant de l'IL-17A en réponse à une stimulation *ex vivo* sont majoritairement compris dans une population exprimant le récepteur de chimiokine CCR6 (Acosta-Rodriguez EV, 2007, Annunziato F, 2007) (Fig.I10). Ce récepteur peut également être exprimé par les lymphocytes

B et certaines cellules dendritiques. Il a d'ailleurs été démontré que la production de cytokines caractéristiques des Th17 (IL-17A, IL-17F, IL-22) peut être rapidement induite dans les cellules T mémoires CCR6<sup>+</sup> lors d'une stimulation par de l'IL-2, de l'IL-7 ou de l'IL-15, alors que ce n'est pas le cas dans la population CCR6<sup>-</sup> (Wan Q, 2011). Néanmoins, la population de lymphocytes Th17 mémoires exprimant CCR6 représente une population hétérogène et peut exprimer d'autres récepteurs de chimiokines, suggérant des phénotypes hybrides avec d'autres sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Singh S.P, 2008, Acosta-Rodriguez EV, 2007, Beriou G.E, 2010). On distingue ainsi 2 sous-populations de lymphocytes Th17, une première exprimant CCR6 et le récepteur CCR4 productrice d'IL-17A mais pas d'IFN- $\gamma$ , une seconde exprimant en plus de CCR6 le récepteur CXCR3 qui sont des cellules capable de sécréter de l'IL-17A uniquement ou une combinaison d'IL-17A et d'IFN- $\gamma$  (Fig. I10) (Acosta-Rodriguez EV, 2007, Annunziato F, 2007, Duhon T, 2009, Trifari S, 2009). Le premier phénotype CCR6<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup> est commun aux Th17 et aux lymphocytes Th22, qui ont la particularité d'exprimer de l'IL-22 mais pas d'IL-17. Il est néanmoins possible de distinguer ces cellules sur le plan phénotypique car les Th22 expriment le marqueur CCR10 ce qui n'est pas le cas des Th17 (Duhon T, 2009, Trifari S, 2009, Eyerich S, 2009). L'expression de ces différents récepteurs de chimiokines permet un recrutement préférentiel de chaque sous-classe de lymphocytes Th17 dans différents tissus.



**Fig.I 10. Expression de CCR6 à la surface des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>.**

**(A.)** Au sein des lymphocytes T, différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mémoires (CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>) peuvent être identifiées en cytométrie en flux à l'aide de combinaisons d'anticorps dirigés contre des récepteurs de chémokines. **(B.)** La combinaison d'anticorps anti-CCR6, anti CXCR3 et anti-CCR4 permet de distinguer tout d'abord des lymphocytes CCR4<sup>-</sup>CXCR3<sup>+</sup> et CCR4<sup>+</sup>CXCR3<sup>-</sup>. **(C.)** Au sein de la population CCR4<sup>-</sup>CXCR3<sup>+</sup> l'expression du marqueur CCR6 permet l'identification de lymphocytes Th1 (CCR4<sup>-</sup>CXCR3<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup>) et de lymphocytes Th1/Th17 (CCR4<sup>-</sup>CXCR3<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>) capables de sécréter de l'IL-17A uniquement ou en combinaison avec de l'IFN- $\gamma$ . **(D.)** Au sein de la population CCR4<sup>+</sup>CXCR3<sup>-</sup> on identifie des lymphocytes Th2 (CCR4<sup>+</sup>CXCR3<sup>-</sup>CCR6<sup>-</sup>) et des lymphocytes Th17 (CCR4<sup>+</sup>CXCR3<sup>-</sup>CCR6<sup>+</sup>).

Il a également été montré que tous les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Th17 mémoires expriment le marqueur CD161 (Cosmi L, 2008, Kleinschek MA, 2009). Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Th17 ont tous pour origine des précurseurs exprimant RORC2, et contenus dans une population de cellules T CD4<sup>+</sup> CD161<sup>+</sup> présente dans le sang de cordon ombilical (Umbilical Cord Blood/UCB) et le thymus du nouveau-né (Cosmi L, 2008). De plus, j'ai participé à des travaux qui ont permis de montrer qu'un pourcentage important de cellules T CD4<sup>+</sup> expriment la molécule CD90, et que ce marqueur permet d'identifier au sein des cellules

CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>CD161<sup>+/-</sup> une sous-population de lymphocytes Th17 présentant un sécrétome très fortement inflammatoire. Ces lymphocytes Th17 CD90<sup>+</sup> expriment les cytokines IL-17A, IL-6, CCL20, TNF- $\alpha$  et GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), et l'IL-22 à des niveaux plus importants comparativement aux Th17 CD90<sup>-</sup> (Guillot-Delost M & Le Gouvello S, 2012).

Les cellules Th17 CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup> sont localisées de façon physiologique majoritairement au sein du parenchyme intestinal chez les individus sains ; elles sont également présentes dans les autres territoires muqueux périphériques et dans la circulation sanguine (Kleinschek MA, 2009). Cependant, dans la muqueuse intestinale des patients atteints de la maladie de Crohn ou de colite ulcéreuse, ou dans le liquide synovial de patients atteints d'arthrite idiopathique juvénile, les lymphocytes Th17 sont anormalement abondants (Fujino S, 2003, Cosmi L, 2011, Maggi L, 2013). Le rôle délétère des cellules Th17 CCR6<sup>+</sup> dans les pathologies inflammatoires chroniques a été démontré à l'aide de modèles murins déficients pour CCR6 qui sont protégés contre l'inflammation et l'emphysème, par exemple (Bracke KR, 2006, Harrison OJ, 2008). De plus dans un modèle animal d'arthrite rhumatoïde, ce sont principalement les Th17 exprimant CCR6 qui sont recrutés sur les sites inflammatoires (Hirota K, 2007).

Malgré leur rôle hautement pathogène, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Th17 ne représentent néanmoins qu'une minorité des cellules présentes sur le site de l'inflammation en comparaison du nombre de cellules Th1. Il a été récemment proposé que la rareté des lymphocytes Th17 dans les sites inflammatoires pourrait être, en partie, expliquée par l'expression de l'enzyme IL4I1 dans ces cellules (Santarasci V, 2012). L'IL4I1 est une L-amino-oxydase initialement décrite dans les lymphocytes B (Chu CC, 1998) puis dans les cellules dendritiques (Boulland ML, 2007). L'IL4I1 produit de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Son activité est maximale quand elle utilise comme substrat la phénylalanine, plutôt que le tryptophane, la tyrosine ou la leucine (Boulland ML, 2007). L'IL4I1 a pour effet d'inhiber la prolifération des lymphocytes T *in vitro* via l'inhibition de la voie de signalisation liée au TCR dans les Th17 (Santarasci V, 2012). Cette forte expression de l'IL4I1 est détectable dans les précurseurs des cellules Th17 et est dépendante de l'expression du facteur de transcription RORC2. (Santarasci V, 2012).

Enfin, dans certaines conditions, les Th17 peuvent supprimer les fonctions effectrices des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. C'est le cas des Th17 infiltrant les tumeurs qui peuvent exprimer les ectonucléotidases CD73 et CD39 (Chalmin F, 2012). Ce point sera traité plus en détail dans la partie III. 3. e)(2).

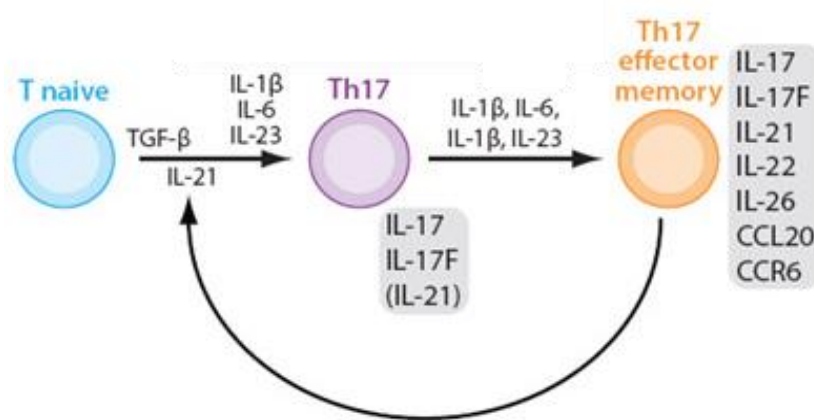
### c) **Différenciation des Th17.**

Chez la souris, la source d'IL-17A la mieux caractérisée est la population de lymphocytes Th17 différenciés à partir de cellules CD4<sup>+</sup> naïves en réponse à une stimulation du TCR par un antigène et en présence d'un micro-environnement cytokinique approprié dans les organes lymphoïdes périphériques. Ces lymphocytes Th17 sont des lymphocytes Th17 inductibles ou iTh17. Néanmoins, il existe une autre population de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> productrices d'IL-17A qui acquiert cette capacité précocement au cours du développement dans le thymus (Marks BR, 2009, Kim JS, 2013). Cette population de Th17 naturels, ou nTh17, a la capacité de produire des cytokines lors d'une stimulation sans recours à une différenciation préalable dans les tissus périphériques. Chez la souris, les nTh17 partagent de nombreuses caractéristiques avec les iTh17, en particulier l'expression du facteur de transcription ROR $\gamma$ 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). Dans la suite de ce document, je ne m'intéresserai qu'aux iTh17 qui seront nommés Th17.

#### **(1) Environnement cytokinique**

Dès 2006, les travaux de l'équipe de Littman chez la souris ont tout d'abord montré que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> murins expriment l'IL-17A en réponse à une combinaison d'IL-6 et de TGF- $\beta$  (Ivanov I.I, 2006, Littman DR 2010). Néanmoins, chez l'homme, les premières données concernant l'environnement cytokinique requis pour la différenciation des Th17 étaient controversées. Il a d'abord été montré que la combinaison cytokinique IL-6-TGF- $\beta$  ne permettait pas d'induire la production d'IL-17A par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Chen Z, 2007). En parallèle, l'IL-1 $\beta$  et l'IL-23 furent identifiées comme des cytokines essentielles à la différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs en cellules productrices d'IL-17A, et le TGF- $\beta$  apparaissait comme un inhibiteur de la génération de ces cellules (Acosta-Rodriguez EV, 2007, Wilson NJ, 2007). Des études ultérieures montrent que, au contraire, le TGF- $\beta$  joue un rôle essentiel dans la différenciation des lymphocytes Th17 (Manel N, 2008, Volpe E, 2008), et que la combinaison du TGF- $\beta$  (Transforming growth factor- $\beta$ ) avec une cytokine pro-inflammatoire l'IL-21 (Yang L, 2008), ou avec l'IL-1 $\beta$  et l'IL23 ou l'IL-6 (Manel N, 2008, Volpe E, 2008) ou l'IL-21 (Manel N, 2008), permet une polarisation des cellules T CD4<sup>+</sup> naïves vers un phénotype Th17. L'IL-1 $\beta$  et l'IL21 agiraient en partie en induisant l'expression du récepteur à l'IL-23 (IL-

23R) (Korn T, 2007 & 2009, Ghoreschi K, 2010). Par ailleurs, il est bien établi que l'IL-23 est essentielle pour la survie des lymphocytes Th17 et le maintien du phénotype Th17 (Wilson NJ, 2007) (Fig. I11).



**Fig.I 11. Conditions de polarisation des Th17 chez l'homme.**

Le TGF- $\beta$  est capable d'induire l'expression du facteur de transcription essentiel pour le développement des Th17, RORC2, dans les cellules T CD4<sup>+</sup> naïves humaines issues du sang de cordon ombilical (Manel N, 2008, Schmitt N, 2014). La controverse concernant le rôle du TGF- $\beta$  dans la génération des lymphocytes Th17 humains pourrait être expliquée en partie par des différences de pureté des cellules T CD4<sup>+</sup> naïves (du sang de cordon doit être utilisé pour l'isolement de précurseurs naïfs), ou par la composition des milieux de culture utilisés dans les différentes études. En effet, l'utilisation de milieu sans sérum est maintenant préconisée, car certains constituants des séra utilisés en cultures pourraient avoir un effet sur l'expression de l'IL-17, notamment le TGF- $\beta$  lui-même et des ligands de AhR (aryl-hydrocarbon receptor) (Manel N, 2008, Veldhoen M, 2009). Cependant la stimulation par le seul TGF- $\beta$  est insuffisante pour induire la production d'IL-17A par des cellules humaines T CD4<sup>+</sup> naïves. L'absence de lymphocytes Th17 chez les patients atteints de syndrome d'hyper-IgE, chez lesquels STAT3 n'est pas fonctionnel dans toutes les cellules, montre que la différenciation de cellules productrices d'IL-17A nécessite, en plus du TGF- $\beta$ , la présence de cytokines susceptibles de mobiliser la voie de signalisation STAT3, ce qui est le cas en ce qui concerne l'IL-21 ou l'IL-23 (Manel N, 2008, Yang L, 2008, Milner JD, 2008, Ma CS, 2008, Schmitt N, 2014).

L'importance du TGF- $\beta$  dans la génération des lymphocytes Th17 humains a été précisée par les travaux de Cosmi et collègues sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>, issus du sang de cordon ombilical ou du thymus, qui peuvent être considérés comme des précurseurs directs des cellules

Th17. Les cellules T naïves différenciées en absence de TGF- $\beta$  exogène, mais en présence d'IL-1 $\beta$  et d'IL-23, montrent un profil d'expression de gènes (RORC2, CCR6, IL-1R1 et IL-23R) caractéristique du phénotype Th17 en comparaison de la population CD4<sup>+</sup>CD161<sup>-</sup> (Cosmi L, 2008). L'expression de l'IL-17A par ces cellules nécessite une stimulation par des anticorps anti-CD3 et anti-CD28, mimant une stimulation antigénique, en présence d'IL-1 $\beta$  et d'IL-23. Cependant après une telle stimulation, une majorité de cellules CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup> deviennent des cellules Th1 exprimant Tbet et l'IFN- $\gamma$ . L'ajout de TGF- $\beta$  dans le milieu de culture permet d'augmenter fortement la génération de cellules exprimant l'IL-17A et non l'IFN- $\gamma$  en inhibant la production d'IFN- $\gamma$  (Santarlasci V, 2009). Le TGF- $\beta$  n'est donc pas impliqué directement dans le développement des Th17 mais favorise leur expansion relative en inhibant les cellules Th1 ou en évitant une plasticité des cellules Th17 vers un phénotype Th1.

Chez l'homme, le facteur de transcription essentiel pour le développement des Th17 est RORC2. La surexpression de ce gène dans des cellules T CD4<sup>+</sup> naïves humaines, cultivées en présence d'IL-1 $\beta$ /IL-6/IL-23, induit une expression des cytokines IL-26 et IL-17A/F, ainsi que celle du récepteur de chimiokine CCR6, associés au phénotype Th17, et l'inhibition de l'expression des cytokines Th1 (Manel N, 2008, Crome SQ, 2009). Il a été montré que le TGF- $\beta$  est nécessaire à l'expression du facteur de transcription RORC2 (Manel N, 2008, Burgler S, 2009, Schmitt N, 2014). De plus, la transfection de RORC2 dans les cellules CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>CD161<sup>-</sup> induit l'expression de la molécule membranaire CD161, et la production de l'IL-17A (Maggi L, 2010). L'expression des facteurs de transcription RORC2 et ROR $\alpha$ , est activée par le facteur de transcription STAT3, qui n'est pas spécifique des Th17 mais joue un rôle important dans la différenciation des Th17 (Yang XO, 2007, Mathur AN, 2007, Durant L, 2010). Enfin, les facteurs de transcription IRF4 (interferon-regulatory factor 4), BATF et Runx1 seraient 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- $\gamma$  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). Dans des modèles murins 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 $\gamma$ t (Batten M, 2006, Stumhofer JS, 2006). Cette activité inhibitrice de l'IL-27 sur la différenciation des Th17 a été confirmée chez l'homme (Chong WP, 2014). L'IL-2 promeut la différenciation des lymphocytes Th17 humains *in vitro* (Manel N, 2008) et le traitement par de l'IL-2 permet de maintenir le nombre

de lymphocytes Th17 circulants chez les patients infectés par le VIH (Ndhlovu LC, 2010). La raison pour laquelle, contrairement à la souris, l'IL-2 n'inhibe pas la génération des Th17 humain n'est à ce jour pas connue.

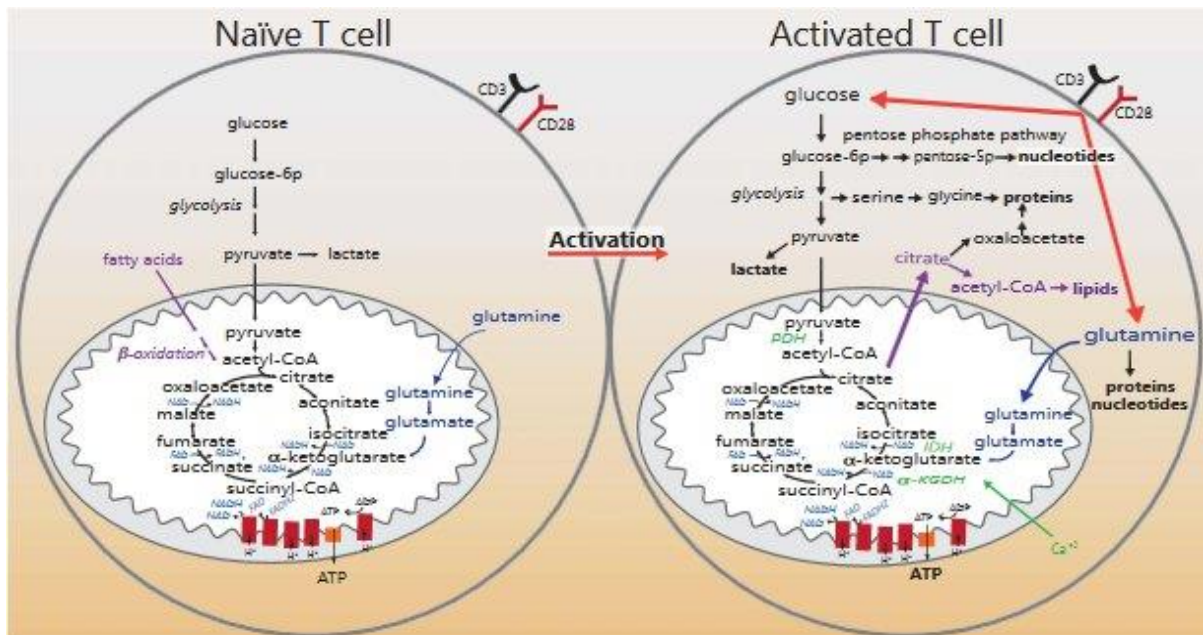
## **(2) Rôle du métabolisme énergétique**

Le métabolisme joue un rôle important dans la régulation des fonctions cellulaires. Les changements du métabolisme n'interviennent pas uniquement dans le maintien de l'homéostasie cellulaire, mais participent également à l'activation de la cellule en réponse à des *stimuli* extérieurs.

Au sein du système immunitaire les lymphocytes représentent une population hétérogène de cellules qui, pour la plupart, sont quiescentes. En absence de stimulation, la fonction principale de ces cellules est la surveillance antigénique, et cette fonction nécessite peu d'énergie et donc d'ATP (Fox CJ, 2005). Ces cellules utilisent le glucose pour fournir de l'ATP *via* la glycolyse, et la phosphorylation oxydative (Pearce EL, 2013). Dans la circulation sanguine, la régulation du métabolisme des lymphocytes T naïfs n'est pas dépendante des nutriments, présents en grande quantité. Elle est assurée par des signaux trophiques en aval du TCR (Rathmell JC, 2000) et des cytokines homéostasiques telles que l'IL-7 (Wofford JA, 2008). De faibles stimulations du TCR sont en effet nécessaires pour maintenir l'expression du transporteur du glucose, Glut-1 (Glucose transporter 1) (Rathmell JC, 2000). L'IL-7 régule l'absorption du glucose et la glycolyse en activant de nombreuses enzymes glycolytiques et en induisant une expression faible mais soutenue de Akt (Protein kinase B) (Wofford JA, 2008).

Lors de l'activation et de la différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs, les cellules subissent un profond changement de métabolisme afin de répondre aux besoins énergétiques et de biosynthèse relatifs à la croissance cellulaire, aux divisions cellulaires successives et à la différenciation (Fig. I12). La stimulation du TCR des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs et la costimulation par la molécule CD28 induisent l'activation de la PI3K (phosphoinositide 3-kinase) et de Akt (Frauwirth KA., 2002). L'activité de Akt dans les cellules activées devient alors significativement plus importante que dans les cellules naïves. Akt stimule la glycolyse en induisant l'expression de Glut-1 et en augmentant l'activité des enzymes glycolytiques la phosphofructokinase et l'hexokinase (Barthel A, 1999) ; l'expression de cette dernière est induite par ERK en réponse à une stimulation du TCR (Marko AJ, 2010). Akt active également mTOR (mammalian target of rapamycin) et promeut ainsi la synthèse protéique et lipidique

(Berwick DC, 2002, Chi H, 2012). L'activation de la cellule induit également une forte augmentation de calcium ( $\text{Ca}^{++}$ ) intracellulaire et l'activation de NFAT et NF- $\kappa$ B (Lewis RS, 2003, Tomida T, 2003). Les mitochondries sont également impliquées dans la régulation du  $\text{Ca}^{++}$  intracellulaire, et l'augmentation de l'absorption de  $\text{Ca}^{++}$  par la mitochondrie active des enzymes (Pyruvate dehydrogenase [PDH], isocitrate dehydrogenase,  $\alpha$ -cétoglutarate dehydrogenase) et augmente l'activité du cycle de Krebs (Tarasov AI., 2012). L'augmentation de l'activité du cycle de Krebs génère du NADH et du  $\text{FADH}_2$  qui serviront de donneurs d'électrons pour la chaîne respiratoire mitochondriale dont la production d'ATP se trouve également augmentée.



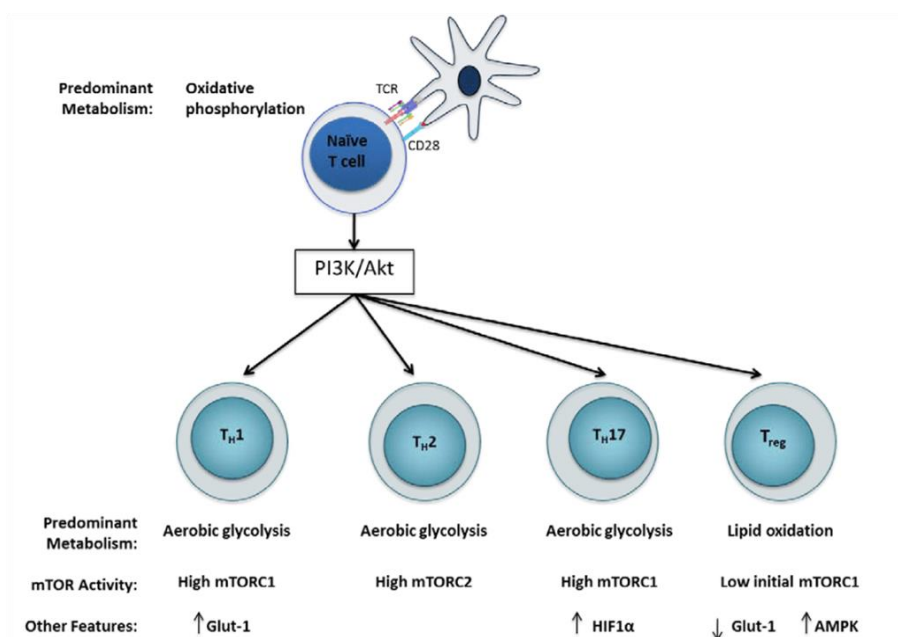
**Fig.I 12. Aperçu du changement de métabolisme lors de l'activation des lymphocytes T (Ron-Harel, 2015).**

Suite à cette phase initiale de l'activation des cellules T naïves, les lymphocytes entament une phase de croissance et une expansion clonale. Les lymphocytes ont alors majoritairement recours à la glycolyse aérobie (MacIver NJ, 2013, Pearce EL, 2013). Ce métabolisme glycolytique non oxydatif est comparable à l'effet Warburg observé dans les cellules tumorales (Vander Heiden MG, 2009, Pearce EL, 2013). Bien que la glycolyse aérobie soit moins efficace que la phosphorylation oxydative pour répondre aux besoins en ATP, elle génère des métabolites intermédiaires, tels que le glucose-6-phosphate et le 3-phosphoglycérate, importants pour la synthèse de nucléotides et d'acides aminés essentiels pour la croissance cellulaire (Vander Heiden MG, 2009, Anastasiou D, 2011, Macintyre AN, 2013), et de NADPH, utilisé pour la réduction du glutathion, lui aussi important pour la division cellulaire.

Ce changement de métabolisme s'accompagne d'une inhibition de l'oxydation des acides gras dans la mitochondrie. Les acides gras restent alors disponibles pour la synthèse des lipides.

Le métabolisme des cellules T CD4<sup>+</sup> effectrices repose essentiellement sur la glycolyse aérobie, alors que le métabolisme des iTregs repose sur la phosphorylation oxydative et l'oxydation des lipides (Fig. I13). Les cellules T activées peuvent toujours avoir recours à la phosphorylation oxydative pour répondre à leurs besoins énergétiques, mais cette reprogrammation métabolique et l'induction d'un métabolisme majoritairement glycolytique est une étape essentielle pour l'acquisition d'un phénotype effecteur de type Th1, Th2 ou Th17 (Michalek RD, 2011, revue dans Barbi J, 2013).

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mémoires, d'un point de vue métabolique, présentent les caractéristiques de cellules quiescentes. A l'instar des cellules naïves ils incorporent donc du glucose et des acides aminés à bas bruit, qui serviront de matière première pour fournir de l'ATP via une glycolyse modérée et la phosphorylation oxydative (Michalek RD, 2011).



**Fig.I 13. Aperçu du métabolisme des différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>.**

La différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> est associée à un changement de métabolisme et à une induction de la voie de signalisation mTOR, qui permettent aux cellules de répondre aux besoins énergétiques et de biosynthèse protéique et lipidique. La fourniture des besoins en énergie des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Th1, Th2 et Th17 repose essentiellement sur la glycolyse aérobie. Le métabolisme des Tregs repose sur la phosphorylation oxydative et l'oxydation des lipides (Coquillard C, 2015).

L'augmentation du métabolisme glycolytique dans les cellules Th17 semble également importante pour le maintien du phénotype Th17. L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques du métabolisme du glucose, tels que le 2-déoxyglucose, diminue le développement des lymphocytes Th17 et contribue au développement des Tregs (Shi LZ, 2011). Le recours à la glycolyse est fortement lié à l'activation de mTOR, et l'augmentation de la glycolyse, dépendante de l'activité de mTOR, observée dans les Th17 semble reliée à l'augmentation de HIF-1 $\alpha$  (Hypoxia-inducible factor 1- $\alpha$ ). Chez la souris, HIF-1 $\alpha$  possède des sites de fixation sur le *locus* codant pour ROR $\gamma$ t et contribue à l'augmentation de l'expression de ce facteur de transcription tout en inhibant celle de FOXP3 (Forkhead box P3) (Dang EV, 2011). Des modèles murins déficients pour l'expression de HIF1 $\alpha$  sont caractérisés par une diminution des lymphocytes Th17 et une augmentation des Tregs (Shi LZ, 2011). La PDH est l'enzyme permettant la liaison entre la glycolyse aérobie et la phosphorylation oxydative. La PDH catalyse la conversion du pyruvate cytosolique en acétyl-CoA mitochondrial. Sa fonction peut être inhibée par les PDH kinases (PDHKs). Le pyruvate est alors converti en lactate par la lactate déshydrogénase (Kaplun J, 2013). PDHK1 est un des gènes cibles de HIF1 $\alpha$  et est exprimée dans les lymphocytes Th17 et à un faible niveau dans les Tregs. L'inhibition ou la déficience en PDHK1 inhibe la différenciation *in vitro* des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs en Th17 et induit une augmentation de la population Treg (Gerriets AV, 2014). Nr4a1 (Nur77) est un gène induit lors d'une stimulation du TCR et peut servir d'indicateur de la force du signal TCR. Ce gène est également important pour la glycolyse et pourrait réguler négativement le développement des Tregs en participant à l'induction des gènes impliqués dans la glycolyse (Chao LC, 2009, Fasset MS, 2012). Le promoteur du gène codant pour Nr4a1 possède un site de fixation pour HIF-1 $\alpha$ , ce qui suggère un rôle pour ce facteur dans la transcription de Nr4a1 (Choi JW, 2004). De plus, l'induction de l'oxydation des lipides a des effets négatifs sur la différenciation des lymphocytes Th17. En effet la supplémentation en acides gras exogènes d'un milieu de culture en conditions polarisantes pro-Th17, inhibe la différenciation *in vitro* des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs en Th17 (Michalek RD, 2011, Berod L, 2014).

Un métabolisme reposant sur l'oxydation des lipides est lui associé à un phénotype Treg. En effet, l'acquisition d'un phénotype Treg est indépendante du phénomène de reprogrammation métabolique décrit précédemment dans ce document et nécessaire à l'établissement d'un phénotype effecteur. Les mesures de potentiel mitochondrial et des niveaux d'oxydation du palmitate lors d'une activation des différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> montrent que les Tregs ont peu recours à la glycolyse et reposent sur la phosphorylation

oxydative et l'oxydation des lipides (Michalek RD, 2011). D'ailleurs, comparativement aux Th17, les Tregs ne montrent qu'une modeste augmentation de Glut1, un transporteur du glucose essentiel pour la glycolyse. Enfin, les Tregs expriment l'adénosine monophosphate activated kinase (AMPK) qui favorise la synthèse *de novo* des acides gras et leur oxydation (Michalek RD, 2011).

Parallèlement à l'incorporation et au métabolisme du glucose, les acides aminés jouent également un rôle important dans la croissance et la division cellulaire. Ils participent en effet à la synthèse des nucléotides, au métabolisme énergétique et au contrôle de l'équilibre redox de la cellule (Li P, 2007). La glutamine est l'acide aminé le plus abondant dans le sérum et est impliquée dans l'activation des lymphocytes T. Elle participe en effet à la synthèse des nucléotides et *via* le principal produit de son métabolisme, le glutamate, à la synthèse des acides aminés et du glutathion. De plus, le glutamate peut être converti en  $\alpha$ -cétoglutarate, intégrer le cycle de Krebs et donc participer à la production énergétique de la cellule (Fig I12). La consommation de glutamine des lymphocytes est comparable, voir supérieure, à celle du glucose, et en réponse à une stimulation du TCR, la prolifération et la production de cytokines des lymphocytes en culture est dépendante de la présence de glutamine (Horig H, 1993, Yaqoob P, 1997 & 1998, Carr EL, 2010). De plus, l'activation du lymphocyte induit une augmentation de l'incorporation de la glutamine. Cette augmentation est corrélée à une augmentation de l'expression des transporteurs de la glutamine (les transporteurs de la famille des « sodium-dependent neutral amino acid transporter » [SNAT]) et de l'activité des enzymes permettant sa conversion en glutamate (dont la glutaminase) et de son utilisation par le cycle de Krebs. Cette augmentation est dépendante de la co-stimulation par CD28 et de l'activité de ERK, impliquée dans le contrôle de l'expression et de l'activité des SNAT (Franchi-Gazzola R, 1999, Lopez-Fontanals M, 2003) suggérant un rôle de l'activation du TCR dans ce mécanisme.

### **(3) Autres facteurs influençant la différenciation des Th17**

#### **(a) Flore microbienne**

L'organisme humain abrite une flore microbienne commensale normalement présente sur la peau et les muqueuses des sujets sains. Les bactéries commensales peuvent être réparties en 4 flores principales (cutanée, respiratoire, génitale et digestive). La flore commensale procure de nombreux avantages à l'organisme humain, tels que la synthèse de vitamine K, l'aide à

l'absorption des aliments, prévient par sa composition équilibrée la prolifération de bactéries commensales potentiellement dangereuses (*Clostridium difficile*), et gêne la colonisation des muqueuses par des bactéries pathogènes. La flore commensale participe également activement à la régulation et l'homéostasie du système immunitaire (Backhed F, 2005). La flore commensale pourrait avoir une influence sur le développement des différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Il a ainsi été montré, chez la souris, que la présence dans la *lamina propria* de l'intestin de bactéries Gram positif, de type SFB telles que *Candidatus arthromitus*, est suffisante pour induire le développement de cellules Th17 productrices d'IL-17 et IL-22 (Ivanov II, 2009). De plus, dans des modèles murins, l'apparition des cellules Th17 dans l'intestin est contemporaine de la colonisation de cet organe par des bactéries résidentes (Ivanov II, 2010). Les bactéries SFB sont absentes chez l'homme (Gaboriau-Routhiau, V, 2009), néanmoins, les recherches actuelles montrent l'importance du microbiote chez l'homme.

#### (b) AhR

Le développement des lymphocytes Th17 pourrait également dépendre de facteurs externes. Les récepteurs AhR sont des facteurs de transcription activés par leurs ligands dont le rôle a d'abord été décrit dans la médiation de la toxicité de la dioxine. Les ligands de AhR peuvent être des molécules externes (comme par exemple les particules diesel trouvées dans la pollution environnementale). Parmi ces ligands, les acides aminés aromatiques, agonistes naturels de AhR, favorisent la différenciation des Th17 quand ils sont ajoutés dans le milieu de culture. Ces acides aminés peuvent être retrouvés *in vivo* dans l'intestin, apportés par les aliments ou produits par les bactéries commensales. Les souris déficientes pour le récepteur AhR montrent un développement restreint de la population Th17 et une absence de production d'IL-22 (Veldhoen M, 2008, Veldhoen M, 2009). Cependant, selon la nature du ligand, AhR peut promouvoir la génération de cellules Th17 ou celle de lymphocytes T régulateurs (Treg) (Quintana FJ, 2008). Les facteurs métaboliques présents dans le microenvironnement peuvent donc moduler la polarisation fonctionnelle des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et agir sur la balance Th17/Treg.

(c) Oxyde nitrique

Il a été montré chez la souris, que l'oxyde nitrique (NO) en agissant sur la nitration des résidus de tyrosine de ROR $\gamma$ t conduit à la suppression de l'activation du promoteur de l'IL-17 induite par ROR $\gamma$ t, mettant ainsi en avant un rôle négatif du NO dans la différenciation des Th17 (Jianjun Y, 2013).

**d) Rôle physiologique, cytokines et chimiokines produites par les lymphocytes Th17.**

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Th17 interviennent dans la défense de l'hôte contre les infections fongiques et bactériennes extracellulaires, particulièrement celles qui colonisent la peau, les muqueuses de l'intestin et des voies aériennes. Il peut s'agir de certains champignons dont *Candida albicans*, ou de bactéries gram positives (*Propionibacterium acnes*, *Streptococcus pneumoniae*) ou gram négatives (*Bordetella pertussis*, *Citrobacter rodentium* et *Klebsiella pneumoniae*) (Infante-Duarte C, 2000, Chung DR, 2003, Huang W, 2004, Khader SA, 2007, Aujla SJ, 2008, Peck A, 2010). L'utilisation de modèles murins déficients pour des gènes essentiels à la fonction des lymphocytes Th17 a permis de démontrer leur rôle essentiel dans la résolution de ces types d'infections bactériennes. Les souris déficientes pour le gène de l'IL-17A présentent une réaction exacerbée à la 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 de type *C. Albicans* (Huang W, 2004).

Des cellules T CD4<sup>+</sup> humaines stimulées par une combinaison d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28 dans des conditions de cultures polarisantes pro-Th17 produisent de l'IL17A et de l'IL-17F sous formes d'homodimères ou d'hétérodimères, montrant que le complexe IL-17A/F est bien une forme naturelle de ces protéines (Wright JF, 2007). L'existence d'hétérodimères IL-17A/IL-17F a été montrée, et ces hétérodimères présentent une activité intermédiaire comparativement à celle des homodimères respectifs (Chang SH, 2007). L'expression de ces deux interleukines est associée à de nombreuses pathologies inflammatoires chroniques telles que l'arthrite rhumatoïde, la sclérose en plaque, le psoriasis, la maladie de Crohn et l'asthme (Nakae S, 2003, Lubberts E, 2004, Langrish CL, 2005, Park H, 2005).

Les cytokines de la famille de l'IL-17, IL-17A et IL-17F, présentent une forte homologie dans leurs séquences protéiques (50%). L'IL-17A et F sécrétées par les Th17 induisent l'expression

de diverses cytokines pro-inflammatoires et chimiokines *via* leur fixation sur un récepteur commun hétérodimérique composé des chaînes IL-17RA et IL-17RC (Toy D, 2006). Ce récepteur est exprimé par une grande variété de cellules (cellules épithéliales, endothéliales, fibroblastes). L'IL-17A a été initialement décrite comme un inducteur de la production de l'IL-6, l'IL-8 (CXCL8), MCP-1 (Monocyte chemotactic protein 1 ; CCL2) et l'expression de ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1) par les fibroblastes (Yao Z, 1995, Brembilla NC, 2013). Le travail de l'équipe de Nakashima suggère également un rôle anti-fibrosant de l'IL-17A, *via* la baisse de production du collagène de type 1 par les fibroblastes (Nakashima T, 2012, Brembilla NC, 2013). Il a ensuite été montré que l'IL-17A est également impliquée dans la production de facteurs de croissance, de chimiokines et de métalloprotéinases, et dans le recrutement et l'activation des neutrophiles dans les muqueuses. En effet, l'IL-17A régule la production de chimiokines ligands des récepteurs CXCR1/CXCR2 par les fibroblastes et les cellules épithéliales (Witowski J, 2000, Kolls JK, 2004, McAllister F, 2005). Les souris traitées avec un anticorps neutralisant dirigé contre l'IL-17A ou des souris déficientes pour l'IL-17A sont résistantes à l'EAE (Komiyama Y, 2006). L'IL-17F est produite par les cellules T CD4<sup>+</sup> et les monocytes activés et induit l'expression du TGF- $\beta$ 1 et 2, de CCL-2 (MCP-1), de la lymphotoxine- $\beta$  et de l'IL-2 par la lignée cellulaire endothéliale HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells), suggérant un rôle possible dans l'angiogénèse (Starnes T, 2001). L'IL-17F induit l'expression de ICAM-1 et du GM-CSF dans les cellules épithéliales bronchiques. L'IL-17F induit également une augmentation de l'expression de l'IL-6 et de CXCL1 dans les fibroblastes et les cellules épithéliales, et de CCL2, CCL7, TSLP et MMP13 dans les fibroblastes pulmonaires (Yang XO, 2008). Des modèles murins de surexpression de l'IL-17F développent des pathologies des voies respiratoires (asthme) caractérisées par un important recrutement de neutrophiles.

A l'instar des souris déficientes pour le gène de l'IL-17A, les souris déficientes pour le gène de l'IL-23p19 présentent également une réaction exacerbée à la bactérie *K. pneumoniae* (Happel KI, 2005, Aujla SJ, 2008). En réponse à l'IL-23, les Th17 produisent de l'IL-22, une cytokine qui appartient à la famille de l'IL-10 (Chung Y, 2006). Le récepteur de cette cytokine est composé de deux chaînes, l'IL-10R2 et l'IL-22R1 et est exprimé dans de nombreux tissus notamment sur les cellules endothéliales et épithéliales, mais pas sur les cellules immunitaires (Kotenko SV, 2001, Aggarwal S, 2001). Le rôle de l'IL-22 produit par les Th17 est de communiquer avec des tissus autres que les cellules immunitaires. De plus, l'IL-17 et l'IL-22 sécrétées par les Th17 induisent la production de peptides antimicrobiens par les cellules épithéliales des muqueuses (Matsuzaki G, 2007, Aujla SJ, 2007). L'IL-22 induit la production

de peptides anti-microbiens par les kératinocytes jouant ainsi un rôle majeur dans la fonction de barrière immunologique de la peau. Il a néanmoins été montré dans des modèles murins de psoriasis que l'IL-22 pouvait induire une inflammation cutanée et une prolifération des kératinocytes (Boniface K, 2005, Sa SM, 2007). L'IL-22 peut être produite par différentes sources cellulaires et les modèles murins déficients en IL-22 restent sensibles à l'EAE. L'IL-22 ne peut donc pas être considérée comme un facteur pathogène des Th17. Enfin, l'IL-22 semble ne pas avoir qu'un rôle pro-inflammatoire et peut, au contraire jouer un rôle protecteur dans certaines pathologies inflammatoires hépatiques, intestinales ou du myocarde. (Zenewicz LA, 2007, Sugimoto K, 2008, Chang H, 2006).

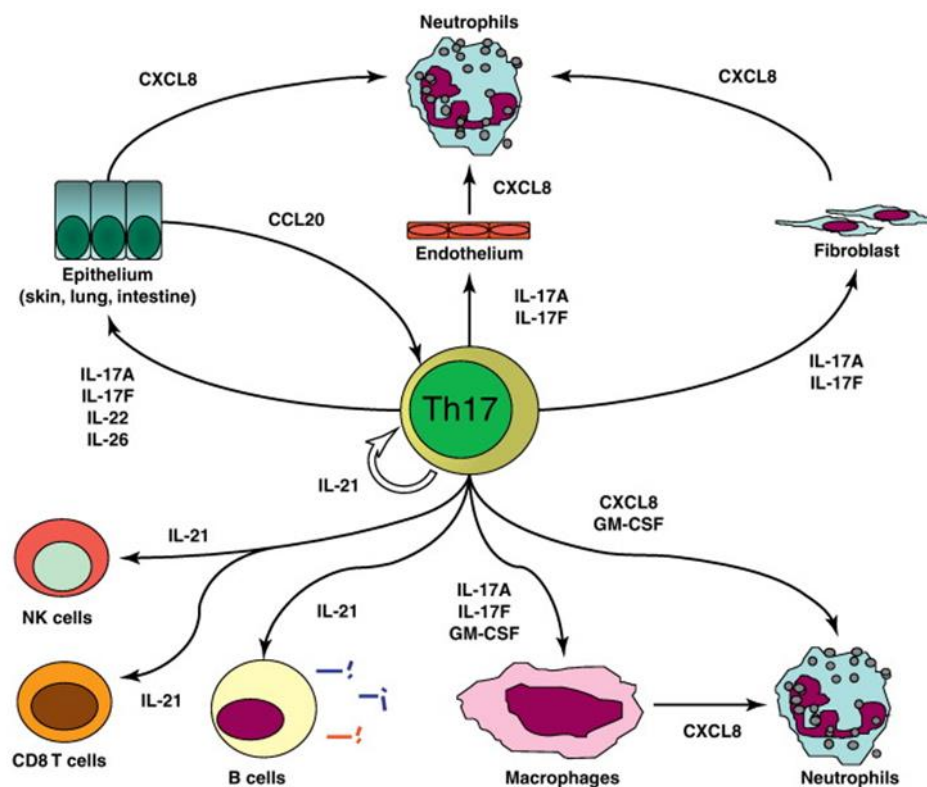
L'IL-21 est une cytokine produite par les cellules T activées et les NKT (Parrish-Novak J, 2000); l'ARN messager et la protéine sont beaucoup plus exprimés par les Th17 comparativement aux cellules Th1 et Th2. Cette interleukine permet d'augmenter la prolifération des cellules lymphoïdes, la cytotoxicité des cellules T CD8<sup>+</sup> et NK ainsi que la différenciation des cellules B en plasmocytes. L'IL-21 a un effet négatif sur la présentation des antigènes par les cellules dendritiques et pourrait avoir un rôle pro-apoptotique pour les cellules B et NK. Elle possède également une activité anti-tumorale mais est associée au développement de pathologies auto-immunes. Son récepteur est composé de la chaîne commune  $\gamma_c$  et de l'IL-21R (Asao H, 2001, Habib T, 2002), et est exprimé par les cellules CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, B, NK, les cellules dendritiques, les macrophages et les kératinocytes (Spolski R, 2008). L'induction de l'IL-21 augmente la production autocrine d'IL-21, et induit l'expression de l'IL-23R sur les cellules T CD4<sup>+</sup> (Zhou L, 2007). Dans un modèle murin de colite, il a été montré que l'IL-21 favorise le développement des Th17 *via* la suppression de l'expression de FOXP3 dans des cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> activées avec du TGF- $\beta$  (Fantini MC, 2007).

Les lymphocytes Th17 sécrètent également la chimiokine CCL20, un ligand du récepteur CCR6. Cette chimiokine exprimée notamment par les tissus intestinaux et les tissus pulmonaires de patients atteints de BPCO (Demedts IK, 2007), facilite la migration des cellules immunes exprimant le récepteur de chimiokine CCR6 (cellules T mémoires, nTreg, lymphocytes B, des cellules dendritiques et des cellules de Langerhans) (Lia F, 1999, Iwasaki A, 2000, Kleinewietfeld M, 2005, Williams IR, 2006) dans ces tissus. L'expression par les Th17 du ligand CCL20 et de son récepteur indique que les Th17 réguleraient leur propre recrutement dans les tissus inflammatoires par un mécanisme paracrine. CCL20 est aussi induite par l'IL-17A dans les cellules infiltrant les tissus, suggérant qu'elle pourrait intervenir dans le maintien de l'inflammation tissulaire provoquée par les Th17 (Dong C, 2008).

Le TNF- $\alpha$  (facteur de nécrose tumorale) est une cytokine impliquée dans de nombreuses pathologies inflammatoires. Il est exprimé par une large variété de cellules dont les macrophages, les mastocytes et les cellules NK, ainsi que les lymphocytes B et T, dont les Th17. Il existe sous une forme soluble et sous une forme membranaire. Le TNF- $\alpha$  possède un grand nombre de propriétés pro-inflammatoires *via* l'induction dans ces cellules cibles de la production d'IL-6, IL-8, MCP-1, MIP-1 $\alpha$  et RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted)/CCL5, et l'activation des macrophages (Puren AJ, 1998, Sohn C, 2014). Les effets du TNF- $\alpha$  sont médiés chez l'homme *via* ses récepteurs, TNF-R1 et -R2. Ces récepteurs sont exprimés à la surface d'une grande majorité des cellules nucléées dont les lymphocytes, les macrophages, les NK, les cellules endothéliales (Horiuchi T, 2010).

Les lymphocytes Th17 humains activés sécrètent du GM-CSF (Pelletier M, 2010, Guillot-Delost M, 2012). Celui-ci contribue à promouvoir la granulopoïèse et à recruter et activer les neutrophiles, monocytes et macrophages, et les lymphocytes. Ces effets s'exercent par fixation sur des récepteurs hétérodimériques exprimés sur les cellules précédemment citées et les cellules épithéliales (Griffin JD, 1990, Shin Y, 2006).

Une vision d'ensemble du sécrétome des Th17 est donnée dans la figure I14.



**Fig.I14. Production de cytokines, chimiokines et facteurs de croissance (adapté de Annunziato F, 2012).**

e) **Plasticité fonctionnelle des Th17.**

**(1) Th17/Th1 et Th17/Th2.**

Le travail de l'équipe de Romagnani a pour la première fois montré l'existence d'une population de lymphocytes Th17 capable de produire à la fois de l'IL-17 et de l'IFN- $\gamma$  (Th17/Th1), suggérant qu'il pourrait exister une plasticité entre les lymphocytes Th17 et Th1. Lorsqu'ils sont cultivés *ex vivo* en présence d'IL-12, les lymphocytes Th17 et Th17/Th1 présentent une plasticité vers un profil Th1 (Annunziato L, 2007). Les lymphocytes Th17 nécessitent du TGF $\beta$  pour produire de l'IL-17A et F, mais en absence de TGF $\beta$ , l'IL-23 et l'IL-12 suppriment l'expression de l'IL-17 dans ces cellules, et augmentent l'expression de l'IFN- $\gamma$  de manière dépendante de STAT4 et Tbet (Lee YK, 2009). Il a également été montré que l'acquisition de propriétés propres aux lymphocytes Th1, l'expression de Tbet et la sécrétion d'IFN- $\gamma$  *in vivo*, est nécessaire à l'activité anti-tumorale des cellules Th17 (Lee YK, 2009, Martin-Orozco, 2009).

Chez l'homme, les cellules Th1 dérivées des cellules Th17 expriment la molécule CD161, au contraire des cellules Th1 « classiques », et sont donc nommées cellules « Th1 non classiques ». Ces cellules conservent l'expression de RORC2, du récepteur à l'IL-17E, de CCR6 et de l'IL4I1 (Maggi L, 2012). La déméthylation des gènes codant pour *RORC2* et *IL17A* est une autre caractéristique de ces cellules (Mazzoni A, 2015). Dans des expériences de greffes, les cellules Th1 productrices d'IFN- $\gamma$  se comportent comme des cellules effectrices à un stade de différenciation terminale et présentent une forte sensibilité à l'apoptose (Wu CY, 2002), contrairement aux cellules Th17 plus résistantes à l'apoptose et dont la greffe est plus efficace (Shi G, 2009, McKinstry KK, 2010). Enfin, la forte expression de Tbet (Tbet<sup>high</sup>) par les cellules Th1 est associée avec un stade terminal de différenciation et des capacités de survie limitées, tandis que les cellules « Th1 non classiques » dérivées des cellules Th17 présentent une expression faible de Tbet (Tbet<sup>lo</sup>) retrouvée dans des populations de cellules CD4<sup>+</sup> mémoires centrales à longue durée de vie (Joshi NS, 2007, Marshall HD, 2011, Muranski P, 2011).

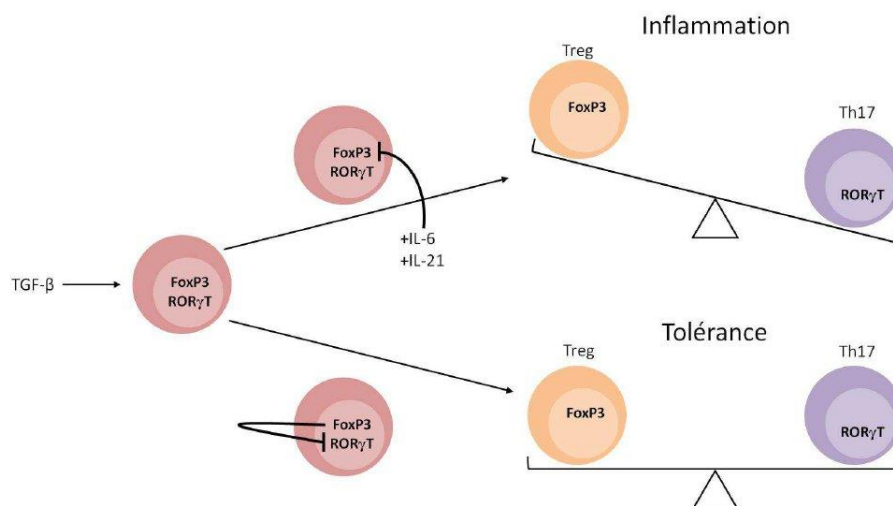
Il a également été montré que la plasticité des Th17 ne se limite pas à l'acquisition de fonctions effectrices de type Th1. Des sous-populations de cellules CCR6<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup> exprimant à la fois l'IL-17A et l'IL-4, ou cellules « Th17/Th4 » ont été observées dans la circulation sanguine de patients atteints d'asthme et dans les tissus pulmonaires inflammatoires de modèles murins d'allergie (Cosmi L, 2010, Wang YH, 2010).

En revanche, il n'a jamais été démontré pour l'instant qu'il était possible de « convertir » des Th1 ou des Th2 en Th17 suite à une restimulation *in vitro* en présence de cytokines polarisantes pro-Th17, tant chez l'homme, que chez la souris (Cosmi L, 2010). Les sous-populations hybrides de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> présentant des caractéristiques communes des Th17 et des Th1 ou Th2 dériveraient donc essentiellement des Th17.

Au total, selon ces études, les lymphocytes Th17 ne représenteraient pas un stade terminal de différenciation de cellules T CD4<sup>+</sup> effectrices/mémoires comme décrit initialement (Muranski P, 2011), mais un stade transitoire (Mazzoni A, 2015).

## (2) Th17/Treg

Une autre plasticité fonctionnelle décrite pour les lymphocytes Th17 est leur capacité de transformation en lymphocytes T régulateurs (Tregs), cellules suppressives de l'inflammation. Des études suggèrent que les Th17 et les iTregs sont générés à partir d'un même précurseur commun. Les lymphocytes Th17 et Tregs, bien qu'exprimant des facteurs de transcription distincts ROR $\gamma$ t et FOXP3, ont pour caractéristique commune le recours au TGF- $\beta$  au cours de leurs processus de différenciation fonctionnelle. En réponse au TGF- $\beta$ , aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, les cellules T expriment à la fois ROR $\gamma$ t et FOXP3 (Veldhoen M, 2006, Bettelli E, 2006, Yang XO, 2008). En fonction de la composition du microenvironnement cytokinique, et en particulier des quantités relatives d'IL-6 et de TGF- $\beta$ , l'un ou l'autre de ces deux phénotypes fonctionnels, Th17 ou Tregs, va être privilégié (Fig I15). Des taux élevés de TGF- $\beta$  en absence d'IL-6 induisent l'expression de FOXP3 et répriment la transcription de l'IL-23R dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs. FOXP3 peut ensuite se lier à la protéine ROR $\gamma$ t et empêcher sa liaison à l'ADN et le bon déroulement du programme transcriptionnel pro-Th17 au profit de l'expression de gènes « pro-Tregs ». Au contraire, la présence de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et l'IL-21 en présence d'un taux faible de TGF- $\beta$  induit l'activation de STAT3 permettant de passer outre l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de ROR $\gamma$ t par FOXP3, la transcription de l'IL-23R, et la différenciation fonctionnelle des cellules vers un phénotype Th17 (Zhou L, 2008). Il existe donc un équilibre entre la différenciation des Th17 et des Tregs.



**Fig.I 15. Balance entre lymphocytes Tregs et Th17 (Noack M, 2014).**

Chez la souris, des travaux ont permis d'identifier, *in vivo* et *ex vivo*, une sous-population de lymphocytes T  $CD4^+$   $CCR6^+$  exprimant à la fois FOXP3 et ROR $\gamma$ t, et produisant de l'IL-17 bien que dotée des propriétés suppressives caractéristiques des Tregs (Lochner M, 2008). D'autres travaux ont permis de mettre en évidence l'existence de cette population *ex vivo* chez l'homme dans le sang périphérique et dans les organes lymphoïdes secondaires (Ayyoub M, 2009, Voo KS, 2009). Il a de plus été montré que, chez l'homme, *in vitro*, les Tregs mémoires pouvaient se différencier en Th17 lorsqu'ils sont stimulés en présence d'IL-1 $\beta$  et d'IL-2 (Deknuydt F, 2009), et les nTregs peuvent se différencier *in vitro* en Th17 lors d'une stimulation en présence d'IL-2, d'IL-1 $\beta$ , d'IL-23 et de TGF $\beta$  (Valmori D, 2010).

La transdifférenciation des Th17 en Tregs a également été démontrée. Dans un modèle animal de tolérance induite par l'injection d'anticorps anti-CD3, il a été montré que les cellules Th17 recrutées dans les tissus intestinaux peuvent acquérir des fonctions immunosuppressives. Ce phénomène est dépendant de la présence d'IL-10, de TGF- $\beta$  et de CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein-4) (Esplugues E, 2011). Ces travaux suggèrent que les Th17, dans l'intestin présentent des caractéristiques communes des cellules iTreg de type1 (Tr1). En effet, dans l'intestin, en condition basale ou lors d'une réponse immunitaire induite (en réponse à une injection d'anticorps anti-CD3 dans un modèle d'EAE murin, lors d'une infection par un helminthe *N. brasiliensis*, ou une infection bactérienne par *S. aureus*) certains Th17 produisent de l'IL-10 (sans pour autant exprimer FOXP3) et expriment des marqueurs de Tr1 tels que LAG-3 (Lymphocyte activation Gene-3).

Le travail de F Ghiringhelli et L Apetoh, a montré que des lymphocytes Th17 murins générés *in vitro* à partir de lymphocytes T  $CD4^+$  naïfs en présence d'IL-6 et de TGF- $\beta$ , ou infiltrés dans

les tumeurs expriment les ectonucléotidases CD39 et CD73 (Chalmin F, 2012). Cette observation a été ensuite confirmée chez l'homme, où, dans le cancer du sein, des lymphocytes Th17 CD25<sup>high</sup>, exprimant à la fois RORC2 et FOXP3 et sécrétant des cytokines associées au profil Th17, s'accumulent dans les tumeurs et expriment CD39 et CD73 (Thibaudin M, 2016). Le CD39 dégrade l'ATP en adénosine mono-phosphate (AMP), dans le milieu extracellulaire. La liaison de l'adénosine au récepteur A2A des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> conventionnels (Tconv) supprime leur prolifération *in vitro* et *in vivo* (Sitkovsky MV, 2004). L'expression de ces ectonucléotidases contribue à la croissance tumorale.

***f) Implication des Th17 dans les désordres immunitaires.***

Le rôle des Th17 dans la promotion de l'inflammation et la pathogénèse des désordres auto-immuns est largement documenté. Différents modèles animaux ont permis de montrer l'implication de ces cellules Th17 et des cytokines qui leur sont associées dans diverses pathologies inflammatoires chroniques et des maladies auto-immunes, dont les principales sont la BPCO, le psoriasis, l'arthrite rhumatoïde, la sclérose en plaques, la maladie de Crohn et l'asthme sévère. De plus les Th17 peuvent jouer un rôle, bénéfique ou délétère, dans certains cancers (Kikly K, 2006, Zhang Z, 2006, Hirota K, 2007, Zheng Y, 2007).

**(1) Th17 dans les maladies auto-immunes et inflammatoires chroniques.**

Avant la découverte des Th17, les lymphocytes Th1 étaient identifiés comme les principaux responsables des réponses immunitaires délétères de la sclérose en plaques et de son modèle murin, l'EAE. (Oppmann B, 2000, Cua DJ, 2003). L'utilisation de modèles murins déficients pour la chaîne p35, retrouvée uniquement dans l'IL-12, ou la chaîne p40, commune à l'IL-12 et à l'IL-23, ou la chaîne p19, rentrant dans la composition de l'IL-23, ont montré que seules les souris déficientes pour p40 et p19 sont protégées contre l'EAE et donc que l'IL-12, et par extrapolation les Th1, sont moins importants dans la maladie que l'IL-23, cytokine régulant positivement les Th17 (Cua D.J, 2003). D'autres preuves de l'implication des Th17 dans la maladie ont ensuite été apportées, telle qu'un retard de l'apparition de la maladie chez les souris déficientes en IL-17, lié à un moindre recrutement des neutrophiles dans les sites

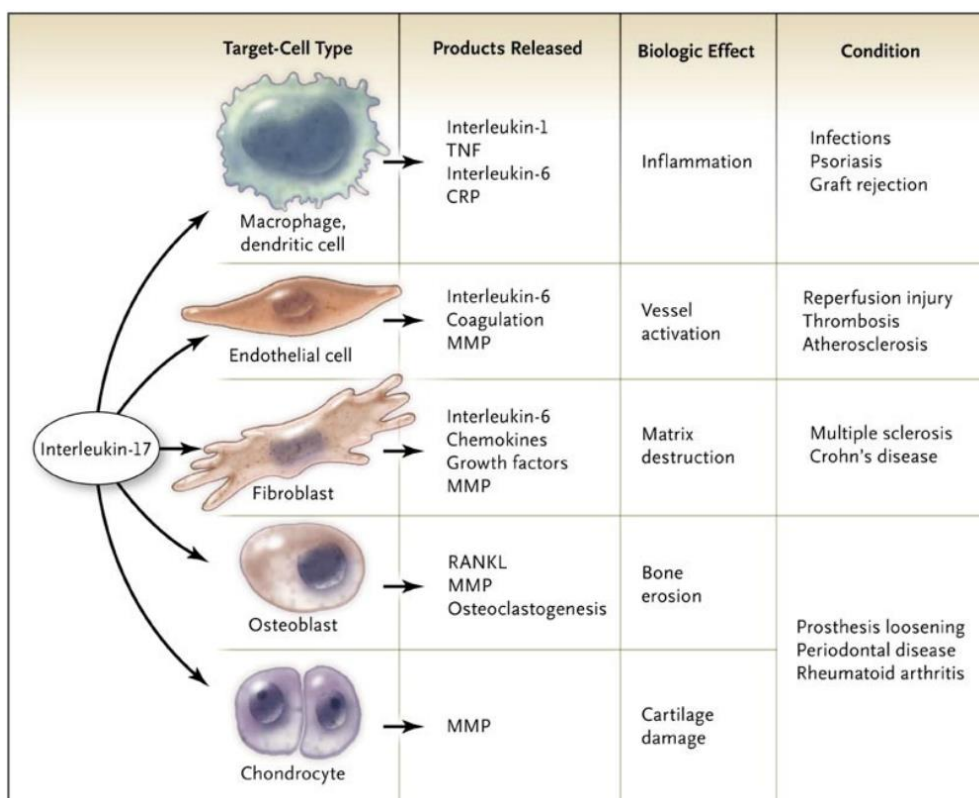
inflammatoires, (Yang XO, 2008). De plus chez les patients développant une sclérose en plaques, un accroissement de la réponse Th17 et une augmentation de la production d'IL17 sont directement corrélés à la sévérité de la maladie (Ishizu T, 2005, Kirkham BW, 2006, Wolk K, 2006). La réponse Th17 consiste dans l'induction de 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 $\beta$ , le TNF- $\alpha$ , l'IL-8, et des MMP qui détruisent la matrice extracellulaire (Park H, 2005). Les Th17 infiltrés dans le cerveau activeraient la production par les astrocytes de chimiokines à l'origine de l'infiltration de nouvelles cellules immunitaires dont les Th17 eux-mêmes et des Th1 (Reboldi A, 2009).

Chez la souris, une injection d'IL-17 dans une articulation permet d'induire des symptômes équivalents, spécifiques de l'arthrite rhumatoïde: infiltrat massif de cellules immunitaires, érosion de l'os et dégradation du cartilage. En stimulant la production de protéinases de la matrice, l'IL-17 contribue à la destruction de la matrice extracellulaire et la résorption osseuse. Dans l'os, l'IL-17 stimule en effet l'expression de RANKL par les ostéoblastes, qui pourront ensuite activer les ostéoclastes exprimant RANK. Les souris déficientes pour l'IL-17 sont, ainsi, résistantes au développement de l'arthrite induite par injection de collagène (Nakae S, 2003). Dans les modèles murins d'arthrite rhumatoïde, les cellules de la membrane synoviale produisent la chimiokine CCL20 et les Th17/IL17-A<sup>+</sup> expriment majoritairement la molécule CCR6 qui est le récepteur de cette chimiokine. Une forte corrélation entre la production de CCL20 et les taux d'IL-17 dans le liquide synovial issus des articulations des souris et des patients atteints de la maladie a été observée ; le traitement des souris par des anticorps dirigés contre CCR6 inhibe le développement de la maladie (Hirota K, 2007). Ces données démontrent que le recrutement des cellules Th17/IL-17A<sup>+</sup>/CCR6<sup>+</sup> au niveau du site inflammatoire se fait par l'intermédiaire de la chimiokine CCL20 produite dans le microenvironnement pathologique. Au final, le récepteur CCR6 est essentiel à la fonction des cellules Th17, et représente un marqueur membranaire utile pour l'identification des Th17 en association avec d'autres molécules.

Dans le psoriasis, la principale population de lymphocytes T qui peut être isolée des lésions de la peau des patients présente un phénotype Th17 (Pene J, 2008), attirés *via* l'axe de signalisation CCL20-CCR6 ; une forte expression des cytokines IL-17A et IL-22 reflétant la présence des Th17 a également été montrée. Dans cette maladie, l'IL-22 présente un rôle pathogène plus important que l'IL-17, néanmoins, des essais cliniques utilisant des anticorps monoclonaux anti-IL-17 ont montré des effets bénéfiques pour les patients (Miossec P, 2009).

Les Th17 interviennent également dans la maladie de Crohn. Cette pathologie était initialement associée aux cellules Th1 car les patients présentaient une augmentation de la production d'IL-12 et d'IFN- $\gamma$  au niveau de la muqueuse gastrique ou des cellules de la paroi intestinale (Parronchi P, 1997, Berrebi D, 1998). Différentes prédispositions génétiques ont été décrites pour la maladie de Crohn, et une forte association avec une mutation du gène codant pour une sous-unité de l'IL-23R, protégeant de la maladie, a également été montrée (Duerr RH, 2006, Barrett JC, 2008). 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- $\gamma$  ont été identifiées au niveau du site inflammatoire, ce qui confirme que l'IFN- $\gamma$  peut contribuer aux fonctions inflammatoires et pathogènes des cellules Th17 (Annunziato F, 2007, Brand S, 2009).

La figure I16 donne une vue d'ensemble de l'implication des Th17 dans diverses pathologies auto-immunes et inflammatoires chroniques.



**Fig.I 16. IL-17 et son implication dans diverses pathologies auto-immunes et inflammatoires chroniques (Miossec P, 2009).**

La BPCO est une maladie dont le principal facteur étiologique est le tabagisme. L'exposition à la fumée de cigarette est à l'origine d'une réponse inflammatoire chronique pouvant conduire à une destruction des tissus alvéolaires pulmonaires ou emphysème. Cette inflammation est caractérisée par une infiltration des tissus pulmonaires (parenchyme, artères ou bronches périphériques) par des macrophages et des neutrophiles, mais aussi par différentes sous-populations de lymphocytes T et B. Des études montrent une augmentation de la production d'IL-17 par des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> dans des échantillons de prélèvements sanguins ou de biopsies pulmonaires ou de LBA issus de patients atteints de BPCO, dont le taux est directement corrélé 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 pulmonaires chez les patients atteints de BPCO confirment le rôle potentiel 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 lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs vers un phénotype Th17 (IL17-A<sup>+</sup>, CCR4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup>) (Shan M, 2009). De plus, nous ne pouvons pas exclure le rôle de la prostaglandine E2 (PGE2) produite par les fibroblastes de fumeurs avec ou sans BPCO (Dagouassat, M, 2013). En effet, il a été montré que la PGE2 contribue à la différenciation et aux fonctions proinflammatoires des lymphocytes Th17 (Boniface K, 2009, Kalinski P, 2012, Maseda D, 2015). 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<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup> dans le LBA et les tissus pulmonaires (Harrison OJ, 2008). Des niveaux élevés de CCL20 sont retrouvés dans les LBA de souris exposées chroniquement à la fumée de cigarette, et les souris déficientes pour le récepteur CCR6, et exposées à la fumée de cigarette, 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).

Enfin, les Th17 et l'IL-17 pourraient être impliqués dans l'asthme. L'asthme est une maladie inflammatoire chronique hétérogène. En effet, moins de 50% des cas d'asthme peuvent être associés à l'atopie et présentent une réponse inflammatoire de type Th2, typique de cette pathologie (Pearce N, 1999, Moustaki M 2010). Certaines formes d'asthme sont dites « éosinophiliques » et présentent une réponse de type Th2, tandis que d'autres formes peuvent être « neutrophiliques » et sont alors corrélées avec une forte réponse inflammatoire de type

Th17 (Roussel L, 2010). L'expression de l'acide ribonucléique messager (ARNm) codant pour l'IL-17 et de la cytokine sont particulièrement élevées dans les expectorations et le sérum des patients atteints d'asthme, et sont corrélées avec l'intensité de la maladie (Wong CK, 2001, Molet S, 2001). Dans des cas d'asthme sévère, les patients peuvent montrer un important infiltrat de neutrophiles dans les voies aériennes, conséquence du recrutement de ces cellules par les Th17 et leur forte production d'IL-17 (Linden A, 2001, Al Ramli W, 2009).

## **(2) Th17 et cancers**

La présence de Th17 infiltrés dans les tumeurs solides a bien été notée chez l'homme et la souris (mélanome, cancer du sein, du colon, de la prostate, du pancréas, des ovaires, du rein, mycosis fungoïde, lymphomes T cutanés...) (Ciree A, 2004, revue dans Zou W, 2010) ; en comparaison avec des tissus sains, les cellules Th17 s'accumulent dans les tissus tumoraux, suggérant un recrutement spécifique de ces cellules par le microenvironnement tumoral. Une forte densité de Th17 infiltrant la tumeur est un facteur de mauvais pronostic des carcinomes hépatocellulaires, des cancers colorectaux et des carcinomes pancréatiques (Zhang JP, 2009, Kesslerling R, 2010, He, S, 2011). Mais il n'existe encore aucun consensus concernant le rôle des Th17 dans le cancer, qui peut être anti-tumoral ou pro-tumoral selon le type de tumeur.

D'une part, de nombreuses études ont montré que les Th17 infiltrant les tumeurs peuvent avoir un rôle pro-tumoral en induisant l'angiogénèse, en exerçant une activité immunosuppressive, en inhibant l'apoptose des cellules tumorales et en facilitant la formation de métastases. L'IL-17 n'a pas d'effet direct sur la croissance des cellules endothéliales vasculaires, mais pourrait faciliter l'angiogénèse *via* l'augmentation de la production de VEGF (Vascular endothelial growth factor) par les cellules tumorales (Numasaki M, 2003). Les cellules tumorales et les fibroblastes dérivés de la tumeur sécrètent MCP-1 et RANTES qui interviennent dans le recrutement des Th17 (Su X, 2010). Dans le stroma péri-tumoral des carcinomes hépatocellulaires, les monocytes et macrophages présents sécrètent des cytokines agissant positivement sur l'expansion des cellules Th17 telles que IL-1 $\beta$ , IL-6 et IL-23 (Kuang DM, 2010).

D'autre part, les Th17 peuvent avoir un rôle antitumoral soit en activant les cellules T CD8<sup>+</sup> et NK, soit en se transformant en cellules « Th1 like » productrices d'IFN- $\gamma$ . Chez les patientes atteintes de carcinome ovarien, la survie est positivement corrélée à une forte densité de cellules Th17 dans les ascites associés à la tumeur (Kryczek I, 2009).

#### 4. Les lymphocytes T régulateurs.

Les lymphocytes T régulateurs (Tregs) jouent un rôle central dans le contrôle de la tolérance immunitaire et de l'homéostasie du système immunitaire, en prévenant le développement de pathologies auto-immunes et en limitant les maladies inflammatoires chroniques.

On décrit plusieurs types de Tregs :

##### (1) Les lymphocytes T régulateurs naturels (nTregs).

Les Tregs naturels, ou nTregs, sont originaires du thymus, où ils sont sélectionnés en fonction de leur capacité à reconnaître les antigènes du soi, et se distinguent de ceux induits en périphérie ou iTregs. Chez l'homme, les nTregs représentent 5 à 10 % des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> dans le sang périphérique, dont environ 2% sont constitués par les populations nTregs naïves (Seddiki N, 2006). Les nTregs ne peuvent pas être identifiés de manière fiable au moyen de marqueurs de surface spécifiques. Cependant, ils expriment de façon constitutive à l'état basal CD25, la sous-unité  $\alpha$  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 nTregs 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 Tregs, 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<sup>+</sup>, ce qui induit un syndrome lymphoprolifératif (Sadlack B, 1993, Setoguchi R, 2005).

Foxp3 est le facteur de transcription clé dans le développement et la fonction des Tregs (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 suppressive des Tregs (Gambineri E, 2003, Zheng Y, 2007, Bacchetta R, 2007). 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 Tregs de manière spécifique. De nombreux marqueurs de surface ont également été proposés par différents groupes afin de mieux discriminer les Tregs des T conv tels que GITR (glucocorticoid-induced TNFR-related protein), 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 Tregs.

Les Tregs  $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$  expriment peu ou faiblement CD127, la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-7, une cytokine produite localement sur le site de l'inflammation assurant une survie ainsi qu'une prolifération accrue des Th. 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  $TCD4^+CD25^{high}$ . Les T conventionnels activés ( $CD25^+$ ) ou non activés ( $CD25^-$ ) sont  $CD127^{high}$ . Chez l'homme, la proportion de lymphocytes  $CD4^+CD25^{high}CD127^{-/low}$  représente 5 à 10% des lymphocytes T  $CD4^+$  périphériques totaux chez un donneur sain (Seddiki N, 2006, Liu W, 2006). L'absence relative de CD127 sur les Tregs est donc un très bon marqueur de surface permettant, d'identifier et d'isoler cette population 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. Les nTregs se subdiviseraient en 3 sous classes : Tregs naïfs comme  $CD25^{high} CD45RA^+ FOXP3^{high}$ , les Tregs 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). De plus, les nTreg expriment le facteur de transcription Helios (Lin X, 2013).

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 lymphocytes T effecteurs et des cellules de l'immunité innée (cellule dendritique/DC, NK). D'autres cellules régulatrices sont générées *de novo* en périphérie, les Treg induits.

## **(2) Les lymphocytes T régulateurs induits (iTregs)**

La génération des iTregs à partir des lymphocytes T conventionnels naïfs Th0 a déjà été abordée dans la partie III.B.3.e)(2). Ces iTregs sont plus souvent retrouvés au niveau des sites inflammatoires. Ces cellules ont les mêmes caractéristiques que les nTregs sur le plan de l'expression de marqueurs membranaires et intracellulaires, et de l'inhibition des réponses

immunes T effectrices. Ils se distinguent des nTregs par la méthylation incomplète du gène Foxp3 et leur manque d'expression de la protéine Helios (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 sont induits lors d'expériences de culture cellulaire *in vitro*, suite à une stimulation antigénique chronique en présence de fortes doses d'IL-10. Ces iTregs de type1, ne possèdent pas de marqueur spécifique y compris FOXP3, et sont identifiés au moyen d'un profil cytokinique particulier (IL-10<sup>+</sup>, IL-4<sup>-</sup>, TGF-β<sup>+</sup>, IL-5<sup>+</sup>, IL-2<sup>low</sup> /- et IFNγ<sup>low/-</sup>). L'IL-10 et le TGF-β ne constituent pas à elles seules le mécanisme de suppression des Th par les Treg (Bettini ML, 2010).

### (3) Mécanismes de suppression des Tregs

Plusieurs études ont démontré l'implication des Tregs dans la suppression de l'activation, de la prolifération et/ou des fonctions effectrices des lymphocytes T (production des cytokines, cytotoxicité) de la lignée CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, 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 Tregs affecte aussi bien les cellules T naïves, effectrices que les lymphocytes T mémoires. La tolérance périphérique médiée par les Tregs ne se limite pas aux lymphocytes T, elle s'exerce sur les lymphocytes B (Lim HW, 2005), les cellules NK (Azuma T, 2003), et les CPA (DC) (Misra N, 2004).

Des progrès significatifs ont été réalisés et permettent aujourd'hui de mieux comprendre et décrire les molécules et mécanismes utilisés par les Tregs pour induire la suppression. Ces mécanismes peuvent être dirigés directement vers la cellule cible, ou agir indirectement sur les cellules dendritiques, et comprennent :

#### (a) Suppression par des cytokines ou des molécules sécrétées :

Les Tregs sécrètent des molécules immunosuppressives impliquées dans la fonction de suppression envers les lymphocytes T autoréactifs :

- L'IL-10 et le TGF- $\beta$  sont des cytokines aux propriétés anti-inflammatoires et immunosuppressives. L'IL-10 est également sécrétée par un sous-type de Treg, les Tr1, dont elle induit la différenciation. Des modèles murins déficients en IL-10 ont montré le rôle de la sécrétion d'IL-10 par les Tregs sur le développement de pathologies ayant une composante inflammatoire importante telles que la colite (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 (Kingsley CI, 2002).
- L'IL-35 cause l'arrêt du cycle cellulaire et l'inhibition de la production des cytokines pro-inflammatoires. L'IL-35 est sécrété mais nécessite l'établissement d'une synapse immunologique avec la cellule cible (Collison LW, 2009).
- La galectine-1 (Gal-1) est capable d'induire l'apoptose des cellules cibles exprimant ses ligands CD45, CD43 et CD7. Les Tregs de souris déficientes pour cette molécule ont une activité suppressive moindre *in vitro* en comparaison avec des Tregs issus de souris « sauvages » (Garín MI, 2007).
- La production d'AMP par les ectoenzymes CD39 et CD73. La liaison de l'adénosine au récepteur A2A des Tconv supprime leur prolifération *in vitro* et *in vivo* (Borsellino G, 2007)

(b) *Mécanismes nécessitant un contact cellulaire.*

Parallèlement aux mécanismes de suppression des cellules immunitaires autologues médiés *via* la sécrétion de facteurs solubles, il a également été montré que les Tregs sont capables d'induire une suppression de ces cellules par des mécanismes nécessitant un contact cellulaire :

- **Activité cytotoxique.** A l'instar des lymphocytes T cytotoxiques CD8<sup>+</sup> les Tregs naturels ou induits humains activés possèdent des granules remplies de molécules cytotoxiques dont les granzyme A et B et la perforine (Grossman WJ, 2004, Gondek DC, 2005). Cette activité est dirigée contre une large gamme de cellules cibles autologues (T CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, cellules dendritiques, lymphocytes B).
- **Suppression des cellules T effectrices *via* l'AMP cyclique (AMPc).** Lors d'une activation, chez la souris, les Tregs augmentent leur niveau intracellulaire d'AMPc, et vont ensuite le transférer, *in vitro* et *in vivo*, dans leurs cellules cibles *via* la formation de gap junctions (Bopp C, 2007, Fassbender M, 2010). Une fois transféré dans les cellules cibles, l'AMPc inhibe la prolifération et la différenciation, ainsi que la production d'IL-2.

- **Induction de l'apoptose des cellules cibles.** Les Tregs activés expriment TRAIL (Tumor necrosis factor Related Apoptosis Induced Ligand) et Fas-L. Ils sont ainsi capables d'induire l'apoptose de leur cellules cibles (Ren X, 2007 ; Strauss L, 2009).
- **Modulation de l'activation et du phénotype des cellules dendritiques.** Les Tregs diminuent les capacités de co-stimulation des DCs *via* la molécule CTLA-4 qui se fixe comme CD28 sur les molécules de co-stimulation CD80 et CD86, et provoque la diminution de l'expression de ces molécules à la surface des DCs. Cette diminution de l'expression des molécules CD80 et CD86 fait intervenir un mécanisme de trans-endocytose de ces molécules de la DCs vers le Treg, et diminue les capacités de co-stimulation des DCs (Qureshi OS, 2011).
- **Inhibition de la maturation des DCs et de la présentation des antigènes.** Les Tregs activés expriment la molécule LAG-3, une molécule homologue du récepteur CD4. LAG-3 possède une forte affinité pour les molécules du CMH de classe II, et sa fixation sur ces molécules augmente le temps d'interaction entre les DCs et les Tregs (Huang CT, 2004) avec pour effet d'inhiber la maturation des DCs et leur capacités d'immunostimulation (Liang B, 2008).
- **Diminution de la capacité de présentation des antigènes par les DCs.** Les Tregs activés expriment fortement la neuropilin-1 (Nrp-1) qui a pour effet de prolonger les interactions entre les Tregs et les cellules dendritiques immatures iDCs et confère aux Tregs, en comparaison avec les Th naïfs, une plus grande sensibilité à des quantités faibles d'antigènes présentées à la surface des DCs. Les Tregs possèdent donc un avantage sur les Th naïfs possédant une même spécificité antigénique, conduisant à une suppression par défaut de la réponse immunitaire en absence de signaux de danger (Sarris M, 2008).

*(c) Déplétion du microenvironnement des lymphocytes T conventionnels.*

Les Tregs peuvent également consommer des éléments essentiels à la prolifération des lymphocytes T conventionnels présents dans le microenvironnement de ces derniers :

- **Consommation de l'IL-2 par les Tregs.** Les Tregs sont caractérisés par leur très forte expression de la sous-unité  $\alpha$  du récepteur de haute affinité à l'IL-2, ou CD25, mais ne

produisent pas d'IL-2. Les Tregs sont donc dépendants de l'IL-2 produite par les lymphocytes T conventionnels et sont en compétition avec ces cellules. Leur forte expression de CD25 leur confère un avantage pour la consommation de l'IL-2 et peut priver les T conventionnels de l'IL-2 environnante empêchant leur prolifération (Oberle N, 2007). De plus, les lymphocytes T conventionnels privés d'IL-2 expriment Bim et rentrent en apoptose (Pandiyani P, 2007).

- **Consommation de la cystéine extracellulaire.** L'activation et la prolifération des cellules T, provoque un changement de l'équilibre redox, et nécessite un microenvironnement réducteur, créé par la CPA, notamment la DC. Lors d'une stimulation par les cellules T, les DCs augmentent leur absorption de cystine, la forme oxydée de la cystéine, et leur production et sécrétion, à partir de cette cystine, de cystéine extracellulaire. La cystéine est indispensable aux cellules T pour la synthèse de glutathion, qui procure à la cellule un pouvoir réducteur nécessaire pour la synthèse d'ADN et la progression dans le cycle cellulaire de la phase G1 à la phase S. Bien que la cystine extracellulaire soit relativement abondante, les cellules T naïves sont incapables de l'importer et reposent donc totalement sur les DCs pour la fourniture de cystéine nécessaire à leurs besoins (Yan Z, 2009 & 2010). Les Tregs perturbent la création du microenvironnement réducteur, en consommant la cystéine extracellulaire, avec pour conséquence une restriction de l'accès à la cystéine pour les cellules T naïves et une impossibilité pour ces cellules de synthétiser du glutathion (Yan Z, 2009 & 2010).

#### **IV. Rôle de la voie de signalisation des MAP kinases dans l'activation et la différenciation fonctionnelle des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Th et régulation par les ERO.**

Dans la partie précédente de cette synthèse bibliographique, j'ai décrit les conditions du microenvironnement cytokinique des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïves matures qui régulent leur différenciation fonctionnelle en Th1, Th2, Th17 ou Tregs. Récemment, un nombre plus restreint d'études a montré que les voies de signalisation communes aux différentes sous-classes fonctionnelles de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> pouvaient, elles aussi, contribuer à la spécificité de la différenciation fonctionnelle des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïves. Au cours des travaux de recherche qui font l'objet de cette thèse, je me suis plus particulièrement intéressés à la voie des MAPKs ERK1/2 dont le seuil et la dynamique d'activation contribuent au maintien de la quiescence cellulaire et à la régulation de la nature et/ou de l'amplitude de la réponse dans différents types cellulaires y compris les lymphocytes T.

##### **A. Stimulation homéostasique du TCR et voies de signalisation des MAP kinases dans les lymphocytes T quiescents.**

Les systèmes de transduction du signal impliquant des récepteurs membranaires, comme le TCR, en absence de stimulation, subissent continuellement des interactions indépendantes du ligand à l'origine d'une activation constitutive mais de faible intensité (Roose JP, 2003). Ce niveau basal d'activité d'une voie de transduction du signal est le résultat d'un équilibre entre des signaux positifs et négatifs, et peut varier d'un type cellulaire à un autre (Iwamoto N, 2016). La survie des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mémoires quiescents périphériques implique des interactions permanentes entre le TCR de ces cellules et des complexes CMH/peptide du soi dans les organes lymphoïdes secondaires ou les tissus (Sallusto F, 1999, Martin B, 2006, Freitas AA, 2009). Dans les cellules quiescentes, les voies de signalisation activées en réponse à une stimulation du TCR ne sont donc pas inertes. Les lymphocytes T périphériques isolés à partir des ganglions lymphatiques montrent une phosphorylation basale de TCR $\zeta$  et une association entre ZAP-70 (Zeta Chain Of T Cell Receptor Associated Protein Kinase 70kDa) et TCR $\zeta$  (van Oers NS, 1994). La conséquence de cette association implique la kinase Src, la présence de LAT (Linker of Activated T cells)-SLP-76 (SH2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa) et l'activité enzymatique de PLC $\gamma$ 1 (Phospholipase C), PKC, MEK-1 (mitogen activated

and extracellular regulated kinase kinase) et la calcineurine (voir paragraphe suivant et Fig. I17) et résulte en une activité basale de ERK1/2 (Markegard E, 2011). L'activité de ERK dépend des mécanismes responsables de sa phosphorylation, de sa déphosphorylation et de sa localisation. Ces mécanismes seront détaillés dans le point C ci-après dans ce document. MEK1/2 catalyse la phosphorylation de ERK1/2 à la fois sur ses résidus Tyrosine 204/187 et Thréonine 202/185 (Roskoski R, 2012). ERK1/2 existe sous sa forme active « double phosphorylée » ou sous la forme d'intermédiaires « mono phosphorylés ». Selon les types cellulaires, la dynamique et la distribution des différentes formes phosphorylées de ERK1/2 pourraient permettre de définir des seuils d'activation différents (Iwamoto N, 2016).

## **B. Rôle de la voie de signalisation des MAP kinases dans l'activation et la différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Th.**

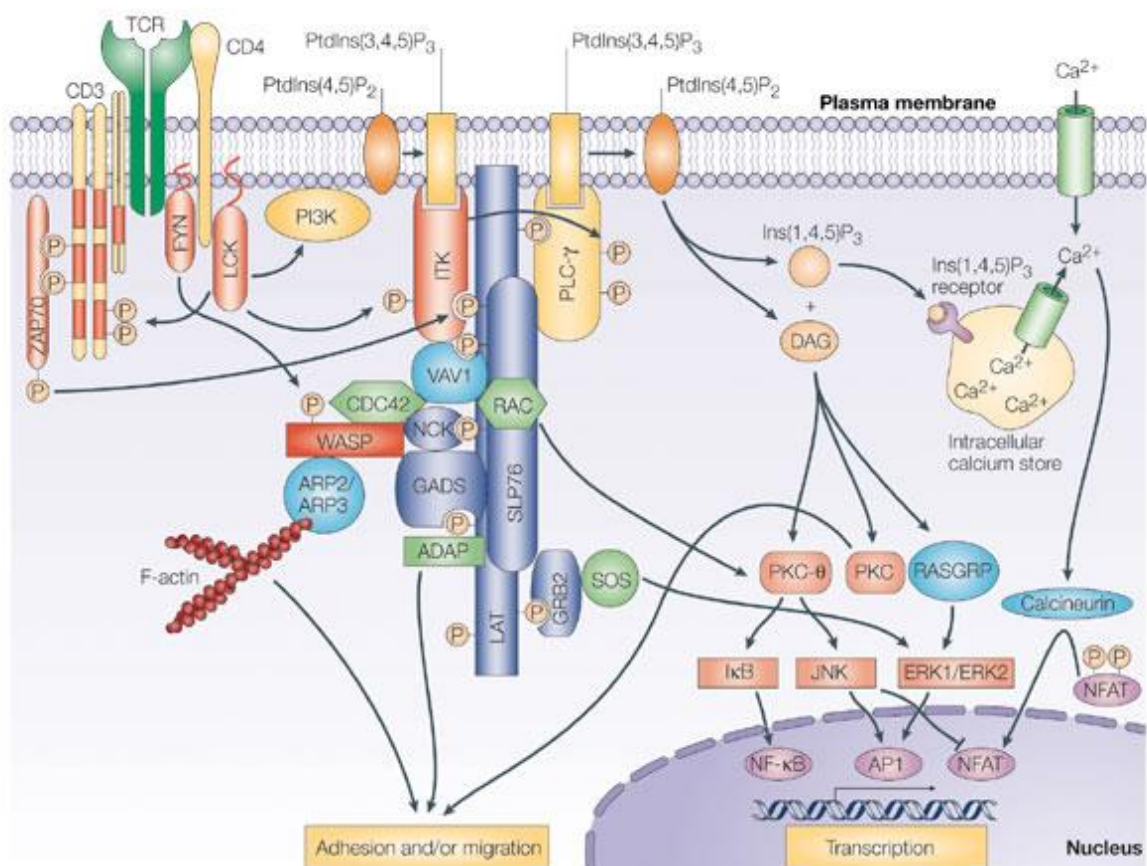
L'environnement cytokinique et la présence de différentes molécules co-stimulatrices participent à la détermination du phénotype fonctionnel des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. D'autres mécanismes sont néanmoins impliqués dans la détermination de l'expression de cytokines par les lymphocytes Th, dont la régulation du cycle cellulaire.

Les cellules T CD4<sup>+</sup> matures naïves sont bloquées spontanément dans le cycle cellulaire en phase Go/G1 et peuvent demeurer quiescentes pendant de longues périodes jusqu'à ce qu'elles soient exposées à leur antigène spécifique ou à des mitogènes. La rencontre d'un antigène spécifique ou d'un mitogène provoque une cascade d'événements capable d'induire l'entrée des cellules dans le cycle cellulaire, la prolifération et la différenciation fonctionnelle.

Une stimulation du TCR par le complexe antigène-CMH II (Fig. I17) induit la phosphorylation des motifs ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) du complexe CD3 par les kinases de la famille Src, p56 Lck et p59 Fyn. La phosphorylation de ces motifs ITAM induit le recrutement de la protéine tyrosine kinase ZAP-70. Le recrutement de ZAP-70 induit son activation par phosphorylation (Palacios E, 2004, Mustelin T 2003). Une fois activée ZAP-70 est capable de phosphoryler de nombreuses protéines dont les protéines adaptatrices LAT, GADS (Grb2-related adaptor downstream of Shc) et SLP-76 (Horesji V, 2004, Wu J, 2004) capables de s'organiser sous la forme d'un « radeau lipidique » dans la bi-couche lipidique membranaire formant ainsi un « signalosome ». Ce « signalosome » induit ensuite le recrutement et l'activation de la PLC- $\gamma$ 1 (phospholipase C) qui déclenche l'activation de

différentes voies de signalisation : la voie de la PKC (protéine kinase C) qui induit l'activation et la translocation nucléaire du facteur de transcription NF- $\kappa$ B, en parallèle de l'activation de la voie de Ras qui aboutit à l'activation du facteur de transcription AP1, et la génération d'IP<sub>3</sub> (inositol 1,4,5-triphosphate) suivie d'une élévation de la concentration intracellulaire de calcium qui aboutit à l'activation et la translocation nucléaire du facteur de transcription NFAT, (Marshall C, 1995).

L'activation de Ras dans les lymphocytes est catalysée à la fois par RasGRP (Ras-guanine nucleotide-releasing protein) et par l'inhibition de protéines activatrices des Ras-GTPases médiée par la PKC ; les formes actives de Ras couplées au GTP se lient et provoquent l'activation de la kinase Raf-1. Raf-1 va activer par phosphorylation les MAP kinases/ERK kinases, MEK1 et MEK2, qui vont ensuite activer par phosphorylation les kinases ERK1/2. Une fois activées ERK1/2 vont phosphoryler et réguler l'activité de nombreuses protéines dans le cytoplasme et le noyau (Whitehurst A, 1996).



**Fig.I 17. Vue schématique de la voie de signalisation du TCR (Schwartzberg PL, 2005).**

Au total, dans les lymphocytes T, une des fonctions de la voie de transduction Ras/Raf-1/MEK/ERK est de contribuer à la transmission vers l'intérieur de la cellule des signaux reçus à la membrane par le complexe TCR/CD3.

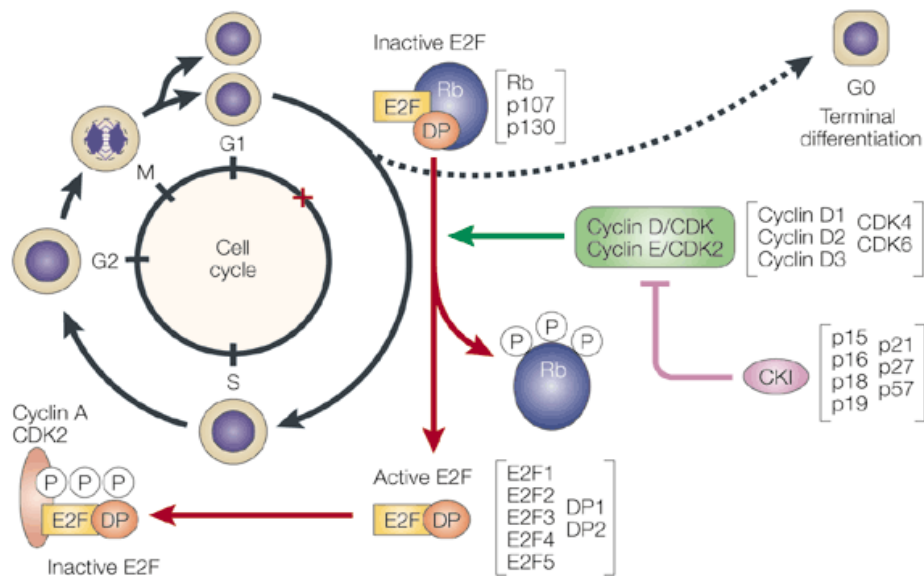
### **C. Rôle de ERK1/2 dans la prolifération des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>**

ERK1/2 possède des cibles de phosphorylation à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau. Dans le noyau, ERK1/2 régule la transcription de nombreux gènes impliqués dans la réponse immédiate précoce lors de l'activation du TCR. Un des préalables pour l'induction de l'expression de certains de ces gènes cibles tels que c-Fos et EGR1, est la translocation nucléaire d'ERK1/2 (Ebisuya M, 2005). Dans les lymphocytes T, la capacité d'ERK1/2 à phosphoryler différents facteurs de transcription nucléaires tels que Elk-1 en réponse à des stimuli mitogéniques, est dépendante de sa localisation et joue un rôle dans la progression dans le cycle cellulaire (Whitehurst A, 2004). Une fois phosphorylé, Elk-1 est capable de se lier au promoteur du facteur de transcription c-Fos et d'en induire l'expression. c-Fos est capable de « dimériser » avec un facteur de transcription de la famille Jun, afin de former le complexe AP-1 (Koike T, 2003, Krueger J, 2005). Le complexe AP-1 est ensuite capable de réguler l'expression de nombreux gènes cibles dont des cyclines contribuant à la transition G1/S du cycle cellulaire.

Par ailleurs, une activité initiale robuste, suivie d'une activité modérée et soutenue de ERK1/2 permet d'induire l'expression de la cycline D et de la cycline E, suivie de l'accumulation de complexes cyclines/CDKs (kinases dépendantes des cyclines) actifs pour la progression en phase S du cycle cellulaire. Il a également été décrit qu'une activité élevée de ERK1/2 provoque l'accumulation de p21<sup>CDKN1A</sup>, un inhibiteur du complexe cycline E/cdk2, à la fois par des mécanismes transcriptionnels et post-traductionnels. Cette accumulation de p21<sup>CDKN1A</sup> a pour effet de provoquer un arrêt du cycle cellulaire (Ebisuya M, 2005). Une activité élevée de ERK1/2 a également pour effet d'induire l'expression de l'inhibiteur du complexe cycline D/cdk4-6 p16<sup>INK4a</sup> qui contribue lui aussi à l'arrêt du cycle cellulaire (Malumbres M, 2000, Han J, 2005).

La progression dans le cycle cellulaire consécutive à l'activation d'un lymphocyte T est un mécanisme complexe régulé par différents complexes protéiques associant des cyclines et des CDKs (Fig. I18). Chaque phase du cycle cellulaire est dépendante de complexes enzymatiques cycline/CDK différents et de la phosphorylation de leurs substrats respectifs. L'un de ces substrats est la protéine du rétinoblastome (Rb). La phosphorylation séquentielle de la protéine Rb par le complexe cycline D/CDK4-6, puis par le complexe cycline E/CDK2 provoque la fin

de son interaction avec les facteurs de transcription de type E2F, et l'activation de la transcription des gènes de phase S (Meloche, S, 2007).



**Fig.I 18. Vue d'ensemble du cycle cellulaire (Dyer MA, 2001).**

Dans les lymphocytes T, plusieurs mécanismes ont été proposés pour tenter d'expliquer comment la voie ERK1/2 intervient dans la régulation de la progression dans la phase G1 du cycle cellulaire. De nombreux travaux ont montré une forte corrélation entre l'activation de ERK1/2 et l'accumulation de cyclines en phase G1 du cycle. Il a notamment été démontré que la voie de signalisation ERK1/2 est à la fois nécessaire et suffisante pour induire la transcription du gène codant pour la cycline D1 (Meloche S, 2007).

#### **D. Rôle de ERK1/2 dans la différenciation fonctionnelle des Th1/2/17.**

En réponse à une activation du TCR par un complexe peptide-CMH approprié présenté par une CPA, et en présence d'un environnement cytokinique approprié, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs peuvent se différencier en au moins 4 lignées de lymphocytes effecteurs : Th1, Th2, Th17 et en lymphocytes T régulateurs induits (iTregs) (voir paragraphe III B). La progression dans le cycle cellulaire et la réplication de l'ADN, l'environnement cytokinique et la nature de la costimulation jouent un rôle important dans la différenciation fonctionnelle des lymphocytes T

CD4<sup>+</sup>. Parallèlement, différentes voies de signalisation en aval du TCR, telles que NFAT et AP-1 sont impliquées dans la détermination de l'expression des cytokines par les lymphocytes Th (Rooney JW, 1995). En particulier, la voie de signalisation ERK1/2 est impliquée dans la polarisation fonctionnelle des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Il a été montré que la différenciation des lymphocytes Th1 est inhibée par la voie ERK1/2 (Agrawal A, 2006), et est modulée de manière positive par les MAPKs p38<sup>MAPK</sup> et JNK (c-Jun N-terminal kinase) (Singh RA, 2004). En revanche, la différenciation Th2 est régulée de manière positive par ERK1/2 (Yamashita M, 2005, Yamane H, 2005, Goplen N, 2012, Chang CF, 2012). Il a de plus été montré que la voie de signalisation MEK/ERK1/2 intervient dans la régulation de la différenciation des Th17. Toutefois, deux études ont montré des résultats contradictoires et ne permettent pas de conclure à un rôle positif ou négatif de la voie ERK1/2 sur la différenciation des Th17 (Tan AH, 2010, Liu H, 2013). Notre travail sur un modèle murin déficient pour la protéine PEA-15 (Phosphoprotein Enriched in Astrocytes) a montré que la différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs de ces animaux en réponse à une stimulation du TCR induit un défaut de la production d'IL-2 et d'IL-4, associé à une compartimentalisation nucléaire anormale des formes activées de ERK1/2 dans ces cellules. Ce défaut de production d'IL-2 et d'IL-4 pourrait contribuer à l'expression plus importante dans ces lymphocytes de l'IL-17A et de l'IL4I1 par rapport aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> des animaux sauvages (Kerbrat S, 2015). Il a en effet été montré que l'IL-2 inhibe la différenciation des lymphocytes Th17 et que l'IL-4 régule négativement la production d'IL-17A (Park H, 2005, Laurence A, 2007, Gomez-Rodriguez J, 2014). Nos résultats suggèrent donc qu'une altération de la voie ERK1/2 pourrait intervenir positivement dans la différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Th17. Enfin, il a également été montré que dans l'induction des Tregs l'expression de FOXP3 induite par le TGF-β nécessite une inactivation de la voie ERK1/2 (Luo X, 2008, Mor A, 2008).

## **E. Régulation de l'activité ERK1/2**

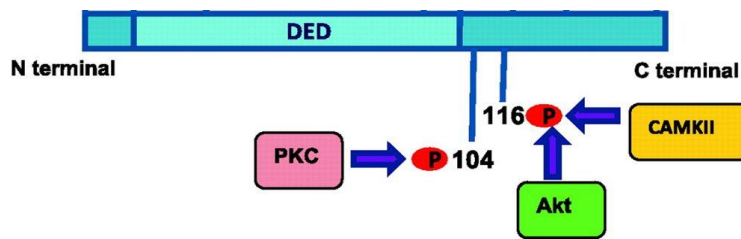
### **1. Régulation de l'activité ERK1/2 par compartimentalisation sub-cellulaire.**

La compartimentalisation sub-cellulaire est un mode de régulation de la fonction des protéines, notamment des protéines des voies de transduction du signal impliquées dans la réponse précoce. La navette nucléocytoplasmique ne requiert en général pas de nouvelle synthèse

protéique et représente donc un mécanisme courant de régulation de l'activité de telles protéines. ERK1/2 font partie des nombreuses protéines impliquées dans la réponse immédiate précoce à une stimulation du TCR des lymphocytes T, qui sont régulées de cette manière (Le Gallic L, 2004).

Plusieurs mécanismes peuvent être impliqués dans la régulation du transport nucléocytoplasmique. Les changements de conformation d'une protéine provoqués par des modifications post-transcriptionnelles peuvent permettre de masquer ou au contraire de dévoiler un signal de localisation nucléaire (NLS) et/ou un signal d'export nucléaire (NES) et contribuer à cette régulation. L'association avec une autre protéine capable d'assurer le transport, *via* les pores nucléaires, est également un mécanisme permettant de réguler la localisation des protéines ne possédant pas de signaux d'import ou d'export nucléaire (Le Gallic L, 2004).

L'adaptateur protéique PEA-15 a été décrit comme régulateur de la compartimentalisation de ERK1/2. L'article joint en annexe de ce document, dont les résultats ont constitué mon travail de recherche pour l'obtention du M2 « Biologie moléculaire et cellulaire, spécialité immunologie, parcours « Immunotechnologies et biothérapies » « filière recherche », montre l'impact de cet adaptateur dans la différenciation fonctionnelle des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> en rapport avec ERK1/2. En résumé, PEA-15 est une protéine de 15 kDa identifiée à l'origine en tant que protéine phosphorylée majoritaire dans les astrocytes en réponse à un traitement par le phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) (Araujo H, 1993). La séquence d'acides aminés de PEA-15 est très conservée entre l'homme et la souris (96% d'homologie), et PEA-15 est exprimée dans tous les tissus. Cette protéine est composée d'un DED (Death Effector Domain) N-terminal et d'un domaine C-terminal contenant un site de phosphorylation par la Protéine kinase C (PKC, Ser<sup>104</sup>) et par la Calcium/calmoduline kinase (CamKII) ou la kinase Akt (Ser<sup>116</sup>) (Araujo H, 1993). De plus, PEA-15 comporte une séquence d'export nucléaire (NES) favorisant sa localisation cytoplasmique (Formstecher, E, 2001) (Fig.I19).



**Fig.I 19. Structure de la protéine PEA-15.**

*La protéine PEA-15 est composée d'un DED (Death Effector Domain) N-terminal et d'un domaine C-terminal contenant un site de phosphorylation par la Protéine kinase C (PKC, Ser<sup>104</sup>) et par la CamKII ou la kinase Akt (Ser<sup>116</sup>) (Fiory F, 2009).*

PEA-15 n'a pas de fonction enzymatique intrinsèque et intervient en tant que protéine adaptatrice. Les travaux initiaux ont montré que PEA-15 favorise la survie cellulaire en interférant avec la voie extrinsèque d'apoptose, notamment dans les astrocytes (Condorelli G, 1999, Renganathan H, 2005). Ensuite, PEA-15 a été décrit comme étant capable de se lier à ERK1/2, et régulant sa compartimentalisation sub-cellulaire (Formstecher E, 2001, Fiory F, 2009, Pastorino S, 2010, Mace PD, 2013).

La voie de signalisation ERK1/2 peut induire des programmes fonctionnels différents selon le type cellulaire, et en fonction de la force ou de la durée de sa stimulation. Une activation prolongée de la voie ERK1/2 peut provoquer un arrêt de la croissance cellulaire et la différenciation. Une activation de courte durée peut induire une prolifération cellulaire (Gaumont-Leclerc M.F, 2004, Murphy L, 2002, Schade A, 2004). Nos résultats obtenus sur le modèle murin déficient pour PEA-15 montrent que son absence, associée à une localisation nucléaire anormale des formes activées de ERK1/2, peut induire un défaut de la production d'IL-2 et d'IL-4 (Kerbrat S, 2015). La re-localisation de ERK1/2 dans le cytoplasme par PEA-15 en modulant son activité transcriptionnelle, provoque des changements dans le programme génomique des lymphocytes T en réponse à une activation du TCR, et représente un point de contrôle dans la prolifération cellulaire et la différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Th dépendante du cycle cellulaire.

## 2. Régulation de la phosphorylation de ERK1/2 par les ERO.

Classiquement MEK1/2 catalyse la phosphorylation de ERK1/2 (Roskoski R, 2012). Mais le principal moyen de régulation de l'activité de ERK1/2 est leur déphosphorylation. L'activation des MAPKs est aussi une cible commune des ERO d'origine endogènes, mais aussi exogènes

(Guyton KZ, 1996). Des travaux effectués sur des cellules Jurkat, une lignée de lymphocytes T humain, suggère que l'addition de  $H_2O_2$  permet d'induire la phosphorylation des MAPKs (Griffith CE, 1998, Lee K, 2002). Parallèlement à l'activation de ERK1/2, l' $H_2O_2$  peut moduler la transduction du signal en inactivant des protéines phosphatases. Les phosphotyrosines phosphatases (PTPs) sont des cibles de  $H_2O_2$  qui réagit avec les résidus cystéines situés dans le site catalytique de ces phosphatases (Finkel T, 1998). L' $H_2O_2$  peut donc inhiber la déphosphorylation de ERK1/2.

Plus que la phosphorylation de ERK1/2, c'est sa déphosphorylation par les phosphatases qui permet de contrôler la durée et l'amplitude de l'activation de ERK1/2 lors d'une stimulation du TCR (Zhang Y, 2004, Zhao Q, 2006).

La phosphorylation de ERK1/2 à la fois sur ses résidus Tyrosine 204/187 et Thréonine 202/185 est nécessaire pour permettre son activation. De fait, la déphosphorylation d'un seul de ces résidus est suffisante pour inactiver ERK1/2. Les protéines phosphatases jouent un rôle important en exerçant à différents niveaux une régulation négative de la voie de signalisation Ras/Raf/ERK. Les PTPs ciblent les récepteurs à domaine tyrosine kinase, tandis que les phosphoserine/phosphothréonine phosphatases ciblent les protéines adaptatrices Shc et MEK1/2. Les DUSP (Dual Specificity phosphatases) sont capables de déphosphoryler aussi bien les résidus thréonine et tyrosine (Cagnol S, 2009). Ces phosphatases sont donc toutes capables d'inactiver ERK1/2. Ces phosphatases peuvent être situées dans le cytoplasme ou le noyau. Les phosphatases DUSP5 et 6 semblent être les plus spécifiques de ERK1/2. DUSP6 est capable de transloquer vers le noyau mais est essentiellement localisée dans le cytoplasme grâce à un domaine d'export nucléaire. DUSP6 fait l'objet d'une régulation complexe par ERK1/2, dans le cadre d'une boucle de rétrocontrôle négatif, à plusieurs niveaux, transcriptionnel, post-transcriptionnel et post-traductionnel (Zhang, Z, 2010). DUSP5 est une phosphatase nucléaire dont l'expression est induite par l'activation de la voie MAPK (Kucharska, A, 2009). DUSP5 et DUSP6 sont donc activées par la voie MAPK et déphosphorylent ERK1/2 dans le cadre d'une boucle de rétrocontrôle négatif. Par la suite les deux phosphatases sont dégradées par le protéasome. Au final, l'intensité et la durée de l'activité de ERK1/2 sont déterminées par un équilibre entre l'activité des kinases et celle des phosphatases inhibitrices.

La stimulation par un anticorps anti-CD3 du TCR des cellules Jurkat, une lignée cellulaire T d'origine humaine, ou des blastes T primaires humains, a pour conséquence l'activation rapide de ERK1/2 et la production par la voie de signalisation du TCR à la fois d' $O_2^{\bullet-}$  et d' $H_2O_2$  (Devadas S, 2002, Kwon J, 2003). Cette production d' $H_2O_2$  est nécessaire pour l'activation des MAPKs, et notamment ERK1/2, l'expression de gènes et la prolifération cellulaire (Devadas S,

2002). L'utilisation d'antioxydants pharmacologiques tels que la NAC (N-acétyl Cystéine) capables de piéger l' $\text{H}_2\text{O}_2$ , ou la surexpression de la peroxydase dépendante de la thiorédoxine, la peroxyrédoxine II, induit une augmentation de la phosphorylation TCR dépendante de MEK et de ERK1/2. Ceci suggère que la production rapide d' $\text{H}_2\text{O}_2$  permet un rétrocontrôle négatif de la phosphorylation de ERK1/2 (Kwon J, 2003).

## **F. ERO et activation des lymphocytes.**

Les ERO sont impliquées dans la modulation de nombreuses fonctions cellulaires. De faibles concentrations d'ERO conduisent à un défaut de stimulation du TCR et de la prolifération. Des concentrations optimales d'ERO peuvent avoir un effet positif sur la prolifération et l'activation des lymphocytes, et des taux trop importants d'ERO peuvent inhiber la croissance cellulaire ou induire l'apoptose ou la nécrose des lymphocytes (revue dans Kesarwani P, 2013). Le travail de Devadas S et coll a montré que la stimulation du TCR induit une production rapide d'ERO, majoritairement de l' $\text{O}_2^{\bullet-}$  et de l' $\text{H}_2\text{O}_2$ , et cette production est nécessaire pour l'activation des MAPKs, et notamment ERK1/2, l'expression de gènes et la prolifération cellulaire (Devadas S, 2002). La production de cytokine des différentes sous-populations de lymphocytes T  $\text{CD4}^+$  peut être affectée par les ERO. Des études *in vitro* d'activation et de production de cytokines ont montré qu'en présence de faibles concentrations d' $\text{H}_2\text{O}_2$  des clones Th1 produisent moins d'IFN $\gamma$  et les clones Th2 produisent plus d'IL-4 (Frossi B, 2008).

Les données de la littérature rapportent que dans les lymphocytes T la production d'ERO en réponse à une stimulation du TCR est le fait des NOX (Jackson SH, 2004), mais aussi de la chaîne respiratoire mitochondriale et du métabolisme des enzymes cellulaires (voir paragraphe II. C. b)) (revue dans Belikov AV, 2015).

Un rôle des NOX et de l' $\text{O}_2^{\bullet-}$  dans la modulation des réponses Th17 et Th1 a été montré à l'aide d'un modèle animal déficient pour les NOX. En réponse à une stimulation par des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 les lymphocytes T  $\text{CD4}^+$  des animaux déficients pour les NOX montrent une production de cytokine de type Th17 alors que les lymphocytes des animaux « sauvages » ont un profil cytokinique de type Th1 (Tse HM, 2010). Une autre étude a montré un rôle de DUOX1 dans la production d' $\text{H}_2\text{O}_2$  en réponse à une stimulation du TCR (Kwon J, 2010).

Des données existent sur le rôle d'une augmentation de la production d'ERO mitochondriales dans l'activation des lymphocytes T  $\text{CD4}^+$  en réponse à une stimulation par des anticorps anti-CD3 et CD28. Ces données montrent le rôle essentiel de ces ERO dans la signalisation cellulaire

en aval de la stimulation du TCR et la production d'IL-2 et d'IL-4. Le travail de Kaminski et coll a montré que l'inhibition de la production d'ERO mitochondriales par un inhibiteur du complexe I de la chaîne respiratoire inhibe l'activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Kaminski MM, 2007, 2010 & 2012). Le travail de Sena LA et coll a lui démontré à l'aide de modèles animaux de délétion conditionnelle du gène *Uqcrcs1* codant pour une sous-unité du complexe III, la protéine RISP (Rieske proteins are iron-sulfur protein), que lors d'une activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> par des anticorps anti-CD3 et CD28, cette production d'ERO est majoritairement dérivée du complexe III (Sena LA, 2013).

L'activité de ERK1/2 est augmentée après l'exposition des cellules à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Devadas S, 2002). Dans le lymphocyte T CD4<sup>+</sup> l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> responsable de cette activation pourrait provenir de la mitochondrie. Une chaîne de transport électronique mitochondriale intacte est d'ailleurs nécessaire pour phosphoryler ERK1/2 dans des conditions de stress oxydant, et la phosphorylation de ERK1/2 est moindre dans des cellules traitées par de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en présence d'inhibiteurs de la chaîne électronique mitochondriale (Bogoyevitch MA, 2000).

De même dans la lignée cellulaire T Jurkat, les cellules traitées par le FCCP présentent une diminution d'ERO mitochondriales (Josse C, 1998, Tirosh O, 2003). La baisse corrélée de la production d'ERO mitochondriales et de la phosphorylation de ERK1/2 dans cellules Jurkat traitées par des inhibiteurs mitochondriaux ou des agents découplants de la chaîne électronique mitochondriale, même en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exogène, est consistante avec une contribution majeure de la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mitochondriale dans la phosphorylation de ERK1/2 (Pang WW, 2006).

## **G.      Sensibilité aux ERO des différentes sous-populations de lymphocytes T.**

Les différentes sous-populations de lymphocytes sont exposées à la fois à des ERO d'origine exogène et endogène durant une réaction inflammatoire ou immunitaire. Ces ERO ont un rôle important à la fois dans l'activation de la cellule et dans la régulation de l'apoptose. Différentes études ont montré que les sous-populations de lymphocytes T ne réagissent pas de façon identique au stress oxydant. L'exposition de cellules T naïves et mémoires à de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> montre une sensibilité moindre des cellules naïves à l'apoptose induite par de faibles doses d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cette différence repose sur une plus grande translocation de NF-κB, en raison d'une importante dégradation de IκBα, dans les cellules naïves et suggère qu'en fonction de leur état d'activation

et/ou de différenciation les lymphocytes répondent de manière différente aux *stimuli* impliquant la production d'ERO (Lahdenpohja N, 1996). Au sein de ces cellules mémoires, les cellules T effectrices mémoires (CCR7<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>), et les cellules CD8<sup>+</sup> de manière plus importante que les CD4<sup>+</sup>, sont plus sensibles à l'apoptose induite par de faibles doses d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tandis que les cellules T mémoires centrales sont significativement moins sensibles. De plus, les cellules mémoires exposées à de faibles doses d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> montrent une apoptose dépendante des caspases précédée par une dépolarisation de la membrane mitochondriale et le relargage de cytochrome c (Takahashi A, 2005). Cette résistance plus importante des cellules T naïves à l'apoptose induite par les ERO pourrait être un facteur important pour le bon fonctionnement du système immunitaire chez les nouveaux nés. En effet, l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peut induire la production d'IL-2 et dans ce cas, seul le site de fixation de NF-κB sur le promoteur de l'IL-2 est nécessaire (Lahdenpohja N, 1996).

Afin de se protéger d'un stress oxydant et de taux élevés d'ERO, les cellules mémoires ont besoin de défenses anti-oxydantes « renforcées ». Le facteur Nrf2 joue un rôle central dans l'initiation des réponses anti-oxydantes et son absence a pour effet une plus grande sensibilité des cellules mémoires T à l'apoptose et aux pertes de fonctions mitochondriales en présence d'un stress oxydant. Les travaux de l'équipe d'AE. Nel montrent que les cellules T mémoires ont une expression des enzymes antioxydantes de phase II dépendantes de Nrf2 plus importantes que celle des cellules T naïves, ce qui pourrait contribuer à expliquer l'accumulation des cellules mémoires chez les sujets âgés (Kim HJ, 2005).

Enfin, le travail de Mougiakakos a montré que la résistance à la mort cellulaire induite par le stress oxydant est plus importante dans les lymphocytes CD4<sup>+</sup> Tregs, et particulièrement les Tregs naïves (CD45RA<sup>+</sup>) que dans les lymphocytes T effecteurs chez le sujet sain. De plus, ces Tregs présentent une activité suppressive maintenue même à des concentrations d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> létales pour plus de la moitié de la population de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> conventionnelles effectrices CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-/low</sup>. Cette résistance repose sur une production élevée de thiorédoxine-1, qui contribue à un niveau élevé de thiols membranaires, en réponse à des stimuli inflammatoires, et principalement le TNF-α (Mougiakakos D, 2009& 2011).

Cependant, le rôle de la voie de signalisation ERK1/2 dans les différences de sensibilité aux ERO des sous-populations de lymphocytes T n'a jamais été exploré.

## V. Effets généraux de la fumée de cigarette sur les cellules.

Les nombreux composés chimiques, les ERO, les ERN, les aldéhydes, et les autres carcinogènes présents dans la fumée de cigarette sont à l'origine d'une augmentation du risque de développer de nombreuses pathologies. Différentes études menées *in vitro* et *in vivo* ont montré que la fumée de cigarette pouvait induire des dommages de l'ADN, de l'autophagie et être à l'origine d'une mort cellulaire ou de l'induction d'une inflammation associée ou non à une sénescence des cellules exposées.

### A. Inflammation

Chez l'homme, le système mucociliaire présent dans les voies aériennes du tractus respiratoire est la première ligne de défense et permet de se débarrasser la plupart des matières et particules inhalées. L'épithélium cilié qui recouvre le tractus respiratoire participe à l'élimination des particules et pathogènes inhalés mais aussi à la génération d'une réponse inflammatoire contre ces éléments. Les cellules épithéliales des voies aériennes expriment à leur surface des PRR, récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires des pathogènes, qui vont être stimulés par des composés inhalés lors d'une exposition à la fumée de cigarette et être à l'origine d'une réponse inflammatoire. Les TLRs sont une classe importante de PRR impliqués dans la réponse immune innée. Le récepteur TLR2 semble en particulier impliqué dans cette réponse à la fumée de cigarette, en effet des modèles animaux déficients pour ce récepteur montrent une protection contre l'inflammation provoquée par l'exposition à la fumée de cigarette (Paul-Clark MJ, 2009). De même, des modèles murins montrent que les récepteurs TLR4 et à l'IL-1 sont impliqués dans la réponse contre la fumée de cigarette (Doz E, 2008, Pace E, 2008).

Les cultures primaires de cellules épithéliales des voies aériennes humaines répondent à l'exposition au CFC en produisant de nombreux médiateurs inflammatoires, des facteurs de croissance, des chimiokines et des cytokines susceptibles d'activer les réponses immunes innée et adaptative. Ces cellules produisent en particulier de l'IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , GM-CSF, une forme soluble de ICAM-1, CXCL8 et MMP-1 (Mio T, 1997, Rusznak C, 2000, Beisswenger C, 2004Manzel LJ, 2011). Ces cellules sont également les sources principales lors d'une exposition à la fumée de cigarette de CXCL1, CXCL2, CXCL5, CXCL9, CXCL10, CCL11, CCL24, CCL26, CCL17, CCL22 et CXCL1 (Bisset LR, 2005, Ovrevik J, 2009). Ces

différents médiateurs ont pour rôle de faciliter le recrutement et l'activation des leukocytes. Les cellules épithéliales des voies aériennes sécrètent également de l'IL-17 en réponse à une exposition à la fumée de cigarette, et particulièrement les formes IL-17-C et F. Cet IL-17 en induisant la production par les cellules épithéliales de CXCL8 permet le recrutement et l'activation des neutrophiles, et la production d'IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , CXCL1, GM-CSF et ICAM-1 (Ye P, 2001, McAllister F, 2005). Dans un modèle murin d'infection par *P.Aeruginosa*, l'exposition à la fumée de cigarette augmente les niveaux de TNF- $\alpha$ , IL-1b, IL-6, et MCP-1 et MIP-2 dans le LBA des souris exposées comparativement aux non exposées (Drannik AG, 2004). De plus chez l'homme, le LBA des fumeurs présente un niveau d'IL-8 plus important que celui des non-fumeurs (Mio T, 1997). Ces données suggèrent que la fumée de cigarette potentialise la réponse inflammatoire des cellules épithéliales *in vitro* et *in vivo*.

Cependant, plusieurs études ont montré des résultats opposés concernant la réponse à l'exposition à la fumée de cigarette des cellules épithéliales alvéolaires de type 2. Certains travaux rapportent une suppression de la sécrétion de l'IL-1 $\beta$ , IL-6, GM-CSF, IL-8, CXCL1, CCL2, CCL3 (MIP1 $\alpha$  :Macrophage Inflammatory Protein 1  $\alpha$ ) et CCL5 (Witherden IR, 2004, Moodie FM, 2004), tandis que d'autres montrent une induction de l'expression de l'IL-6 et l'IL-8 (Kode A, 2006). Néanmoins, l'exposition à la fumée de cigarette en présence de LPS ou de microorganismes a pour conséquence une suppression de la réponse inflammatoire des cellules épithéliales (Li W, 2007).

Chez les fumeurs, l'épithélium cilié et ses fonctions peuvent être modifiées. Dans des modèles animaux d'exposition à la fumée de cigarette, on observe ainsi un retard dans la « clearance » bactérienne. De plus l'exposition à la fumée de cigarette a pour conséquence une augmentation de la perméabilité épithéliale provoquée par une perte d'intégrité des jonctions serrées en lien avec une modification de l'expression des gènes codant pour ces structures (Maunder H, 2007). De plus, l'exposition *in vitro* de cellules épithéliales à la fumée de cigarette provoque une inhibition de la production du peptide antimicrobien/antiviral, la  $\beta$ -défensine-2 (Mahanonda R, 2009), une baisse de production d'IFN- $\beta$  antiviral permettant une augmentation de la réplication virale dans ces tissus des virus influenza, rhinovirus et virus syncytial, et une baisse de l'expression cytoplasmique de RIG-1, un PRR détecteur d'acides nucléiques d'origine virale par le système immunitaire inné (Hudy MH, 2010, Eddleston J, 2011, Wu W, 2011).

## B. Dommages de l'ADN

Certains composants de la fumée de cigarette, les ERO et ERN, les hydrocarbures polycycliques aromatiques (PAH) et les nitrosamines sont à l'origine d'un déséquilibre de la balance oxydants/anti-oxydants, et de l'induction de différents dommages causés à l'ADN. Ces dommages de l'ADN peuvent être (revue dans Bo, H, 2010) :

- Une oxydation des bases, qui se fait par la fixation du radical OH avec les bases puriques ou pyrimidiques. La plus connue est la transformation de la guanine en 8-oxo-7,8-dihydroxyguanosine (8-oxoG) qui constitue un marqueur ubiquitaire du stress oxydant (Loft S, 2008).
- La lésion du désoxyribose, qui implique que le radical OH<sup>•</sup> puisse arracher un atome d'hydrogène à chacun des 5 atomes de carbone du désoxyribose conduisant à une cassure de la chaîne ADN ou une perte de base (Evans MD, 2004).
- la création de sites apuriniques/apyrimidiques, qui interviennent à la suite d'une hydrolyse par l'acide nitreux (Wilson DM, 2001).
- la formation de bases volumineuses en raison de la liaison covalente de PAH ou d'amines aromatiques, qui vont désorganiser la structure en double hélice de l'ADN
- des lésions plus importantes telles que des cassures de l'ADN (simple ou double brin) ou la liaison de plusieurs molécules d'ADN entre elles.

Les fumeurs, en comparaison des non-fumeurs présentent un niveau élevé de dommages de l'ADN, jusqu'à 10<sup>5</sup> lésions par cellule et par jour (DeMarini DM, 2004). Une oxydation de l'ADN significativement plus importante est observée dans les tissus pulmonaires de fumeurs, avec ou sans BPCO, en comparaison des tissus des non-fumeurs (Caramori G, 2011). De nombreuses études montrent enfin une forte corrélation entre les dommages provoqués à l'ADN et le développement de cancers pulmonaires. L'exposition à la fumée de cigarette de fibroblastes pulmonaires humains, de cellules épithéliales alvéolaires humaines induit la formation de cassures ou de fragmentation de l'ADN. Ces dommages à l'ADN sont réversibles dans les cellules en culture lorsque la dose et de la durée d'exposition à la fumée de cigarette sont limitées (Liu X, 2005). Les dommages de l'ADN provoqués par la fumée de cigarette peuvent s'accumuler en raison d'un grand nombre de cassures, mais aussi en raison de mécanismes de réparation inefficaces, et être à l'origine de défaut de la réplication ou de la transcription.

En réponse à une exposition à la fumée de cigarette, les cellules mettent en place une procédure de réparation des dommages causés à l'ADN (ou DDR pour DNA Damages Repair). Cette DDR est médiée par différentes kinases dont la protéine Ataxia telangiectasia mutated (ATM), la kinase dépendante de l'ADN (DNA-PK) et l'ataxia-telangiectasia related (ATR). ATM et DNA-PK sont activées principalement par les cassures double brin de l'ADN (provoquées par les radiations ionisantes et le stress oxydant) (Shiloh Y, 2006), ATR est, elle, activée par les lésions de l'ADN susceptibles d'interférer avec la réplication (rayons UV, cassures simples brin de l'ADN) (Kumagai A, 2006), mais est également mobilisée en réponse à des cassures double brin de l'ADN. L'activation de ces kinases inhibe l'activité des CDKs en activant p53 et les kinases des « check point » Chk1 et Chk2. 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 exprimé en très faible quantité car une ubiquitine ligase, la murine double minute (MDM2), conduit à sa dégradation par le protéasome (Shieh SY, 1997). Lorsque l'ADN est endommagé (UV ou raccourcissement des télomères), MDM2 est séquestrée par p14<sup>ARF</sup> ce qui réduit la dégradation de p53. La DDR se caractérise par un arrêt du cycle cellulaire, et se traduit par l'induction par p53 de la transcription de p21<sup>CDKN1A</sup> un inhibiteur de kinases dépendantes des cyclines (Brown JP, 1997). p21<sup>CDKN1A</sup> bloque ainsi la transition G1/S du cycle cellulaire en inhibant spécifiquement les complexes cycline D1/CDK4-6 (phase G1) et cyclines A, E/CDK2 (phase S) (Obaya AJ, 2002). Cet arrêt dans le cycle cellulaire permet à la cellule de réparer l'ADN endommagé. ATM et ATR phosphorylent également le variant d'histone H2AX ( $\gamma$ -H2AX) présent sur les régions proches des cassures doubles simples brins de l'ADN, ce qui est un événement essentiel pour la reconnaissance des dommages ADN et la mise en place de la DDR.

### **C. Autophagie**

La macroautophagie, communément appelée autophagie, est un procédé de digestion, par la cellule, d'une partie de son contenu cytoplasmique, de protéines et/ou des organelles. L'autophagie repose sur la formation de vésicules délimitées par une double membrane et séquestrant une partie du contenu cytoplasmique, ou autophagosomes, puis la fusion de ces autophagosomes avec les propres lysosomes de la cellule. Dans des conditions normales, l'autophagie dite basale permet de compléter l'action du protéasome en dégradant des protéines à longue durée de vie. En condition de stress comme lors d'une carence en nutriments, le niveau

d'autophagie augmente pour générer des métabolites essentiels à la génération d'ATP et au maintien d'un métabolisme assurant la survie cellulaire (Levine B, 2004, Codogno P, 2005).

L'autophagie est majoritairement régulée par les protéines beclin 1 et LC3B. La conversion de la forme cytoplasmique libre de LC3B, LC3B-I, à la forme LC3B-II par conjugaison à la phosphatidylethanolamine et la liaison de LC3-II à la membrane de l'autophagosome constituent de bons marqueurs de la formation de l'autophagosome.

Des études récentes ont montré que l'autophagie est augmentée dans les tissus pulmonaires de patients atteints de BPCO et de souris exposées à la fumée de cigarette, ainsi que dans les cellules épithéliales humaines exposées *in vitro* à la fumée de cigarette. Dans ces études, il a été montré que l'exposition à la fumée de cigarette augmente l'expression de LC3B et accélère le passage de la forme LC3B-I à la forme LC3B-II (Chen ZH, 2008, Kim HP, 2008).

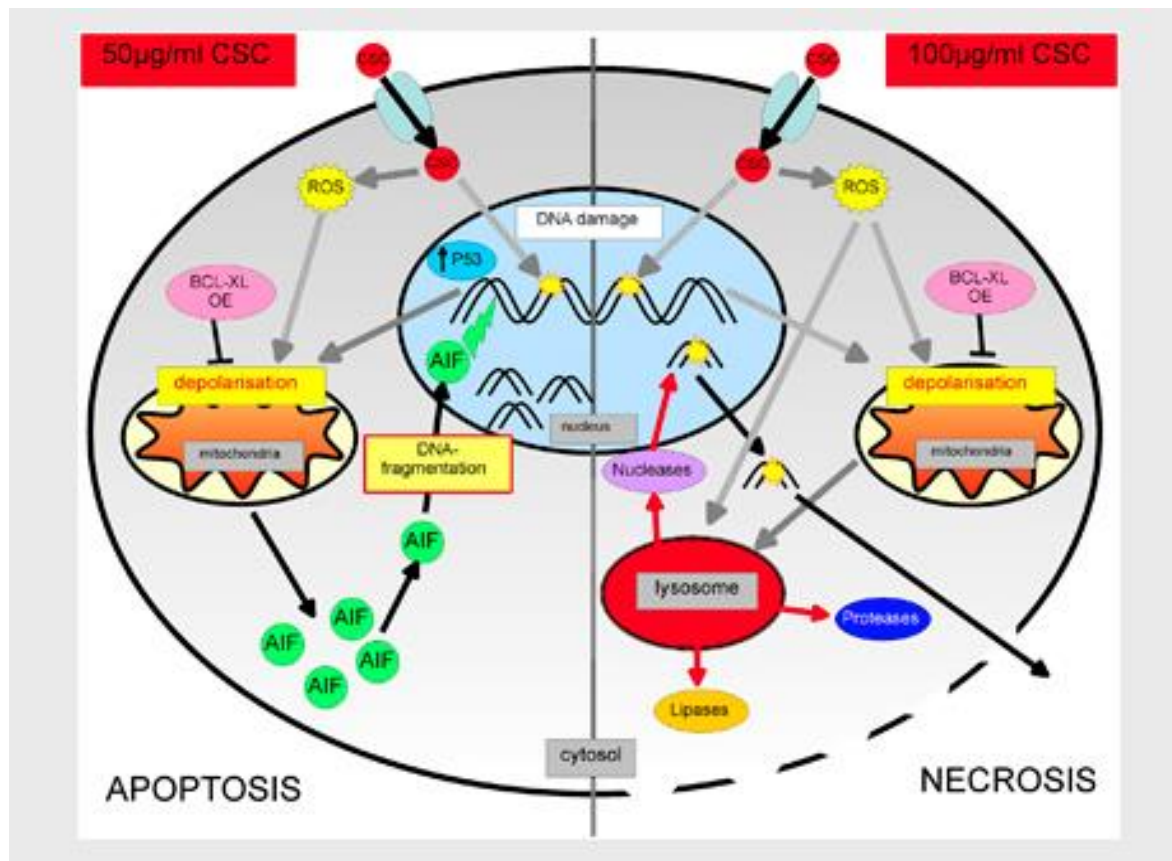
#### **D. Mort cellulaire**

Deux formes de mort cellulaire sont rencontrées dans les tissus exposés à la fumée de cigarette : la mort cellulaire programmée ou apoptose, et une forme non contrôlée et accidentelle, la nécrose (Fig.I20). L'apoptose est un mécanisme caractérisé par une atrophie des cellules, une condensation et une fragmentation nucléaire, et une fragmentation cellulaire en corps apoptotiques qui seront éliminés par des cellules phagocytaires. La principale différence entre les cellules apoptotiques et des cellules nécrotiques est que la membrane plasmique de ces dernières présente des fuites laissant s'échapper le matériel intracellulaire pouvant être à l'origine de l'induction d'une inflammation dans les tissus concernés (Edinger AL, 2004, Duprez L, 2009).

L'apoptose est un mécanisme essentiel dans le développement et l'homéostasie des organismes et est un mécanisme particulièrement régulé. Un des principaux capteurs de stress ou de dommages de l'ADN est le facteur de transcription p53. p53 peut initier l'apoptose *via* des dysfonctionnements mitochondriaux tels qu'une modification de potentiel membranaire et une perméabilisation de la membrane externe. Ces événements nécessitent l'activation de protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) (Van Loo G, 2002). La perméabilisation de la membrane mitochondriale a pour effet de libérer de l'espace intermembranaire mitochondrial deux principales catégories de molécules pro-apoptotiques. Le cytochrome c contrôle l'activation des caspases (Shi Y, 2002). De manière alternative, une apoptose indépendante des caspases peut être initiée par la libération du facteur AIF (apoptosis

inducing factor) (Elmore S, 2007). La translocation de AIF dans le noyau induit une condensation et une fragmentation de la chromatine (Cande C, 2002).

*In vitro*, l'exposition à la fumée de cigarette de différents types cellulaires, tels une lignée de cellules alvéolaires épithéliales A549, des fibroblastes pulmonaires humains ou des macrophages alvéolaires induit l'apoptose et/ou la nécrose de ces cellules (Aoshiba K, 2001, Hoshino Y, 2001, Carnevali S, 2003). Les mécanismes à l'origine de l'induction de l'apoptose ou de la nécrose ont pour point commun les dommages de l'ADN provoqués par l'exposition à la fumée de cigarette et l'augmentation de l'expression de p53. La fumée de cigarette semble être à l'origine d'une apoptose indépendante des caspases. En effet, des cellules HUVECs exposées à la fumée de cigarette, à de faibles ou fortes concentrations, ne présentent pas d'activation de la caspase-3. Au contraire l'activité de la caspase-3 dans ces cellules est inhibée par l'exposition à la fumée de cigarette, probablement en raison de la production massive d'ERO en réponse à cette exposition, et à la sensibilité des caspases à ces ERO. En revanche, l'exposition des cellules HUVECs à de faibles doses de fumée de cigarette induit une translocation nucléaire massive de AIF (Messner B, 2012). Les fortes doses de fumée de cigarette semblent être à l'origine d'une mort cellulaire par nécrose. L'implication des lysosomes et leur perméabilisation par les ERO pourrait être un mécanisme expliquant l'induction de la nécrose dans les cellules exposées à la fumée de cigarette (Guicciardi ME, 2004).



**Fig.I 20. Vue schématique des mécanismes responsables de la mort cellulaire lors d'une exposition au condensat de fumée de cigarette (Messner B, 2012).**

*In vitro*, des lymphocytes T isolés à partir de PBMCs et activés en présence de fumée de cigarette montrent un défaut de prolifération dépendant de la dose, associé à une augmentation de l'apoptose. Cette apoptose en réponse à la fumée de cigarette est indépendante des caspases et est médiée par les ERO et les espèces réactives de l'azote contenues dans la fumée de cigarette. Dans les lymphocytes T activés exposés à la fumée de cigarette, l'apoptose apparaît dépendante de la phosphorylation du facteur de traduction eIF2 $\alpha$  (Hernandez CP, 2013). Au niveau circulant, les lymphocytes T des fumeurs expriment spontanément FasL, mais l'expression de Fas, Bcl-2 et p53 n'est pas modulée par la consommation de tabac dans ces cellules (Suzuki N, 1998).

## E. Sénescence

La sénescence cellulaire est définie comme un arrêt permanent de la prolifération cellulaire en rapport avec le raccourcissement des télomères ou en réponse à plusieurs autres formes de stress

(correspondant respectivement à une sénescence répllicative ou accélérée), mais restent métaboliquement actives. Cet état est la conséquence de l'exposition des cellules à des stress qui menaceraient la survie de la cellule si celle-ci continuait à se diviser. Les cellules sénescents ont pour caractéristiques un blocage en phase G1 du cycle cellulaire associé à des modifications morphologiques et de l'expression des gènes, à une augmentation de l'activité  $\beta$ -galactosidase, un sécrétome pro-inflammatoire, et à une résistance à l'apoptose. La sénescence cellulaire ne doit pas être confondue avec la quiescence dans laquelle les cellules sont en arrêt en phase G0 du cycle cellulaire et restent en mesure de réintégrer le cycle cellulaire en réponse à des stimuli physiologiques.

Dans tous les cas, l'entrée en sénescence requiert l'activation de différentes voies de signalisation dont les principales sont celles activées en réponse à des dommages à l'ADN, et les suppresseurs de tumeurs, p53 et Rb.

#### a) **Caractéristiques des cellules sénescents.**

##### **(1) Modifications morphologiques.**

Une des caractéristiques des cellules sénescents *in vitro* est le changement de morphologie qu'elles subissent. Les cellules devenues sénescents montrent une augmentation de leur taille et un aplatissement, présentent une vacuolisation, et un contour irrégulier, traduisant les nombreuses réorganisations du cytosquelette. Dans les fibroblastes humains présentant une sénescence répllicative, l'expression de l'actine et de la tubuline sont diminuées, tandis que la production de vimentine est multipliée par quatre en comparaison de cellules pré-sénescents (Nishio K, 2001). L'expression de ces protéines est dépendante de l'activation de la protéine Rb et nécessite une synthèse protéique *de novo*. Des irrégularités de l'enveloppe nucléaire sont aussi observées, qui sont corrélées à une perte d'expression de la lamine B1 dans les cellules sénescents (Freund A, 2012).

Les cellules sénescents montrent de plus des anomalies chromosomales et une polyploïdisation. Des fibroblastes humains sénescents présentant un arrêt en phase G1 du cycle cellulaire, présentent un contenu en ADN de 2n caractéristique de la phase G1, alors que des cellules HUVECs sénescents, également arrêtées en G1, présentent un contenu en ADN de 4n (Wagner M, 2001). Ces deux types de cellules n'entrent pas en phase S suite à des stimuli mitogènes. Enfin, en comparaison avec des cellules quiescentes, les cellules sénescents

expriment plus de cavéoline-1. Celle-ci pourrait jouer un rôle important dans les changements morphologiques associés à la sénescence. La baisse d'expression de cette protéine semble suffisante pour atténuer les caractéristiques morphologiques des cellules sénescents (Cho KA, 2004).

## **(2)   Activité $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence.**

Bien que l'augmentation de l'activité  $\beta$ -galactosidase ne soit pas requise pour l'établissement de la sénescence, un des marqueurs de sénescence le plus fréquemment utilisé est l'augmentation de l'activité  $\beta$ -galactosidase à pH6 (Lee BY, 2006).

La  $\beta$ -galactosidase est une enzyme lysosomale capable d'hydrolyser des  $\beta$ -galactosides en monosaccharides. Son activité optimale est observée à pH acide (pH 4,0–5,0), proche du pH lysosomal. La  $\beta$ -galactosidase peut cliver le substrat chromogénique 5-bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -galactopyranoside (X-gal), ce qui se traduit par la production d'un marquage bleu périnucléaire dans les cellules positives.

## **(3)   Arrêt du cycle cellulaire.**

La perte des capacités de réplication et l'absence de réponse à des stimuli mitogéniques sont caractéristiques des cellules sénescents. La progression dans le cycle cellulaire nécessite la synthèse d'ADN, or, des expériences d'incorporation de [<sup>3</sup>H]-thymidine ou de 5-bromo-2'-deoxyuridine, montrent que les cellules sénescents n'incorporent aucun de ces 2 composés et présentent un arrêt du cycle cellulaire en phase G1/S (Afshari CA, 1993).

## **(4)   Résistance à l'apoptose.**

Les cellules présentant une sénescence répliative peuvent survivre plusieurs mois en culture et présentent des degrés variables de résistance aux stimuli apoptotiques. En comparaison avec des fibroblastes quiescents, des fibroblastes sénescents ne sont pas sensibles à la déprivation en sérum et présentent une augmentation de l'expression de la protéine antiapoptotique bcl2 (Wang E, 1995) et une baisse d'expression de la caspase-3 (Marcotte R, 2004). Néanmoins, les fibroblastes dermiques humains en sénescence répliative restent sensibles à l'apoptose induite

par Fas L, les céramides, TNF- $\alpha$  et l'acide okadaïque (Tepper CG, 2000, DeJesus V, 2002). Les données de la littérature semblent donc indiquer que la résistance à l'apoptose est dépendante du maintien de l'intégrité et de l'expression des voies de signalisation impliquées dans l'apoptose.

#### **(5) Modifications de l'expression des gènes.**

L'entrée en sénescence s'accompagne d'une modification de l'expression de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, des kinases dépendantes des cyclines, de p53, p21<sup>CDKN1A</sup>, p16<sup>INK4A</sup>, ERK/p38<sup>MAPK</sup> et d'une accumulation de la forme hypophosphorylée de Rb. A l'inverse, l'expression de plusieurs activateurs du cycle cellulaire, tels PCNA (proliferating cell nuclear antigen) et les cyclines A et B est inhibée (Stein GH, 1991, Narita M, 2003).

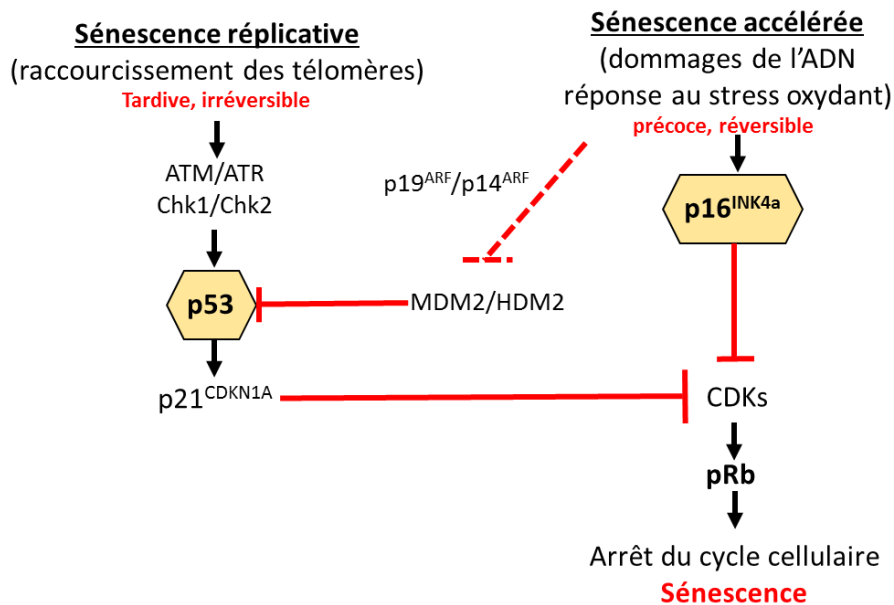
#### **(6) Dommages de l'ADN.**

Les cellules sénescents présentent également une accumulation de *foci* marquant des dommages à l'ADN. Ces *foci* regroupent plusieurs protéines de la réponse aux dommages de l'ADN tels que la kinase ATM phosphorylée, le variant d'histone H2AX phosphorylé ( $\gamma$ -H2AX) et la protéine de liaison à p53 (53BP1) (Campisi J, 2007). Plus la voie de signalisation en réponse aux dommages de l'ADN, impliquée dans l'établissement et le maintien de la sénescence, est activée, plus le nombre de *foci* est important.

##### ***b) Les différentes formes de sénescence cellulaire.***

Les données de la littérature semblent indiquer que les mécanismes responsables de la sénescence ont pour médiateur commun les dommages causés à l'ADN. L'augmentation des ERO lors d'un stress oxydant peut en effet être à l'origine de dommages de l'ADN, induisant l'accumulation de *foci*, et de H2AX phosphorylé ( $\gamma$ -H2AX). ATM et ATR vont ensuite être transloquées sur ces sites endommagés et induire une réponse similaire à celle décrite précédemment.

La sénescence cellulaire peut être, soit répllicative et être provoquée par un raccourcissement des télomères, soit accélérée (ou précoce) en réponse à des dommages de l'ADN ou un stress oxydant provoqué par une hyperoxie, une exposition aux ultraviolets ou à l'irradiation- $\gamma$  par exemple (Fig I.21).



**Fig.I 21. Voies de signalisation impliquées dans la sénescence répllicative et la sénescence accélérée.**

### (1) La sénescence répllicative.

La sénescence répllicative résulte du raccourcissement des télomères. Le mode de fonctionnement de l'ADN polymérase des cellules eucaryotes ne permet pas de répliquer les extrémités des chromosomes, ou télomères, qui sont de longues séquences répétitives (5'-TTAGGG-3') ayant pour but de protéger ceux-ci de la dégradation. Ceci entraîne l'érosion progressive des télomères, qui limite le nombre de divisions cellulaires possibles. Le raccourcissement des télomères peut être compensé par l'activité d'une transcriptase inverse, la télomérase. Cependant, après un certain nombre de divisions cellulaires successives, ces télomères se raccourcissent jusqu'à atteindre une taille limite à laquelle ils ne sont plus fonctionnels et sont considérés comme de l'ADN endommagé par la cellule qui va activer les voies de réponse adaptées. La voie de signalisation en réponse à des dommages de l'ADN a été décrite au paragraphe V. B. de ce document.

La voie de signalisation en réponse à des dommages de l'ADN a pour but de conduire à l'arrêt du cycle cellulaire par l'activation, dans le cas de la sénescence cellulaire, des points de contrôle de la phase G1. L'activation de ces points de contrôles conduit à la stabilisation et à l'activation de p53.

La contribution de p53 dans la sénescence est ensuite majeure puisqu'elle régule l'expression de gènes directement impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire. Par exemple, p53 active directement l'expression du gène p21<sup>CDKN1A</sup> un inhibiteur de kinases dépendantes des cyclines (Brown JP, 1997). p21<sup>CDKN1A</sup> contribue au blocage de la transition G1/S du cycle cellulaire en inhibant spécifiquement les complexes cycline D1/CDK4-6 (phase G1) et cyclines A, E/CDK2 (phase S) (Obaya AJ, 2002).

## **(2) La sénescence accélérée.**

La sénescence accélérée, ou prématurée, peut-être induite en réponse à un stress de la cellule : stress oxydant, dommage à l'ADN, stress par des agents thérapeutiques ou un stress oncogénique. Elle se traduit également par un arrêt irréversible du cycle cellulaire. La surexpression d'oncogènes, comme les formes activées de Ras ou Raf, peut induire un arrêt du cycle similaire à celui observé lors de la sénescence répliquative. Le fait que les différents types de stress soient potentiellement inducteurs de tumeurs a fait naître l'idée que la sénescence est un mécanisme majeur d'inhibition de la prolifération dans des cellules normales exposées à un risque de transformation tumorale. Les voies de signalisation impliquées dans la sénescence accélérée sont encore mal comprises. Cependant, des études ont permis de mettre en évidence le rôle de plusieurs protéines, parmi lesquelles la protéine p16<sup>INK-4a</sup> et les mécanismes moléculaires qui en dépendent mais aussi, comme précédemment de la voie p53/p21<sup>CDKN1A</sup> (Serrano M, 1997). La protéine p16<sup>INK4a</sup> est un des produits du locus INK4b-ARF-INK4a, lequel code pour deux autres protéines, p15<sup>INK4b</sup> (CDKN2B), un autre inhibiteur de CDKs, et la protéine ARF, un inhibiteur de MDM2 contribuant donc à la stabilisation de p53 (Gil J, 2006). p16<sup>INK4a</sup> inhibe le complexe cycline D1/CDK4-6 et est fortement exprimée dans les cellules sénescents. Les mécanismes responsables de l'induction de l'expression de p16<sup>INK4a</sup> en réponse à un stress oxydant sont encore mal connus. Plusieurs études montrent, dans des fibroblastes embryonnaires murins, que la sénescence induite par l'oncogène Ras est également médiée par Raf *via* l'implication de la voie de signalisation MEK/ERK1/2 et que ERK1/2 est essentiel à la fois pour la prolifération cellulaire, mais aussi dans l'établissement de la sénescence accélérée. ERK2, mais pas ERK1,

semble réguler de manière indirecte l'expression de p16<sup>INK4a</sup> aux niveaux transcriptionnel et traductionnel (Shin J, 2013). Dans certaines cellules, l'activation de la voie ERK1/2 conduit à l'activation de p38<sup>MAPK</sup> qui semble également impliquée dans la régulation de p16<sup>INK4a</sup> (Yingxi X, 2014). Les voies de signalisation ERK/p38<sup>MAPK</sup> sont de plus sensibles aux ERO et peuvent être activées par un stress oxydant et l'exposition à la fumée de cigarette induit la phosphorylation de ERK1/2 dans les cellules épithéliales humaines des petites voies aériennes (SAECs) (Mercer BA, 2004).

Les voies de signalisation impliquées dans les mécanismes de sénescence répliquative et accélérée convergent vers une hypophosphorylation de la protéine Rb et un arrêt du cycle cellulaire. Rb hypophosphorylée agit en inhibant les facteurs E2Fs, des facteurs de transcription essentiels à la transition G1/S du cycle cellulaire. La phosphorylation séquentielle de la protéine Rb par le complexe cycline D/CDK4-6, puis par le complexe cycline E/CDK2 provoque la fin de son interaction avec les facteurs de transcription de type E2F, et l'activation de la transcription des gènes de phase S (Meloche S, 2007).

### ***c) Exposition à la fumée de cigarette et sénescence.***

Au niveau pulmonaire, l'exposition à la fumée de cigarette a été associée à la sénescence de différents types cellulaires. Les cellules épithéliales pulmonaires de patients atteints de BPCO montrent une augmentation de l'expression de marqueurs de sénescence p16<sup>INK4a</sup>, p21<sup>CDKN1A</sup> en comparaison avec des fumeurs asymptomatiques et des témoins sains (Tsuji T, 2006). L'analyse de la longueur des télomères des cellules alvéolaires de type II (ATII) montre que celle-ci est significativement plus courte chez les fumeurs comparativement aux non-fumeurs (Tsuji T, 2006). Les fibroblastes pulmonaires obtenus à partir de patients fumeurs atteints de BPCO, et cultivés *in vitro* montrent une augmentation de l'activité  $\beta$ -galactosidase et des capacités de prolifération réduites en comparaison de fumeurs sains (Holz O, 2004). L'exposition à la fumée de cigarette *in vitro* de cellules ATII et A549, des cellules épithéliales alvéolaires humaines, induit une sénescence démontrée par une augmentation de l'activité  $\beta$ -galactosidase de ces cellules et une augmentation de l'expression de p21<sup>CDKN1A</sup> dépendante de la dose de fumée de cigarette et de la durée de l'exposition (Tsuji T, 2004).

Différents travaux, ont montré que la longueur des télomères était plus courte dans les leucocytes du sang périphérique et les lymphocytes circulants chez les patients atteints de

BPCO que chez les fumeurs asymptomatiques et témoins non-fumeurs (Morlà M, 2006, Savale L, 2009). Chez l'homme, l'expression de p16<sup>INK4A</sup> dans les lymphocytes T du sang périphérique est augmentée avec l'âge des individus et l'augmentation de ce marqueur est significativement associée à la consommation de tabac et avec l'inactivité physique (Liu Y, 2009). Une autre étude montre que l'expression de la protéine p53, surexprimée dans les cellules sénescents, est plus importante dans les lymphocytes T totaux du LBA chez les patients avec BPCO comparés à des sujets non-fumeurs (Hodge, 2005). Par ailleurs, le pourcentage de lymphocytes T périphériques CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> et CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>, phénotypes associés au caractère sénescents des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> est plus important dans le LBA (Barcelo B, 2008) et dans le sang périphérique chez les fumeurs avec BPCO que chez les fumeurs asymptomatiques et les non-fumeurs (Yingxuan C, 2010, Hodge G, 2011). Ces cellules ayant perdu l'expression de CD28 montrent de plus une augmentation de l'expression de la perforine, du granzyme et de l'IFN- $\gamma$ , évoquant un secrétome inflammatoire caractéristique des cellules sénescents (Yingxuan C, 2010, Hodge G, 2011). Toutefois, la perte d'expression de CD28 ne peut pas être considérée comme un bon marqueur de sénescence car elle est également observée dans des phénomènes d'exhaustion quand les lymphocytes sont activés de manière chronique sur les sites inflammatoires. Ces cellules montrent une activité télomérase transitoire, conservent la possibilité de proliférer dans des conditions particulières et en réponse à des signaux de co-stimulation autres que CD28 (4-1BB et OX40 per exemple), et une partie des lymphocytes ayant perdu l'expression de CD28 est susceptible à l'apoptose induite par l'activation (revue dans Strioga M, 2011).

Néanmoins, aucune donnée n'existe sur la susceptibilité à la sénescence des différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> exposés à la fumée de cigarette.

## VI. Effets de l'exposition à la fumée de cigarette sur les défenses immunitaires

La plupart des composés de la fumée de cigarette sont connus pour leur effet carcinogène ou toxique pour les cellules ; néanmoins, les goudrons et la nicotine peuvent aussi avoir un effet immunosuppresseur, à la fois sur la réponse immunitaire innée et adaptative, et être à l'origine d'une plus grande susceptibilité des fumeurs aux infections. Les effets qualitatifs et quantitatifs de la fumée de cigarette sur le système immunitaire dépendraient de la durée de l'exposition. Cependant, des études réalisées aux USA montrent que bien que la prévalence de la consommation de tabac soit la même dans les différentes populations, les effets de la fumée de cigarette sur le système immunitaire pourraient également être dépendants de l'ethnie et du sexe (Sopori M, 2002).

### A. Conséquences *in vivo* et *in vitro* sur les cellules de l'immunité innée.

Les poumons sont un des principaux lieux d'exposition de l'organisme à des pathogènes et des antigènes environnementaux, et divers mécanismes de défenses de l'organisme, spécifiques ou non sont impliqués dans l'éradication de ces agressions dans le poumon. La réponse immunitaire innée est essentiellement basée sur l'activité des cellules phagocytaires et présentatrices d'antigènes. Ces cellules comprennent les monocytes et macrophages, les polynucléaires neutrophiles et les cellules dendritiques, qui vont assurer la phagocytose aboutissant, d'une part, à la destruction du pathogène, et d'autre part, à la présentation d'antigènes par le CMH de classe II. Les cellules NK font également partie du système immunitaire inné mais n'éliminent pas directement les agents pathogènes. Elles éliminent, en revanche, les cellules dont la fonction est altérée, telles que les cellules tumorales ou les cellules infectées par un virus.

La consommation de tabac est associée à la production à la fois de médiateurs pro-et anti-inflammatoires. Comme décrit dans le paragraphe V A, l'inflammation chronique observée chez les fumeurs est associée à la sécrétion de cytokines au niveau pulmonaire mais aussi systémique. L'exposition à la fumée de cigarette induit la production de TNF- $\alpha$ , et de son récepteur, d'IL-1, d'IL-6, d'IL-8 et de GM-CSF que l'on retrouve dans le sang. Cependant, au niveau des cellules mononucléées, l'exposition à la fumée de cigarette a également été associée à la diminution de la production d'IL-6 *via* les voies de signalisation TLR-2 et -9, et d'IL-10

via TLR-2, ainsi qu'à la diminution de la production d'IL-1 $\beta$ , d'IL-2 de TNF- $\alpha$  et d'IFN- $\gamma$  par les cellules mononuclées, suggérant une altération fonctionnelle de ces cellules (Arnson Y, 2010).

## 1. **Macrophages alvéolaires**

Les macrophages alvéolaires et les monocytes représentent une part importante de la réponse immunitaire innée dans le poumon grâce à leur capacité de phagocytose des pathogènes et antigènes extérieurs, et à leur fonction de cellule présentatrice d'antigène. Le nombre de macrophages alvéolaires est augmenté dans le LBA des fumeurs (Barnes PJ, 2004), et l'exposition à la fumée de cigarette provoque également un changement du phénotype de ces macrophages (Skold CM, 1996). Les macrophages alvéolaires de fumeurs sont moins matures, leur expression de TLR2, TLR4 et CD14 en réponse à leurs ligands est moindre (Droemann D, 2005). Ils présentent un déficit dans leur capacité à tuer les bactéries intracellulaires (Takeuchi M, 2001), des capacités phagocytaires réduites (King TE, 1988) et produisent moins de cytokines pro-inflammatoires nécessaires pour la réponse précoce aux pathogènes (McCrea KA, 1994). Ils sécrètent en revanche plus d'enzymes lysosomales et de protéinases (telle que l'élastase) pouvant provoquer des lésions du tissu conjonctif et des cellules du parenchyme pulmonaire (Reynolds HY, 1987, Sopori ML, 1994). De plus, les macrophages alvéolaires de fumeurs produisent significativement plus de radicaux libres de l'oxygène et ont une activité myéloperoxydase plus importante que celle des macrophages de non-fumeurs. Ces modifications dans les fonctions des macrophages sont à l'origine du développement de pathologies pulmonaires (infections, bronchite chronique, emphysème, BPCO,...) (Sopori, M., 2002). De façon intéressante, comparativement aux macrophages alvéolaires de non-fumeurs, les macrophages alvéolaires de fumeurs asymptomatiques montrent une altération du programme de polarisation fonctionnelle de type M1, au profit d'une polarisation de type M2. Ce profil de polarisation de type M2 est encore plus accentué dans les macrophages alvéolaires de patients BPCO (Shaykhiev R, 2009). La polarisation fonctionnelle de type M1 est induite par les signaux générés lors de la réponse immune de type Th1 tels que l'IFN- $\gamma$  et est de type inflammatoire. La polarisation M2 est, elle, induite par l'exposition aux cytokines de type Th2 IL-4 et IL-13 ou des signaux immunorégulateurs tels que l'IL-10, et est de type anti-inflammatoire et associée au remodelage tissulaire. Ces macrophages alvéolaires de type M2 induits par l'exposition à la fumée de cigarette expriment MMP2 et 7, et permettent la

prolifération, la migration et l'invasion de cellules épithéliales alvéolaires basales (Yuan F, 2014, Fu X, 2015)

## 2. **Neutrophiles.**

Les neutrophiles sont des cellules inflammatoires et contribuent à la phagocytose et à l'élimination des microbes. L'exposition à la fumée de cigarette provoque un afflux de neutrophiles dans les poumons, dont le taux dans les voies aériennes est particulièrement amplifié par l'exposition à la fumée de cigarette (30% de plus chez les fumeurs) (Smith MR, 2003). Les neutrophiles sont produits dans la moelle osseuse hématogène, qui est leur site de prolifération, de différenciation terminale et de maturation. L'afflux de neutrophiles induit par l'exposition à la fumée de cigarette est associé à une stimulation du système hématopoïétique. Des modèles animaux ont montré que l'exposition à la fumée de cigarette accélère la libération des neutrophiles de la moelle. Ce phénomène pourrait être médié par des facteurs solubles provenant des tissus pulmonaires. Les macrophages alvéolaires sont d'importantes sources de médiateurs pro-inflammatoires lorsqu'ils sont exposés à la fumée de cigarette, dont des facteurs de croissance hématopoïétiques tels que GM-CSF et G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor), et IL-1, IL-8 et TNF- $\alpha$  (Van Eeden SF, 2000). Les neutrophiles produits chez les fumeurs présentent des changements phénotypiques et sont particulièrement pro-inflammatoires. Ils présentent une augmentation de l'expression de la molécule d'adhésion L-selectin, de leur contenu en myeloperoxydase, une enzyme pro-oxydante des granules primaires (Van Eeden SF, 2000).

Les neutrophiles activés par la fumée de cigarette vont s'accumuler dans les micro vaisseaux pulmonaires à partir desquels ils vont effectuer une migration transendothéliale facilitée par l'augmentation de l'expression de la L-selectin et de l'activation de la  $\beta$ 2-intégrine CR3 sur les neutrophiles, et l'augmentation de l'expression de leurs récepteurs sur les cellules endothéliales E-selectin, P-selectin, ICAM-1, -2 et VCAM-1 (Vascular cell adhesion protein 1) (Stone PC, 2002). Ce phénomène est accompagné par la sécrétion par les neutrophiles de MMP-9, LTB<sub>4</sub> et IL-8 (Louhelainen N, 2010, Mortaz E, 2010)

Au final, cet afflux et cette activation inappropriés de neutrophiles compromettent la fonction protectrice de ces cellules et contribuent à intensifier les stress oxydant et protéolytique, et à exacerber l'effet de la fumée de cigarette sur le système immunitaire et la destruction des tissus pulmonaires.

### 3. Cellules dendritiques.

Les données retrouvées dans la littérature vont dans le sens d'une altération des fonctions des cellules dendritiques tant myéloïdes que plasmacytoïdes chez les fumeurs.

Les cellules dendritiques myéloïdes sont des cellules essentielles pour établir le lien entre immunité innée et adaptative. Ces cellules sont capables de phagocyter les agents pathogènes et de présenter des antigènes de ce pathogène, associés aux molécules de classe II du CMH. Cette « capture » des antigènes est ensuite suivie par une migration des cellules vers les ganglions lymphatiques où aura lieu la présentation de l'antigène aux lymphocytes Th. *In vitro*, l'exposition à la fumée de cigarette, ou à la nicotine, de cellules dendritique myéloïdes, obtenues par différenciation à partir de cellules mononuclées du sang périphérique, interfère non seulement avec les fonctions de présentation de l'antigène, mais également avec la production d'IFN- $\gamma$ , impliqué dans la différenciation des lymphocytes T en Th1, et l'expression du récepteur de chimiokine CCR7 impliqué dans la migration des cellules dendritiques matures vers les ganglions lymphatiques (Vassalo R, 2005, Yanagita M, 2012). Comparativement avec des non-fumeurs, les cellules dendritiques myéloïdes présentes dans le LBA de fumeurs ont une expression moindre de CCR7 (Bratke K, 2008). La fumée de cigarette réduit de plus les activités d'endocytose et de phagocytose, ainsi que les capacités de « priming » et leurs capacités à stimuler la réponse des cellules T. La fumée de cigarette diminue également la sécrétion d'IL-10, d'IL-12 et de molécules de co-stimulation par les cellules dendritiques matures (Vassalo R, 2005).

De plus, il a déjà été montré que les cellules dendritiques myéloïdes isolées des tissus pulmonaires de patients emphysémateux favorisent la polarisation fonctionnelle des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> vers des phénotypes fonctionnels de type Th1 et Th17 (Shan M, 2009). Récemment, il a été montré que l'exposition à la fumée de cigarette et l'accumulation de noir de carbone, un des composants de la fumée de cigarette, dans les cellules dendritiques myéloïdes de patients atteints d'emphysème, favorise l'activation et la sécrétion de cytokines pro-Th17 par ces cellules (You R, 2015).

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes sont des effecteurs importants de l'immunité antivirale qui est médiée *via* la synthèse et la sécrétion d'IFNs, particulièrement l'IFN- $\alpha$ , en réponse aux interactions des acides nucléiques viraux avec les TLR-3, -7, -8 et -9. L'exposition à la fumée de cigarette de cellules dendritiques plasmacytoïdes isolées à partir de cellules

mononuclées du sang périphérique humain montrent une inhibition à la fois de la production spontanée et de la production induite par les virus de l'IFN- $\alpha$ , de l'IL- $\beta$ , de l'IL-10 et de la chimiokine CXCL10 (Mortaz E, 2009, Castro SM, 2011).

#### 4. **Cellules NK.**

Les cellules NK sont des cellules impliquées dans la surveillance anti-tumorale. La consommation de tabac étant associée à une augmentation du risque de développer différents types de cancers, plusieurs études se sont intéressées à l'effet de la fumée de cigarette sur les cellules NK. L'activité des cellules NK contre des cellules de mélanome en culture, et contre d'autres cellules cancéreuses, est significativement réduite chez les fumeurs en comparaison avec les NK des non-fumeurs (Ferson M, 1979). Ces données ont été confirmées à l'aide de modèles animaux dans lesquels le contrôle de la croissance de cellules tumorales greffées est diminué chez des souris exposées à la fumée de cigarette comparativement aux souris non-exposées (Holt PG, 1977).

### **B. Exposition à la fumée de cigarette et réponse immunitaire adaptative**

La réponse immunitaire adaptative consiste dans des réponses immunitaires spécifiques d'antigènes de diverses origines. Cette réponse immunitaire peut être humorale et faire appel à l'intervention de lymphocytes B, ou être à médiation cellulaire et faire intervenir les lymphocytes T. De même que son effet sur la réponse immunitaire innée, différentes études ont montré que l'exposition à la fumée de cigarette compromet les réponses immunitaires adaptatives. De nombreuses études rapportent une augmentation du nombre de lymphocytes circulants chez les fumeurs, mais ces cellules présentent des altérations de leurs fonctions. Néanmoins, cette augmentation pourrait être modifiée en fonction de la dose et de la durée d'exposition à la cigarette, et en fonction de l'appartenance ethnique des individus (Tollerud DJ, 1991). Ainsi, la fumée de cigarette peut être à l'origine d'une immunosuppression systémique et d'une susceptibilité particulière des fumeurs à certaines infections virales et bactériennes.

## 1. Lymphocytes T.

La consommation de tabac est à l'origine d'une augmentation du nombre de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> périphériques dans les populations caucasiennes. Néanmoins, dans les populations afro-américaines, fumer a pour conséquence une baisse dose-dépendante du nombre de lymphocytes T périphériques (Tollerud DJ, 1991) indiquant des susceptibilités différentes selon le terrain génétique.

Chez les fumeurs et les patients BPCO, une augmentation de cellules productrices d'IFN- $\gamma$ , des CD8<sup>+</sup> de type Tc1 est observée au niveau pulmonaire et dans le LBA (Majo J, 2001, Brozyna S, 2009, Hodge G, 2011). D'autre part, l'augmentation du nombre de TCD8<sup>+</sup> activés pulmonaires (Saetta M, 1998, Saetta M, 1999) et périphériques est directement corrélée à l'insuffisance respiratoire et donc la sévérité de la maladie chez les patients BPCO (Zhu X, 2009).

De nombreuses études ont montré que l'exposition à la fumée de cigarette des lymphocytes T provoque une inhibition de la prolifération de ces cellules *in vitro*, chez l'homme comme dans des modèles animaux. Des cellules T humaines CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> obtenues à partir du sang périphérique, stimulées par des anticorps anti- CD3 et CD28, et cultivées *in vitro* en présence de CFC présentent une réduction de l'expression de CD25, de leur capacité de prolifération et de la production de granzyme B (Glader P, 2006). De même, les lymphocytes T obtenus à partir de LBA de fumeurs présentent des caractéristiques similaires (Hagiwara E, 2001). De plus, les lymphocytes obtenus à partir du sang périphérique de fumeurs, en comparaison avec des individus non-fumeurs, montrent une augmentation de l'expression de la protéine FasL en absence de stimulation par des mitogènes, et pourraient donc présenter une plus grande susceptibilité à l'apoptose (Suzuki N, 1999). Récemment il a été montré que la baisse des capacités de prolifération de lymphocytes T en présence de fumée de cigarette et en réponse à des mitogènes est effectivement associée à une augmentation de l'apoptose de ces cellules (Hernandez CP, 2013).

L'exposition à la fumée de cigarette est également à l'origine d'un vieillissement accéléré des lymphocytes T se traduisant par un raccourcissement des télomères (Morla M, 2006, Zhangfa Song, 2010). Ceci pourrait avoir pour conséquence une réduction de la variété du répertoire TCR des lymphocytes T contribuant à la plus grande susceptibilité aux infections virales observées chez les fumeurs.

Le travail de l'équipe de Sopori M a également montré que l'exposition à la fumée de cigarette des lymphocytes T pourrait agir sur la signalisation dépendante de la liaison antigène-TCR et

induire un état d'anergie *via* la déplétion des stocks de calcium intracellulaire dont la libération est sensible à l'IP<sub>3</sub> (Kalra R, 1999).

Chez les fumeurs, une augmentation périphérique des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Th1 et Th17 est observée (Saetta M, 1998, Shan M, 2009, Wang H, 2015). Chez les patients atteints de BPCO, cette augmentation de la proportion de cellules Th17 circulantes est encore plus importante et est corrélée à la sévérité de la maladie (Di Stefano A, 2009, Doe C, 2010, Vargas-Rojas MI, 2011, Zhang J, 2013). D'autres études montrent au contraire que l'exposition à la fumée de cigarette a pour conséquence une baisse du nombre de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> de type Th1 dans les voies aériennes et le LBA et une baisse de la production d'IFN- $\gamma$  par ces cellules et un défaut de polarisation ensuite des macrophages vers un phénotype M1 (Hagiwara E, 2001, Meuronen M, 2008). Une des hypothèses permettant d'expliquer cette baisse de lymphocytes Th1 pourrait être une plus grande susceptibilité de ces cellules à l'apoptose induite par la fumée de cigarette. Un autre mécanisme pourrait être la baisse d'expression de CD28 et l'augmentation de CTLA-4 par les Th1 provoquées par l'exposition à la fumée de cigarette. La conséquence des interactions moléculaires de CD28 ou CTLA-4 avec leur ligand sur les cellules Th1 est une inhibition des fonctions effectrices et un phénomène d'exhaustion de ces cellules. L'exposition prolongée à la fumée de cigarette a pour effet d'inhiber les réponses immunes de type Th1 en réponse à des infections provoquées par des bactéries de type gram-négative. Parallèlement, d'autres études ont montré que l'exposition à la fumée de cigarette induit un biais dans la réponse des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> stimulés par un antigène ayant pour effet une augmentation de la production des cytokines de type Th2 (de Heens GL, 2009).

Chez l'homme, l'exposition à la fumée de cigarette augmente les fonctions suppressives des Tregs dans les poumons des fumeurs « sains » (Barcelo B, 2008, Wang DW, 2010). L'augmentation de l'expression de PD-L1/2 sur les cellules présentatrices d'antigènes exposées à la fumée de cigarette a pour effet d'augmenter l'engagement de PD-1 sur les Tregs (Francisco LM, 2010). De plus les interactions CTLA-4-B7 ou PD-1-PD-1-L1/2 permettent d'augmenter les capacités suppressives des Tregs. Des études sur la souris ont montré que les Tregs expriment le récepteur  $\alpha 7$  nicotinique à l'acétylcholine, et la liaison de ce récepteur à l'acétylcholine augmente l'expression de FOXP3 et de CTLA-4 (Wang DW, 2010). Les données concernant les Tregs dans la BPCO sont controversées, mais semblent indiquer une anomalie des proportions de ces cellules dans les tissus pulmonaires des patients. 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 (Barcelo B, 2008, Isajevs S, 2009, Smyth LJ, 2007). Au contraire, d'autres études présentent une augmentation

de la fréquence des cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> au niveau du parenchyme pulmonaire chez les sujets emphysémateux. En revanche, ces Tregs 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).

Ces données suggèrent que l'exposition des cellules T à la fumée de cigarette compromet leurs capacités à lutter contre les infections des voies aériennes. Cette baisse des capacités effectrices pourrait également expliquer comment, malgré un nombre augmenté de cellules T dans les tissus pulmonaires des fumeurs ceux-ci soient plus susceptibles à certaines infections virales et bactériennes.

## 2. **Lymphocytes B.**

Le nombre de lymphocytes B circulants ne semble pas altéré chez les fumeurs (Tollerud DJ, 1989) et des modèles animaux ont montré des résultats similaires (Holt PG, 1977, Sopori ML, 1985 & 1989). Pourtant, de nombreuses études ont montré chez les fumeurs une baisse des concentrations d'Ig circulantes (IgA, IgG et IgM) et au contraire, une augmentation des concentrations d'IgE circulantes (Trosini-Desert V, 2004, Bagaitkar J, 2008, Roseman C, 2012). Des modèles animaux d'exposition chronique à la nicotine, et l'exposition *in vitro* de lymphocytes B humains à la nicotine, montrent une inhibition de la réponse des cellules B et pourrait expliquer la diminution des taux circulants d'anticorps (Geng Y, 1996). Cependant, la fumée de cigarette augmente le taux d'auto-anticorps tels que les anticorps dirigés contre le facteur rhumatoïde (Masdottir B, 2000), expliquant en partie la susceptibilité plus importante des fumeurs aux infections et à certaines maladies auto-immunes. Enfin, les altérations de la production des immunoglobulines par les cellules B associées à la consommation de tabac pourraient être en partie dues aux altérations des fonctions de présentation de l'antigène des macrophages et des cellules dendritiques.

Au niveau pulmonaire, le nombre de lymphocytes B est augmenté dans les voies aériennes des patients atteints de BPCO. Dans cette pathologie, les lymphocytes B s'organisent dans des follicules lymphoïdes, ou iBALT (Bronchus-Associated Lymphoid Tissue), retrouvés autour des petites voies aériennes et dans le parenchyme pulmonaire des patients (Hogg JC, 2004). Ceci est particulièrement visible dans les formes les plus sévères de BPCO. Dans ces follicules lymphoïdes ont lieu la présentation de l'antigène, la commutation de classe des immunoglobulines et la maturation des lymphocytes B. Ces cellules B sont par nature

oligoclonales, ce qui suggère une induction des follicules B spécifique d'un antigène. Les antigènes concernés peuvent être des antigènes microbiens, des antigènes apportés par la fumée de cigarette, ou des débris de matrice extracellulaire ou des auto-antigènes mis à nu suite aux dégâts conséquents à l'exposition à la fumée de cigarette (Brusselle GG, 2009). La réponse humorale peut donc à la fois avoir un rôle protecteur contre la colonisation microbienne et les infections de la partie basse du tractus respiratoire, ou au contraire, être dirigée contre les tissus pulmonaires suggérant une composante auto-immune de la pathogénèse de la BPCO (Tsuji T, 2004).

## **Chapitre 2 : Hypothèses et objectifs.**

Le tabagisme est un facteur aggravant de nombreuses maladies inflammatoires chroniques (notamment la maladie de Crohn, l'arthrite rhumatoïde, le psoriasis) associées à une sous-population particulière de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> inflammatoires sécrétant la cytokine IL-17 (ou Th17), et un facteur de risque de métastase pour certains cancers non-directement associés au tabagisme (notamment cancer de la prostate, cancer du sein) pour lesquels les Th17 sont de mauvais pronostic.

L'effet de l'exposition des cellules du système immunitaire adaptatif à la fumée de cigarette consiste en un mélange d'inflammation et d'immunosuppression. Un défaut de capacité de prolifération ajouté à une susceptibilité à l'apoptose accrue des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Th1, serait la cause d'une susceptibilité plus importante des fumeurs à certaines infections virales ou bactériennes dépendant de la réponse Th1 et des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques (Hernandez CP, 2013, Shaler CR, 2013). D'autre part, chez les fumeurs asymptomatiques, on observe une augmentation en nombre et en proportion des Th17 dans les tissus pulmonaires et dans le sang périphérique, et cette augmentation est plus importante chez les fumeurs atteints de BPCO, maladie dont le principal facteur étiologique est le tabagisme (Di Stefano A, 2009, Shan M, 2009 & 2012, Doe C, 2010, Wang H, 2014). Le rôle pathogène de l'augmentation des Th17 dans les poumons de fumeurs atteints de BPCO a été confirmé à l'aide de modèles animaux d'exposition à la fumée de cigarette reproduisant l'augmentation des Th17 (Harrison OJ, 2008) ; les souris déplétées des populations cellulaires exprimant le récepteur CCR6, incluant les Th17, sont partiellement protégées de l'inflammation et de la destruction des tissus alvéolaires pulmonaires (Brusselle GG, 2006, Bracke KR, 2006, Shan M, 2012).

Cette augmentation en nombre et en proportion des lymphocytes Th17 chez les fumeurs, contraste avec la rareté habituelle, en dépit de leur rôle pathogène, de ces cellules dans les tissus périphériques-sites d'inflammation. Compte-tenu des spécificités fonctionnelles des Th17, différentes hypothèses peuvent être faites concernant les mécanismes à l'origine de l'augmentation des Th17 observées chez les fumeurs :

- Les lymphocytes Th17 présentent une faible capacité à proliférer qui a été associée à des mécanismes inhibiteurs d'auto-régulation, tels que l'augmentation de l'expression de l'enzyme IL4I1 et la diminution de l'expression de CD3ζ (Santarlaschi V, 2012, Annunziato F, 2013). L'exposition des Th17 à la fumée de cigarette pourrait inhiber ces mécanismes intrinsèques d'autorégulation, ce qui, en conséquence, pourrait contribuer à l'augmentation de la prolifération des Th17 chez les fumeurs.
- Les lymphocytes Th17 présentent des particularités communes des cellules souches : elles ont une longue durée de vie, sont résistantes à l'apoptose, ne sont pas totalement

différenciées et conservent une plasticité qui leur permet de se transdifférencier en lymphocytes Th1 « non classiques » dans certaines conditions de microenvironnement (McKinstry KK, 2010). L'exposition des Th17 à la fumée de cigarette pourrait majorer la résistance à l'apoptose des Th17, et/ou inhiber leur capacité à se transdifférencier en Th1 « non classiques » ce qui, en conséquence, pourrait contribuer à l'accumulation périphérique des Th17 chez les fumeurs.

Une augmentation de la sénescence des lymphocytes Th17 pourrait également expliquer l'augmentation de ces cellules dans les sites inflammatoires, et n'a jamais été explorée. En effet, la sénescence augmente la résistance des cellules à l'apoptose en parallèle à la diminution de leur capacité de prolifération liée à un blocage du cycle cellulaire (Coppé JP, 2010). Néanmoins, aucune donnée n'existe sur la susceptibilité à la sénescence des différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> exposés à la fumée de cigarette. Pourtant, à l'instar de ce qui a été décrit dans différentes cellules pulmonaires (Tsuji T, 2004, Nyunoya T, 2006, Tomita K, Amsellem V, 2011, Aoshiba K, 2012, Dagouassat M, 2013) des données existent concernant des caractéristiques compatibles avec la sénescence dans les lymphocytes du sang périphérique de fumeurs sains ou atteints de BPCO : un raccourcissement des télomères a été observé dans les PBMCs de patients atteints de BPCO (Savale L, 2009, Houben JM, 2009) et dans les lymphocytes circulants de fumeurs asymptomatiques ou atteints de BPCO (Morlà M, 2006, Song Z, 2010). Enfin, chez l'homme, l'expression de p16<sup>INK4a</sup> dans les lymphocytes T du sang périphérique est augmentée avec l'âge des individus et l'augmentation de ce marqueur est significativement associée à la consommation de tabac (Liu Y, 2009).

**L'hypothèse** qui sous-tend le travail présenté dans cette thèse, est que les lymphocytes Th17 présentent une susceptibilité particulière à l'exposition à la fumée de cigarette en comparaison avec les autres sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, qui serait responsable de l'augmentation en nombre et proportion des Th17 chez les fumeurs, et contribuerait à l'aggravation du potentiel inflammatoire de ces cellules.

**Les objectifs** de cette étude sont d'analyser la susceptibilité des lymphocytes Th17 à la sénescence induite par l'exposition à la fumée de cigarette, et le rôle potentiel du stress oxydant dans ce phénomène.

## Chapitre 3 : Matériel et méthodes

## I. Milieux de culture

Dans ce travail le milieu utilisé est un milieu RPMI 1640 GlutaMax<sup>™</sup> HEPES 25mM (Gibco 72400-054) additionné d'antibiotiques : penicilline 100U/ml et streptomycine 100µg/ml, de pyruvate de sodium 1mM, et de 1% d'acides aminés non essentiels ; dans la suite de ce document, le terme de « -milieu complet- » fera référence à ce milieu-là. Selon les expériences, ce « milieu complet » est complété par du sérum de veau fœtal (SVF) à 10% ou 2,5%, ou un mélange de sérums humains AB (SAB) à 10%.

## II. Isolement des cellules mononuclées du sang périphérique

Dans cette étude, les cellules mononuclées du sang périphérique ont été isolées à partir de culots cellulaires de cytophérèse provenant de donneurs volontaires anonymes sains, obtenus auprès de l'Etablissement Français du Sang (EFS, site Henri Mondor, Créteil). Les cônes de cytophérèse sont des résidus de sang obtenus après le processus de restitution de son sang à un donneur lors d'un don pour concentré de plaquettes d'aphérèse. Le contenu de ces cônes est enrichi en globules blancs ( $10^9$  dont 70% de lymphocytes) et en plaquettes ( $>10^{10}$ ).

### A. Principe

Les cellules mononuclées du sang périphérique humain peuvent être isolées par centrifugation dans un gradient de densité constitué d'un mélange de polymères polysaccharidiques et d'un composé iodé dense, le métrizoate de sodium (Ficoll-Hypaque). Cet isolement repose sur les densités respectives différentes des constituants du sang (plasma, cellules mononuclées, érythrocytes et granulocytes) et du Ficoll. Après centrifugation, on obtient à l'interface plasma/Ficoll un anneau opaque blanchâtre contenant une population de cellules mononuclées séparées des globules rouges et de la plupart des polynucléaires. Cette population de cellules mononuclées est principalement constituée de lymphocytes et de monocytes.

### B. Mode opératoire

Les différents éléments figurés du sang contenus dans les culots cellulaires de cytophérèse sont séparés à l'aide de tubes UNI-SEP (Novamed U-10). Ces tubes sont stériles et contiennent une solution composée de 5,6% de polysucrose et 9,6% de métrizoate de sodium, dont la densité est

de 1,077g/ml et l'osmolarité de 280 mOsm. Cette solution est retenue en bas du tube par un insert en plastique. Ce système permet de déposer le sang directement dans le tube sans troubler la solution de polysucrose et métrizoate de sodium. Le contenu du culot cellulaire de cytophérèse (7 à 10 mL) est dilué au demi dans du milieu RPMI 1640 (Gibco) sans additif, puis est déposé dans le tube UNI-SEP directement sur l'insert en plastique. Deux volumes de sang dilué sont déposés pour un volume de solution de polysucrose et métrizoate de sodium contenu sous l'insert. Le tube est centrifugé 20 minutes à 1000g à une température comprise entre 18 et 20°C. Lors de la centrifugation, l'insert s'ouvre, permettant le mélange du sang et de la solution de polysucrose et métrizoate de sodium. Les érythrocytes, les cellules mortes, les leucocytes polynucléaires et les granulocytes sédimentent en bas du tube, tandis que les cellules mononuclées du sang (PBMCs) sont positionnées à l'interface entre la solution de polysucrose et métrizoate de sodium en bas, et le plasma en haut, où elles forment un anneau opaque de couleur blanchâtre situé juste au-dessus de l'insert en plastique. L'anneau blanchâtre contenant les PBMCs est récupéré au-dessus de la membrane, les cellules sont lavées une première fois et, si besoin, les globules rouges résiduels sont hémolysés à l'aide d'un tampon ACK. Les cellules sont lavées une deuxième fois et le culot cellulaire est repris dans du -milieu complet-. Le nombre de PBMCs et la viabilité cellulaire sont évalués après dilution des cellules dans du bleu Trypan 0,4% (Sigma) et numération sur une cellule de Mallassez en microscopie optique. Pour des raisons d'organisation, l'ensemble des travaux présentés dans ce document a été réalisé avec des cellules décongelées. Les cellules isolées selon la méthode décrite ci-dessus, ont été congelées dans du -milieu complet- complété avec 40% de sérum AB et 10% de DMSO, à l'aide d'une boîte Nalgen permettant une diminution progressive de la température à -80°C, puis stockées à -196°C dans l'azote liquide.

### **III. Enrichissement en lymphocytes T CD4<sup>+</sup> par tri immuno-magnétique**

#### **A. Principe**

Le principe du tri cellulaire immuno-magnétique consiste dans l'isolement d'une sous-population cellulaire grâce à un marquage de cette sous-population par un/des anticorps spécifique(s) couplé(s) à une bille magnétique. Après marquage avec ce(s) anticorps spécifique(s), les cellules sont introduites dans une colonne qui traverse un champ magnétique créé par un aimant. Les cellules entourées de billes métalliques, sont retenues sur la colonne

par cet aimant, alors que les cellules non marquées sont éluées et récupérées dans un premier tube à essai. Les cellules marquées par les billes sont ensuite récupérées dans un deuxième tube par gravité après avoir retiré l'aimant. Il est ainsi possible d'effectuer une sélection positive en marquant les cellules d'intérêt, celles-ci étant alors retenues dans la colonne. Une alternative consiste à effectuer une sélection négative lorsqu'il y a un risque de modification de la fonction cellulaire par l'anticorps ou qu'il n'existe pas de marqueur de ce type cellulaire. On utilise alors une technique de déplétion en marquant toutes les cellules non désirées, celles-ci étant alors retenues dans la colonne, et les cellules désirées étant récupérées dans le premier tube.

## **B. Mode opératoire**

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sont isolés par sélection négative à partir des PBMCs issus de culots cellulaires de cytophérèse, à l'aide d'un kit de sélection négative (CD4<sup>+</sup> isolation kit human, 130-096-533, Miltenyi Biotec). Celui-ci contient un cocktail d'anticorps monoclonaux conjugués à la biotine et spécifiques de différents marqueurs membranaires exprimés à la surface des cellules autres que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (« non T CD4<sup>+</sup> »). Les cellules sont ensuite incubées en présence de micro-billes conjuguées à des anticorps anti-Biotine. La déplétion des cellules « non T CD4<sup>+</sup> » est obtenue par passage dans une colonne soumise à un champ magnétique permettant leur rétention. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sont contenus dans la fraction cellulaire qui n'est pas retenue sur cette colonne.

Après avoir déterminé le nombre de cellules comme précédemment décrit, les cellules sont centrifugées à 300g pendant 10 minutes. Le culot cellulaire est resuspendu dans le tampon de tri à la concentration de 10<sup>7</sup> cellules/40µl. Le tampon de tri (PBS, pH 7,2, 0,5% BSA, 2mM EDTA) doit être dégazé avant utilisation et conservé à 2-8°C. Les cellules sont ensuite marquées par 10µl/10<sup>7</sup> cellules d'un cocktail d'anticorps couplés à la biotine pendant 5 minutes à 2-8°C. Ce cocktail d'anticorps contient des anticorps spécifiques des molécules de surface CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCRγ/δ et CD235a (Glycophorin A) et permet de marquer les cellules mononucléées du sang périphérique : lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, monocytes, neutrophiles, éosinophiles, lymphocytes B, cellules dendritiques, cellules NK, granulocytes, cellules γ/δ et cellules érythroïdes, à l'exclusion des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. A l'issue de cette première incubation, une quantité de 30µl/10<sup>7</sup> cellules est ajoutée, puis 20µl/10<sup>7</sup> cellules de micro-billes magnétiques conjuguées à des anticorps anti-Biotine. Le mélange est incubé 10 minutes à 2-8°C. Après cette étape d'incubation avec les billes magnétiques, les

cellules sont abondamment lavées puis re-suspendues dans 500µl/10<sup>8</sup> cellules de tampon de tri. Les cellules sont alors prêtes à être séparées magnétiquement sur une colonne.

Pendant la dernière étape d'incubation avec les micro-billes magnétiques, une colonne LS est placée sur un support aimanté (MACS Separator) et est lavée par 3 mL de tampon de tri. La suspension cellulaire est ensuite déposée sur la colonne de séparation LS toujours placée sur un support aimanté. Sous la force du champ magnétique, les cellules marquées par les anticorps sont retenues *via* les billes magnétiques dans la colonne. La colonne est lavée par 2x3mL de tampon de tri. Les cellules non marquées par des anticorps sont contenues dans la fraction qui n'est pas retenue sur cette colonne et constituent une suspension enrichie en lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Selon le protocole expérimental dans lequel elles seront utilisées par la suite, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> isolées seront séparées à nouveau en différentes sous-populations fonctionnelles, ou laissées au repos dans une étuve à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, pendant une nuit dans du - milieu complet- contenant 10% de SVF, avant utilisation.

Un marquage des lymphocytes T isolés par cette méthode, par des anticorps anti-CD8 couplés au FITC, anti-B220-PE, anti-CD3-PerCP, anti-CD4-APC permet ultérieurement de vérifier la pureté de la suspension cellulaire obtenue par analyse avec un cytomètre en flux. Cette méthode permet d'obtenir une population de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> pure à 95-98%, proportion qui a été vérifiée pour chaque tri de cellules CD4<sup>+</sup> dans la suite de ce travail.

#### **IV. Identification et isolement des sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> par cytométrie en flux.**

##### **A. Principe de la cytométrie en flux et fonctionnement d'un analyseur et d'un trieur de cellules**

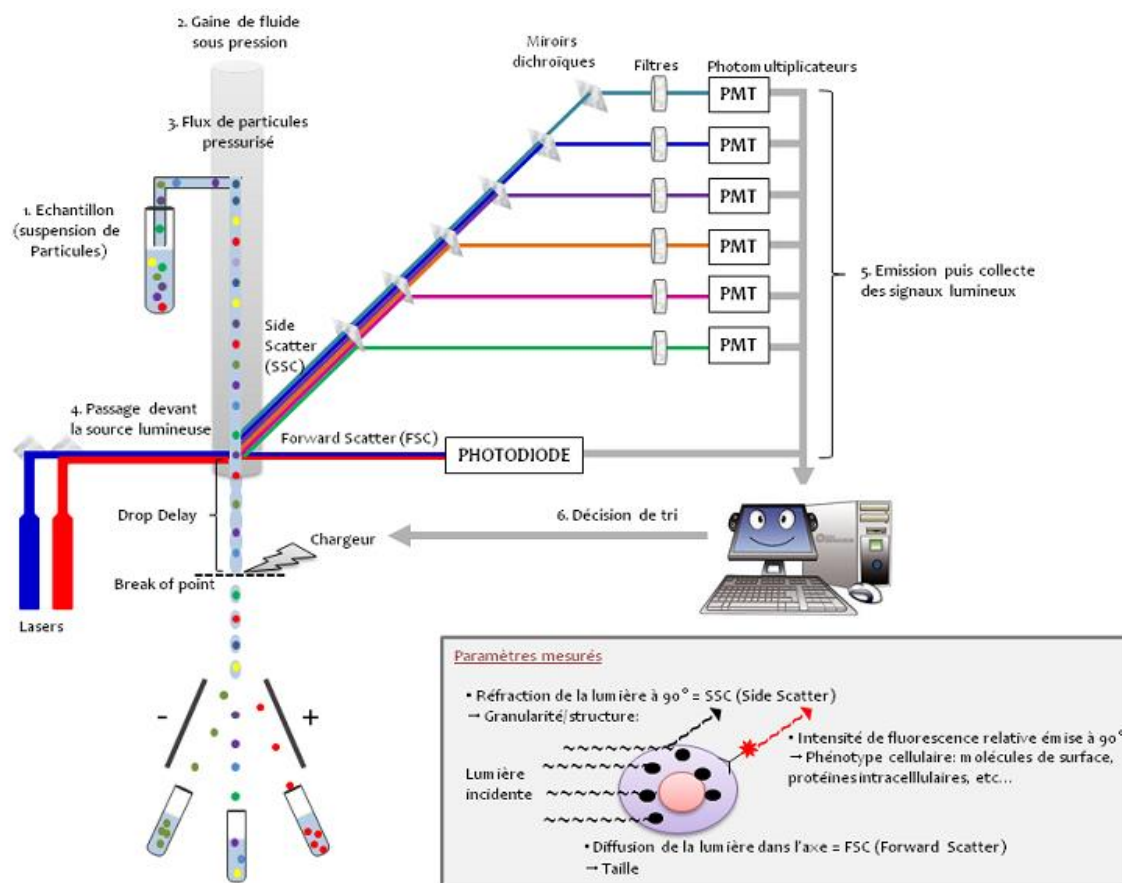
La cytométrie en flux est une technique permettant d'étudier rapidement et sur un grand nombre de particules (cellules, bactéries, billes,...) en suspension dans un milieu liquide, les caractéristiques individuelles de chaque particule telles que la taille, la forme et la complexité et n'importe quel paramètre qui émette de la fluorescence ou puisse être détecté par un composé fluorescent. Cette fluorescence peut être intrinsèque à la particule (fluorescence spontanée ou générée (par ex. par oxydation)), mais est le plus souvent apportée par couplage de la particule à un fluorochrome. Lors de l'excitation d'un fluorochrome par un laser, l'énergie apportée par le laser est absorbée par le fluorochrome, qui réémet l'énergie absorbée par vibration et

dissipation de la chaleur, et émission de photons d'une longueur d'onde plus élevée que la longueur d'onde d'excitation. Dans ce projet, nous avons analysé des cellules marquées par des anticorps couplés à des fluorochromes, ou des sondes émettant de la fluorescence.

Les cellules marquées fluorescentes et en suspension dans un milieu liquide permettant leur survie, sont aspirées par le cytomètre en flux et guidées par un système de pression hydrodynamique, formant une gaine autour de l'échantillon, permettant leur concentration en un flux à cellule unique et donc le passage des cellules l'une après l'autre à vitesse constante, devant un ou plusieurs faisceau(x) laser permettant l'excitation des différents fluorochromes, puis devant des détecteurs qui vont capter les signaux lumineux émis par chaque cellule. Ces signaux sont :

- La lumière diffusée aux petits angles dans l'axe du laser (Forward Scatter ou FSC), proportionnelle au diamètre et au volume cellulaire, qui renseigne sur la taille des cellules.
- La lumière diffusée aux grands angles, à 90° par rapport à l'axe du laser (Side Scatter ou SSC), qui renseigne sur la forme, la structure interne et la granularité des cellules. Cette granularité est le reflet de la complexité intrinsèque de la cellule (densité des organites, irrégularités interne ou de surface).
- Les signaux de fluorescence émis par les cellules, dont l'intensité est proportionnelle au niveau d'expression du paramètre étudié.

Les signaux optiques et de fluorescence émis par les cellules sont focalisés, séparés et dirigés, grâce à un système optique adapté aux différents signaux (ou « banc optique ») constitué d'une alternance de miroirs dichroïques et de filtres, vers des photomultiplicateurs (ou PMT), permettant leur détection, leur amplification et leur conversion en signaux électroniques. Le banc optique permet de sélectionner les longueurs d'ondes destinées à chaque type de PMT (Fig.MM1).



**Fig. MM 1. Principe de la cytométrie en flux.**

Les données d'analyse des signaux lumineux sont restituées sous forme de cytogrammes bivariants (ou *dotplots*) ou d'histogrammes, et de statistiques concernant les paramètres étudiés pour les différentes populations cellulaires (pourcentage d'une population marquée par un fluorochrome donné, intensité de fluorescence moyenne d'un anticorps fluorescent donné,...). La vitesse d'acquisition de données concernant un très grand nombre de cellules *via* cette technologie, fait de la cytométrie en flux un outil très puissant permettant l'analyse de sous-populations cellulaires multiples et/ou rares au sein d'une suspension cellulaire, et, après leur sélection par tri, leur étude par différentes techniques comme la RT-qPCR (« polymerase chain reaction » quantitative en temps réel) ou l'immunocytofluorescence utilisées dans ce travail.

Le tri cellulaire consiste en la séparation physique des cellules d'intérêt à partir d'une population de départ hétérogène. L'expérimentateur, à l'aide d'une analyse multiparamétrique de la suspension cellulaire de départ définit des sous-populations à l'aide d'une stratégie de « gating » (Fig.MM2) qui incrémente les différents marqueurs fluorescents seuls ou combinés selon les étapes (cf. infra), et qui permet de sélectionner et d'isoler toute cellule dont les caractéristiques correspondent aux paramètres d'intérêt définis. L'isolement des cellules sélectionnées par la stratégie de « gating » est rendu possible par la polarisation du fluide de

gaine entourant le flux de cellules. Une onde de vibration d'une fréquence et d'une amplitude déterminées est appliquée au flux de cellules. Celui-ci va alors se rompre pour donner naissance à des gouttes contenant une seule cellule à un point précis caractérisé par sa position et son temps d'apparition appelé « break of point ». Lors du passage d'une cellule devant le laser et le système de détection, les signaux émis par la cellule sont traités par un programme informatique de tri, lequel décide si la cellule doit être isolée ou non, selon les critères définis par l'expérimentateur. La distance entre le passage de la cellule devant le laser et le « break of point » est appelé « drop delay ». Si une cellule d'intérêt devant être triée est détectée, le cytomètre, une fois la cellule arrivée au « break of point », charge la goutte ; celle-ci contient la cellule à trier et, en passant entre des plaques de déflexion fortement chargées, est déviée du côté de la plaque de polarité opposée et collectée. Si la goutte n'appartient pas à une sous-population sélectionnée ou si elle ne contient pas de cellules, elle n'est pas chargée et est éliminée.

## **B. Caractérisation des sous-populations lymphocytaires : stratégie de « gating ».**

Un point essentiel pour la caractérisation des sous-populations cellulaires en cytométrie en flux est de disposer d'anticorps monoclonaux dirigés contre des composants des cellules, et qui sont directement couplés à un fluorochrome, ou révélés par un second réactif couplé au fluorochrome. Ces dernières années, l'identification et la caractérisation des antigènes de surface ou intracellulaires des lymphocytes a progressé très rapidement, mais il est impossible d'identifier un type cellulaire particulier à l'aide d'un seul anticorps ; la caractérisation des différents types lymphocytaires nécessite donc l'utilisation de combinaisons (ou « panels ») de plusieurs anticorps révélés par des fluorochromes différents. En conséquence, l'utilisation simultanée de plusieurs fluorochromes nécessite :

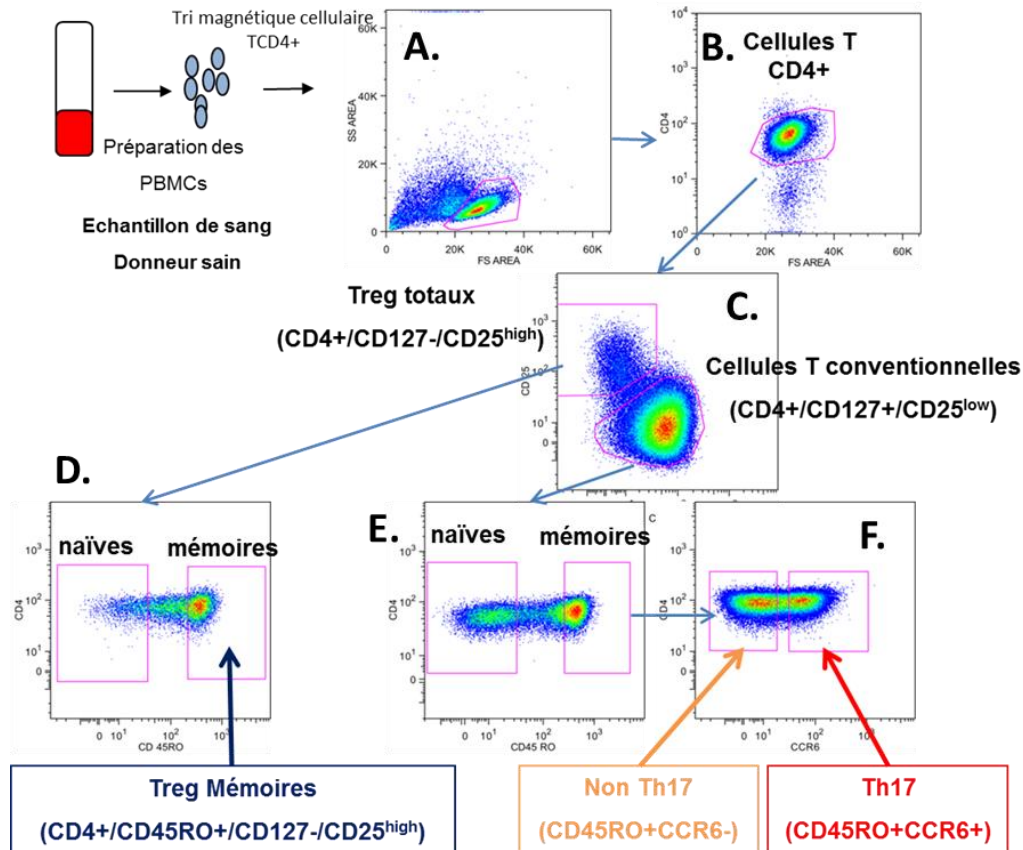
- Que les longueurs d'onde d'excitation des différents fluorochromes correspondent aux sources lumineuses du cytomètre utilisé (405, 488 et 640nm).
- Que leurs longueurs d'onde d'émission soient suffisamment éloignées pour que leurs signaux puissent être analysés séparément.

Néanmoins, il existe des phénomènes de chevauchement des spectres d'émission des différents fluorochromes pouvant entraîner une «contamination » de la fluorescence détectée par un PMT par la fluorescence d'un fluorochrome qui devrait être détectée par un PMT différent. Pour

distinguer les deux types d'émission, il faut donc recourir à l'emploi de systèmes de compensations électroniques. Pour corriger la fluorescence émise par un fluorochrome, perçue en trop par un PMT, on soustrait à ce signal une proportion du signal produit par le PMT destiné à ce fluorochrome. Les valeurs des compensations sont déterminées à l'aide de cellules ou des billes marquées avec un seul des anticorps fluorescents utilisés dans le panel d'anticorps choisis pour caractériser la population cellulaire d'intérêt.

Dans l'ensemble de ce projet, nous nous sommes principalement intéressés aux lymphocytes Th17 mémoires du sang périphérique, que nous avons comparés d'une part aux autres lymphocytes T CD4<sup>+</sup> conventionnels mémoires, appelés dans ce document « non Th17 », consistant en un mélange de lymphocytes d'autres spécificités fonctionnelles, principalement de type Th1 et Th2, et d'autre part aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> régulateurs (Tregs). Dans ce travail, ces différentes sous-populations sont identifiées au sein d'une suspension cellulaire enrichie en lymphocytes T CD4<sup>+</sup> par une procédure de tri immuno-magnétique selon leur expression des marqueurs membranaires suivants (Fig.MM2) :

- Les Tregs totaux sont des cellules T CD4<sup>+</sup> exprimant fortement la sous-unité  $\alpha$  du récepteur de haute affinité à l'IL-2, CD25 (Sakaguchi S, 1995), et exprimant peu la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-7, CD127 (Seddiki N, 2006). Dans ce travail, les Tregs sont définis comme des cellules CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> CD127<sup>-/low</sup>. Au sein des Tregs, nous distinguons des Tregs naïfs n'exprimant pas le marqueur CD45RO (CD45RO<sup>-</sup>) et des Treg mémoires CD45RO<sup>+</sup>.
- Par opposition aux Tregs, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> conventionnels totaux expriment faiblement le marqueur CD25 (CD25<sup>-/low</sup>) et expriment le marqueur CD127. Ces lymphocytes T CD4<sup>+</sup> conventionnels totaux sont ensuite subdivisés en cellules naïves n'exprimant pas le marqueur CD45RO et en cellules mémoires l'exprimant (CD45RO<sup>+</sup>). Parmi ces dernières, on distingue :
  - Les lymphocytes Th17 exprimant le marqueur CCR6<sup>+</sup>, dont dans le recrutement tissulaire est dépendant de la présence de la chimiokine CCL20 (Hirota K, 2007, Annunziato F, 2013, Acosta-Rodriguez EV, 2007) : CD4<sup>+</sup> CD127<sup>+</sup> CD25<sup>low</sup> CD45RO<sup>+</sup> CCR6<sup>+</sup>.
  - Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> « non Th17 » : n'exprimant pas CCR6 : CD4<sup>+</sup> CD127<sup>+</sup> CD25<sup>low</sup> CD45RO<sup>+</sup> CCR6<sup>-</sup>.



**Fig. MM 2. Stratégie de tri permettant d'identifier ou d'isoler les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> T régulateurs, T conventionnels « non Th17 » et Th17.**

Des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sont préalablement isolés à partir de résidus de « cônes » de cytophérèse. Les cellules sont ensuite marquées à l'aide d'une combinaison d'anticorps CD127-PE, CD45RO-ECD, CCR6-PECy7, CD25-APC et CD4-APC eFluor. Les lymphocytes sont identifiés selon leur taille et leur structure (paramètres FSC/SSC) (A.) et les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sont sélectionnés parmi ces lymphocytes (B.). Au sein de ces lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, 2 populations sont identifiées (C.) : lymphocytes T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup> ou Treg totaux, et les T conventionnels totaux CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup>CD127<sup>+</sup>. Les populations de lymphocytes Treg totaux et T conventionnels totaux sont ensuite subdivisées en cellules naïves n'exprimant pas le marqueur CD45RO et en cellules mémoires CD45RO<sup>+</sup> (D. et E.). Enfin, au sein des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> conventionnels mémoires, l'expression de CCR6 permet de distinguer les lymphocytes Th17 CCR6<sup>+</sup> des lymphocytes « non Th17 » CCR6<sup>-</sup> (F.).

Afin de délimiter correctement les cellules positives dans un marquage multiparamétrique il est nécessaire de réaliser un contrôle FMO (Fluorescence Minus One) pour chacun des paramètres analysés. Ce contrôle consiste dans des cellules marquées avec tous les anticorps du panel de

phénotypage SAUF UN ; il permet de définir avec précision la fluorescence maximale émise par un panel d'anticorps couplés à des fluorochromes quand l'anticorps dont on souhaite définir le seuil de positivité est absent du panel et remplacé par son isotype contrôle (anticorps de même isotype mais non spécifique de l'antigène d'intérêt) couplé au même fluorochrome.

## C. Mode opératoire

### 1. Marquages des différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>.

La population cellulaire enrichie en lymphocytes T CD4<sup>+</sup> par la procédure de tri immuno-magnétique est lavée par du tampon de tri (PBS, 0,5% SVF, 2mM EDTA), resuspendue dans ce même tampon (1.10<sup>6</sup> cellules/ 100µL) et incubée 10 minutes en présence de FcR Blocking reagent [1:20] (Miltenyi Biotec) afin de bloquer la liaison des anticorps aux récepteurs Fc présents sur certaines cellules, et prévenir ainsi l'émission de fluorescence non spécifique des différentes molécules reconnues par les anticorps du panel. Les anticorps, aux doses décrites dans la table MM1 sont ajoutés aux suspensions cellulaires qui sont ensuite incubées pendant 20 minutes à 4°C et à l'abri de la lumière. Les cellules sont ensuite lavées et resuspendues dans du tampon de tri (1.10<sup>6</sup> cellules/ 300µL) et conservées sur de la glace (pour éviter l'internalisation de l'anticorps dans la cellule) et à l'abri de la lumière jusqu'à leur analyse sur un cytomètre.

| Anticorps (clone)   | Fluorochrome   | Longueur d'onde d'excitation (nm) | Canal de lecture de la fluorescence (Max Emission [nm]) | Volume d'anticorps/réaction (µL) | Fournisseur     |
|---------------------|----------------|-----------------------------------|---------------------------------------------------------|----------------------------------|-----------------|
| Anti-CD127 (R34.34) | PE             | 488                               | FL-2 (525)                                              | 15                               | Beckman coulter |
| Anti-CD45RO (UCHL1) | ECD            | 488                               | FL-3 (615)                                              | 5                                | Beckman coulter |
| Anti-CCR6 (11A9)    | PE-Cy7         | 488                               | FL-5 (767)                                              | 4                                | BD Biosciences  |
| Anti-CD25 (2A3)     | APC            | 633                               | FL-8 (660)                                              | 3                                | BD Biosciences  |
| Anti-CD4 (RPA-T4)   | APC efluor 780 | 633                               | FL-9 (780)                                              | 3                                | eBiosciences    |

**Table MM 1. Anticorps utilisés pour l'identification des différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>.**

En parallèle des marquages sur les cellules, sont réalisés les différents contrôles nécessaires à l'analyse (Table MM2) : monomarquages sur des billes de compensation (Anti-mouse IgGk negative control compensation particles set, BD Pharmingen) et FMO permettant de définir les seuils de positivité. Les contrôles pour établir les valeurs de compensation entre les différents fluorochromes sont réalisés en ajoutant 1µL de l'anticorps d'intérêt à 100µL de suspension de billes de compensation. Les FMO sont réalisées avec les doses d'anticorps figurant dans la table MM2.

|    | Tube                      | CD127-PE            | CD45RO-ECD           | CCR6-PECy7             | CD25-APC             | CD4-APC eFluor 780          |
|----|---------------------------|---------------------|----------------------|------------------------|----------------------|-----------------------------|
| 1  | Cellules non marquées     | -                   | -                    | -                      | -                    | -                           |
| 2  | Tube expérimental         | +                   | +                    | +                      | +                    | +                           |
| 3  | Contrôles de compensation | +                   |                      |                        |                      |                             |
| 4  |                           |                     | +                    |                        |                      |                             |
| 5  |                           |                     |                      | +                      |                      |                             |
| 6  |                           |                     |                      |                        | +                    |                             |
| 7  |                           |                     |                      |                        |                      | +                           |
| 8  | FMO-CD127                 | Isotype contrôle-PE | +                    | +                      | +                    | +                           |
| 9  | FMO-CD45RO                | +                   | Isotype contrôle-ECD | +                      | +                    | +                           |
| 10 | FMO-CCR6                  | +                   | +                    | Isotype contrôle-PECy7 | +                    | +                           |
| 11 | FMO-CD25                  | +                   | +                    | +                      | Isotype contrôle-APC | +                           |
| 12 | FMO-CD4                   | +                   | +                    | +                      | +                    | Isotype contrôle-eFluor 780 |

**Table MM 2. Descriptif des contrôles à réaliser lors d'un marquage permettant l'identification de différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>.**

L'acquisition des données a été réalisée, selon les expériences (cf IX) :

- Pour les analyses de la production d'ERO à l'aide des sondes DHE (Dihydroéthidine) et H<sub>2</sub>DCF-DA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate), sur un cytomètre Cyan ADP LX7 (Beckman Coulter), équipé de 2 lasers (488 et 640 nm) permettant l'analyse de 2 paramètres de morphologie (taille et granularité) et 7 paramètres de fluorescence. Ce cytomètre permet d'analyser jusqu'à 70 000 événements par seconde. Ces deux sondes peuvent être excitées par le laser 488 nm.
- Pour les analyses de la production d'ERO mitochondriales à l'aide de la sonde MitoSox (mitochondrial-targeted HE), sur un cytomètre LSR Fortessa X20 (BD Biosciences), équipé de 3 lasers (405, 488 et 640 nm) permettant l'analyse de 2

paramètres de morphologie (taille et granularité) et 14 paramètres de fluorescence. Ce cytomètre permet d'analyser jusqu'à 20 000 événements par seconde. En effet, la sonde MitoSox nécessite une excitation par le laser 405 nm.

Les résultats sont ensuite analysés à l'aide du logiciel Flow-Jo (BD Biosciences).

## **2. Tri cellulaire des différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>.**

La population cellulaire enrichie en lymphocytes T CD4<sup>+</sup> par la procédure de tri magnétique est resuspendue à 100.10<sup>6</sup> cellules/200µL dans du tampon de tri et incubées 10 minutes en présence de FcR Blocking reagent [1:20] (130-059-901 Miltenyi biotec). A l'issue de ces 10 minutes, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sont incubés avec les anticorps selon les doses décrites dans la table MM3, pendant 20 minutes à 4°C et à l'abri de la lumière. Les cellules sont ensuite lavées par addition de milieu complet 2,5%SVF froid (400G, 10 minutes). Les cellules sont ensuite reprises dans un volume de milieu complet 2,5%SVF froid (1mL/50-100.10<sup>6</sup> cellules) pour être triées à l'aide d'un cytomètre trieur Influx (BD Biosciences). Ce cytomètre trieur est équipé de 4 lasers (488, 640, 405 et 561nm) permettant l'analyse de 2 paramètres de morphologie (taille et granularité) et 18 paramètres de fluorescence. Il possède jusqu'à 6 voies de tri, et a une température contrôlée de 5 à 95°C.

Les cellules sont récoltées dans des tubes préalablement tapissés (« coatés ») avec du milieu complet contenant 50% de SVF, afin de ne pas endommager les cellules.

| Anticorps (clone)   | Fluorochrome   | Longueur d'onde d'excitation (nm) | Canal de lecture de la fluorescence (Max Emission [nm]) | Volume d'anticorps/100.10 <sup>6</sup> cellules (µL) | Fournisseur     |
|---------------------|----------------|-----------------------------------|---------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|-----------------|
| Anti-CD127 (R34.34) | PE             | 488                               | FL-2 (525)                                              | 48                                                   | Beckman coulter |
| Anti-CD45RO (UCHL1) | ECD            | 488                               | FL-3 (615)                                              | 15                                                   | Beckman coulter |
| Anti-CCR6 (11A9)    | PE-Cy7         | 488                               | FL-5 (767)                                              | 12                                                   | BD Biosciences  |
| Anti-CD25 (2A3)     | APC            | 633                               | FL-8 (660)                                              | 9                                                    | BD Biosciences  |
| Anti-CD4 (RPA-T4)   | APC efluor 780 | 633                               | FL-9 (780)                                              | 9                                                    | eBiosciences    |

**Table MM 3. Anticorps utilisés pour l'identification des différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>.**

En parallèle des marquages sur les cellules, sont réalisés les différents contrôles nécessaires à l'analyse (Table MM4) : monomarquages sur des billes de compensation et FMO. Les contrôles de compensation sont réalisés en ajoutant 1µL de l'anticorps d'intérêt à 100µL de suspension de billes de compensations. Les FMO sont réalisées sur 1.10<sup>6</sup> cellules avec les doses d'anticorps décrites dans la table MM4.

|   | Tube                      | CD127-PE                        | CD45RO-ECD                       | CCR6-PECy7                                            | CD25-APC                                              | CD4-APC eFluor 780               |
|---|---------------------------|---------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|----------------------------------|
| 1 | Cellules non marquées     | -                               | -                                | -                                                     | -                                                     | -                                |
| 2 | Contrôles de compensation | +                               |                                  |                                                       |                                                       |                                  |
| 3 |                           |                                 | +                                |                                                       |                                                       |                                  |
| 4 |                           |                                 |                                  | +                                                     |                                                       |                                  |
| 5 |                           |                                 |                                  |                                                       | +                                                     |                                  |
| 6 |                           |                                 |                                  |                                                       |                                                       | +                                |
| 7 | FMO-CCR6                  | 24µl/1.10 <sup>6</sup> cellules | 7,5µl/1.10 <sup>6</sup> cellules | 6µL Isotype contrôle-PECy7/1.10 <sup>6</sup> cellules | 4,5µl/1.10 <sup>6</sup> cellules                      | 4,5µl/1.10 <sup>6</sup> cellules |
| 8 | FMO-CD25                  | 24µl/1.10 <sup>6</sup> cellules | 7,5µl/1.10 <sup>6</sup> cellules | 6µl/1.10 <sup>6</sup> cellules                        | 4,5µl Isotype contrôle-APC/1.10 <sup>6</sup> cellules | 4,5µl/1.10 <sup>6</sup> cellules |

**Table MM 4. Descriptif des contrôles à réaliser lors d'un marquage permettant l'identification des différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>.**

A l'issue du tri, un aliquot de chaque sous-population de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> est conservé et l'absence de contamination par une autre sous-population cellulaire est vérifiée toujours par cytométrie en flux et à l'aide du panel d'anticorps décrit précédemment.

Les cellules triées sont, quant à elles, lavées (400G, 10 minutes) et remises en suspension dans du milieu complet contenant 10%SVF ou SAB selon le protocole expérimental dans lequel elles seront utilisées par la suite, et laissées au repos sur la nuit à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Cette étape permet de mettre au repos ou d'induire la mort cellulaire des cellules préactivées obtenues après tri. Il s'agit d'une étape de « pseudo synchronisation » par la mise en quiescence des cellules triées.

## **V. Numération et analyse de la viabilité cellulaire par coloration au bleu de Trypan.**

### **A. Principe**

Le bleu de Trypan est un colorant vital permettant la coloration en bleu des cellules mortes. Cette spécificité permet de l'utiliser pour faire une estimation de la proportion de cellules viables dans une suspension cellulaire.

Le bleu de Trypan est capable d'entrer dans toutes les cellules qu'il rencontre. Une fois dans la cellule, le colorant entraîne un mécanisme d'exclusion qui va provoquer son éjection dans le milieu extérieur. Ce mécanisme nécessitant de l'énergie et une barrière cytoplasmique active, seules les cellules vivantes produisant de l'ATP seront capables d'expulser le bleu de Trypan, et resteront blanches lors d'une observation au microscope optique. Les cellules mortes ne seront pas capables d'expulser le colorant et resteront bleues. Plus simplement, il est admis que le bleu de Trypan colore uniquement les cellules dont la membrane cellulaire est endommagée, donc les cellules mortes. Il est important de noter que cette molécule étant toxique, les cellules exposées au bleu de Trypan finissent toutes par mourir donc devenir bleues au bout de 15 minutes, donc la numération cellulaire doit être faite rapidement.

### **B. Mode opératoire**

La viabilité cellulaire est évaluée par dilution des suspensions cellulaires dans une solution de bleu de Trypan (dilution au 1:5 dans du NaCl 0,9%) et numération en microscopie optique des cellules vivantes et mortes sur un hématimètre, une cellule de Malassez. Celle-ci comporte un quadrillage (10 lignes de 10 rectangles). Sur cette cellule, plusieurs lignes sont comptées et la

moyenne de ces comptages multipliée par 10, soit le nombre de cellules pour 10 lignes comptées, est utilisé pour calculer la concentration cellulaire de la suspension. Pour que la numération soit fiable, il faut avoir compté une centaine de cellules. Le volume de la cellule de Malassez étant de 1µL, il faut multiplier le résultat par 1000 pour obtenir le nombre de cellules par mL. Il faut donc employer la formule suivante :

$$\begin{aligned} (Nb. \text{ Cellules/ligne}) * 10 * \text{facteur de dilution} * 1000 &= Nb. \text{ Cellules/mL} \\ (Nb. \text{ Cellules/mL}) * \text{volume de la suspension cellulaire} &= Nb. \text{ total de cellules} \end{aligned}$$

Le pourcentage de viabilité est ensuite calculé par rapport au nombre de cellules mises en culture (Nb. Cellules T0).

$$(Nb. \text{ cellules total} / Nb. \text{ cellules T0}) * 100 = \% \text{ viabilité}$$

## VI. Analyse de l'activité $\beta$ -galactosidase.

### A. Principe

L'augmentation de l'activité de l'enzyme lysosomale, la  $\beta$ -galactosidase, est une caractéristique des cellules sénescents. La mise en évidence de la présence de l'enzyme est réalisée par la mesure de son activité en apportant un substrat, un dérivé du galactose, le X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside), incolore, et qui une fois hydrolysé par l'enzyme donne un composé bleu observable en microscopie optique. Dans des conditions physiologiques normales, l'activité enzymatique de la  $\beta$ -galactosidase est détectable dans les lysosomes à un pH optimal de 4,0. Dans les cellules sénescents, la masse lysosomale est augmentée ce qui a pour effet une augmentation de l'expression de la  $\beta$ -galactosidase. L'abondance de l'enzyme permet alors une détection de son activité à un pH non optimal (pH 6,0). Dans ces conditions, les cellules sénescents présentent un marquage bleu périnucléaire sous forme de grains très denses dans les cellules positives.

### B. Mode opératoire

L'analyse de l'activité  $\beta$ -galactosidase est effectuée à l'aide d'un kit (Cell signaling #9860) utilisé conformément aux instructions du fabricant.

Des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Treg/Th17 CCR6<sup>+</sup>/« non Th17 » CCR6<sup>-</sup> obtenus par tri comme décrit précédemment sont re-suspendus à la concentration de [1.10<sup>6</sup> cellules/ml] dans du milieu complet contenant 2,5% de SVF, et exposés ou non à 5 % de condensat de fumée de cigarette,

pendant 48 heures à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>. La stimulation est arrêtée en lavant les cellules dans un volume équivalent de PBS froid.

Les cellules (1.10<sup>5</sup>/5μL/condition expérimentale) sont étalées sur des lames « superfrost-plus » (Thermo scientific J1800AMNZ). Ensuite, les cellules/lames sont lavées par du PBS, puis incubées à température ambiante pendant 15 minutes dans une solution de fixation contenant 0,2% glutaraldéhyde et 2% formaldéhyde. Puis, les cellules/lames sont incubées à 37°C sur la nuit dans une solution de marquage tamponnée à pH6, et supplémentée en potassium ferrocyanide (5mM), ferricyanide (5mM) et une solution de substrat X-gal préparée à 1 mg/ml dans du N-N-diméthylformamide (DMF). La solution de marquage est ensuite retirée, et remplacée par un milieu de montage 1X PBS-70% glycérol afin de conserver la coloration. Puis des lamelles sont déposées sur les lames, et l'ensemble lames - lamelles est scellé avec du vernis. Les lames sont observées avec un microscope Axioplan 2 imaging (Zeiss), les observations sont réalisées à l'aide d'un objectif Plan-Neofluar x40/0,75, et les images sont obtenues par la caméra Zeiss MRc ; le logiciel Zen 2012 pilote le microscope et la caméra. Pour chaque condition expérimentale, 8 à 10 champs distincts représentatifs sont photographiés. Un nombre minimum de 600 cellules par condition expérimentale est compté. Le pourcentage de cellules présentant un marquage positif pour la β-galactosidase est exprimé par rapport au nombre de cellules totales du champ. Les comptages sont réalisés par deux observateurs indépendants.

## VII. Exposition à différents modes d'agression oxydante.

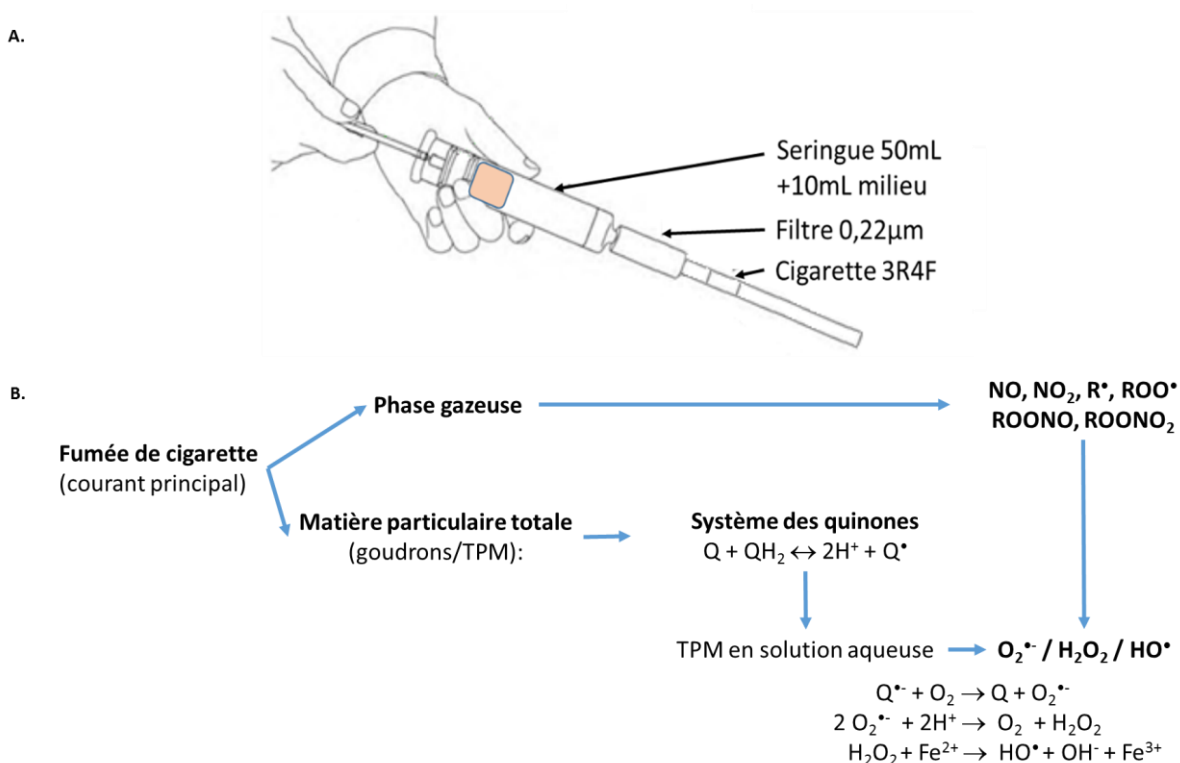
### A. Préparation du condensat de fumée de cigarette et exposition *in vitro*.

La fumée de cigarette provient d'une marque de cigarettes de référence 3R4F (9,4mg de goudrons, 0,7mg de nicotine, 11,7mg de matière particulaire totale [Total Particulate Matter/TPM], 12mg CO par cigarette) (Université du Kentucky, Kentucky, USA). La fumée de cigarette issue du courant principal est condensée à l'aide d'un système de « bullage d'air » qui permet de solubiliser les particules solubles contenues dans la fumée de cigarette dans du milieu de culture. Le CFC est généré extemporanément, par aspiration de la fumée d'une cigarette au moyen d'une seringue de 50mL, contenant 10mL de milieu complet sans sérum, reliée à un filtre de 0,22μM sur lequel est fixé un porte-cigarette (Fig.MM3 A.). Le condensat est obtenu par plusieurs cycles consécutifs d'aspirations de 40mL de fumée de cigarette et mélange

pendant 30 secondes de la fumée et du milieu. A la fin de chaque cycle, la fumée est relarguée à l'extérieur de la seringue. La procédure s'arrête juste avant que la cigarette soit consommée jusqu'au filtre. Le pH du CFC est corrigé et ajusté à pH 7,4, et l'absorbance à 320 nm est mesurée à l'aide d'un lecteur de plaque Tecan (Infinite M200 Pro, Tecan). Seules les préparations de CFC présentant une valeur d'absorbance à 320 nm supérieure à 0,42 sont utilisées. (Aoshiba K, 1994, Tsuji T, 2004, Glader P, 2006, Jason Adamson 2011, Li F, 2012, Xu Y, 2013).

Le CFC obtenu est complété avec 2,5% de SVF ou 10% de SAB puis filtré sur une membrane de 0,45µm, et constitue un CFC à la concentration « 100% ». Le CFC est ensuite utilisé aux concentrations 5 et/ou 10% selon les expériences et est obtenu par dilution du CFC « 100% » dans du milieu complet contenant 2,5% de SVF/SAB. La toxicité du CFC et le choix de ces doses ont été déterminés préalablement par numération et analyse de la viabilité cellulaire par coloration au bleu de Trypan des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> en réponse à une exposition à des doses croissantes de CFC.

Ce système reproduit les conditions rencontrées lors de la consommation d'une cigarette. Lorsqu'un fumeur inhale une bouffée de cigarette, la fumée se retrouve dans un environnement particulièrement humide et se dépose dans le fluide recouvrant les cellules épithéliales du tractus respiratoire. Des ERO et des ERN sont retrouvées dans les solutions aqueuses de CFC, mais ne se forment pas toutes dans la cigarette en combustion. Au contraire, elles se forment en solution aqueuse ou dans les fluides physiologiques à la suite de réaction entre les différents composés de la fumée de cigarette entre eux, ou avec l'oxygène en solution (Fig.MM3 B.) (Wooten JB, 2006).



**Fig. MM 3. Dispositif de préparation et oxydants présents dans le condensat de fumée de cigarette.**

**(A.)** Le condensat de fumée de cigarette (CFC) est généré, par aspiration du courant principal de la fumée d'une cigarette au moyen d'une seringue de 50mL, contenant 10mL de milieu complet sans sérum, reliée à un filtre de 0,22µm sur lequel est fixé un porte-cigarette. Le CFC est obtenu par plusieurs cycles consécutifs d'aspirations de 40mL de fumée de cigarette et mélange pendant 30 secondes de la fumée et du milieu. A la fin de chaque cycle, la fumée est relarguée à l'extérieur de la seringue. La procédure s'arrête juste avant que la cigarette soit consommée jusqu'au filtre. **(B.)** La fumée de cigarette est divisée en une phase gazeuse et une phase particulaire. La phase gazeuse contient d'importantes quantités de radicaux libres. En particulier, l'oxydation du NO par l'O<sub>2</sub> conduit à la formation de NO<sub>2</sub> capable de réagir avec d'autres composants de la fumée de cigarette tels que les composés isoprènes, et est à l'origine de l'apparition de radicaux libres « centrés sur le carbone » (R<sup>•</sup>) qui pourront à leur tour réagir avec l'O<sub>2</sub> pour former des radicaux peroxydes (ROO<sup>•</sup>). La phase particulaire présente de fortes concentrations de radicaux (10<sup>17</sup> spins/g) dont une semiquinone (Q<sup>•</sup>), dérivée du benzène présent dans cette phase, en équilibre avec des quinones (Q) et des hydroquinones (QH<sub>2</sub>). Ce système des quinones est soluble en milieu aqueux et est retrouvé dans les préparations de CFC. Ce système réduit l'oxygène en O<sub>2</sub><sup>•-</sup> qui ensuite est dismuté en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. De plus, en présence

*de métaux, via une réaction de Fenton,  $H_2O_2$  peut générer de  $l'HO^\bullet$  (d'après Pryor WA, 1993, Wooten JB, 2006, Valavanidis A, 2009).*

## **B. Induction d'ERO par exposition au TBHP.**

Le *tert*-butyl Hydrogen peroxide ou TBHP (Luperox TBH70 solution 458139, Sigma Aldrich) à la concentration de  $250\mu M$  est utilisé comme contrôle positif d'induction de la production d'ERO lors d'une agression oxydante aigue d'origine exogène (30 minutes). La métabolisation du TBHP par les cellules nécessite l'intervention du cytochrome P450 et conduit à la production de radicaux libres de l'oxygène, des radicaux peroxydes et alkoxydes susceptibles d'initier une peroxydation des phospholipides membranaires. (Kucera O, 2014).

Le TBHP est préparé à partir d'une solution stock de TBHP 70% à 7,22M, et est utilisé après dilution dans du milieu complet 2,5% de SVF à la concentration finale de  $250\mu M$ .

# **VIII. Traitement des cellules par différents inhibiteurs pharmacologiques.**

## **A. La N-acétylcystéine (NAC).**

La NAC (Sigma Aldrich A7250-100G) est un précurseur de la L-cystéine et du glutathion réduit, mais également un agent piègeur des radicaux libres capable d'interagir avec  $HO^\bullet$  et  $l'H_2O_2$  (Zafarullah M, 2002). Dans les lymphocytes T, les temps d'incubation avec la NAC permettant de reconstituer les stocks de glutathion réduit sont de 24H (Maurice MM, 1997). Dans notre travail, le temps du pré-traitement avec la NAC est d'1H30 ; dans ces conditions l'effet de la NAC est celui d'un agent piègeur des ERO produites par la cellule en réponse à une agression oxydante, ou ERO apportées par l'agent à l'origine de l'agression oxydante (le CFC dans ce travail).

La concentration optimale d'utilisation de la NAC, 10mM, a été déterminée par des tests d'effet-dose de la NAC sur le niveau d'ERO des lymphocytes T  $CD4^+$  marqués avec la sonde  $H_2DCF-DA$ , en présence ou non de condensat de fumée de cigarette. Des tests de toxicité utilisant le 7-actinomycine D (7-AAD) ont préalablement été réalisés. La NAC est solubilisée dans de l'eau afin d'obtenir une solution mère à 610mM, puis est diluée dans le milieu de culture à une concentration finale d'utilisation de 10mM.

Préalablement à une agression oxydante, les cellules sont prétraitées par la NAC à 10mM pendant 1H30 à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Les cellules sont ensuite lavées (400G, 10 min), et la NAC est ajoutée à nouveau en même temps que le CFC pour la durée d'exposition au condensat.

### **B. Le p-trifluoromethoxy-carbonyl-cyanide-phenyl hydrazone (FCCP).**

Le FCCP (Sigma Aldrich C2920-10MG) est un protonophore et un agent découplant de la chaîne électronique mitochondriale. Il a pour effet de dissiper le  $\Delta\Psi_m$  mitochondrial ce qui conduit à une baisse de la production d'ERO d'origine mitochondriale.

La concentration optimale d'utilisation du FCCP, 2 $\mu$ M, a été choisie en analysant l'effet d'une gamme de concentration de FCCP sur le niveau d'ERO des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> marqués avec la sonde H<sub>2</sub>DCF-DA, en présence ou non de condensat de fumée de cigarette.

La procédure d'utilisation du FCCP est identique à celle de la NAC : les cellules sont incubées pendant 30min avec 2 $\mu$ M de FCCP (solution stock à 10mM diluée dans du DMSO) avant l'exposition au condensat de fumée de cigarette. Le FCCP est ajouté à nouveau au milieu de culture, à T0, en même temps que le condensat de fumée de cigarette. L'effet du DMSO seul, à la même concentration, a été contrôlé dans les différentes conditions expérimentales.

### **C. Antimycine et roténone.**

L'antimycine (Sigma Aldrich A8674) est un inhibiteur de la chaîne de transport des électrons dans la mitochondrie. Elle inhibe le passage des électrons dans le complexe III en bloquant le passage des électrons du cytochrome b au cytochrome C1.

La roténone (Sigma Aldrich R8875) est également un inhibiteur de la chaîne électronique mitochondriale au niveau de la NADH-coenzyme Q oxidoréductase ou complexe I.

La concentration optimale d'utilisation de l'antimycine, 0,5 $\mu$ M, a été choisie en analysant l'effet d'une gamme de concentrations sur le niveau d'ERO des lymphocytes TCD4<sup>+</sup> marqués avec la sonde H<sub>2</sub>DCF-DA, en présence ou non de condensat de fumée de cigarette. La concentration de roténone, 2 $\mu$ M, a été choisie d'après les données de la littérature (Sena LA, 2013).

L'antimycine (solution stock à 10mM diluée dans du DMF) est utilisée seule, ou en mélange avec la roténone (solution stock à 10mM diluée dans du DMF). Les cellules sont pré-incubées avec les inhibiteurs pendant 30 minutes. Le/les inhibiteurs sont ajoutés à nouveau au milieu de

culture, à T0, en même temps que le condensat de fumée de cigarette. L'effet du DMF seul, à la même concentration, a été contrôlé dans les différentes conditions expérimentales.

#### **D. Inhibiteurs des MAP kinases kinases : UO126 et PD98059.**

Le UO126 (1,4-diamino-2,3 dicyano-1,4-bis [2-aminophénylthio] butadiène) (Merck Millipore 662005) est un inhibiteur de MEK1 et MEK2. Le PD98059 (Merck Millipore 513000) est un inhibiteur de MEK1. L'activation de MEK1 et MEK 2 se fait par phosphorylation des sérines 217 et 221 par les molécules de type Raf. Les formes actives de MEK1 et 2 sont ensuite capables de phosphoryler ERK1/2. Le UO126 peut inhiber l'activité catalytique des formes actives de MEK1. Le PD98059 agit lui en se liant aux formes inactives de MEK1 prévenant ainsi son activation par des activateurs situés en amont tels que c-Raf. Cette différence d'action du UO126 s'explique par son affinité plus importante pour MEK1 en comparaison de celle du PD98059.

Les cellules sont pré-incubées avec le UO126 à une concentration de 5µM, ou le PD98059 à une concentration de 10µM pendant 30 minutes. Les inhibiteurs sont ajoutés à nouveau au milieu de culture, à T0, en même temps que le condensat de fumée de cigarette.

### **IX. Analyse par cytométrie en flux de la production d'espèces réactives de l'oxygène dans les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> exposés au condensat de fumée de cigarette.**

#### **A. Principe**

La sonde H<sub>2</sub>DCF-DA (Invitrogen C6827) est un composé non fluorescent lipophile capable de traverser la membrane plasmique des cellules ce qui lui permet de se fixer au niveau des régions lipidiques hydrophobes intracellulaires. Les estérases cellulaires hydrolysent les groupements acétates et libèrent ainsi la molécule non fluorescente H<sub>2</sub>DCF. 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<sub>2</sub>DCF non fluorescente s'oxyde en présence d'ERO, de peroxydases, Fe<sup>2+</sup> ou cytochrome c, pour former le DCF qui est fluorescent (λ<sub>Ex</sub> Max= 488 nm ; λ<sub>Em</sub> Max= 520 nm). Aussi l'intensité de fluorescence est directement proportionnelle à la quantité d'ERO présents dans la cellule (Rothe G, 1990, LeBel CP, 1992, Tsuchiya M, 1994). La fluorescence est donc détectée à l'intérieur de la cellule dans les

différents compartiments cellulaires (cytosol, espace intermembranaire mitochondrial...) (Karlsson M, 2010). Une augmentation de la fluorescence du DCFDA indique une oxydation par les radicaux peroxydes, peroxynitrite et/ou les radicaux hydroxyles. De plus l'augmentation de la fluorescence du DCFDA est proportionnelle à la concentration intracellulaire en  $H_2O_2$  (Eruslanov E, 2010). En conséquence, le niveau d' $H_2O_2$  d'une cellule donnée peut être déterminé par la mesure de fluorescence provenant de la sonde  $H_2DCF$  oxydée.

Selon le même principe, la sonde DHE (Invitrogen D1168) est une forme réduite du bromure d'éthidium (BET), non fluorescente, et pénètre facilement dans les cellules. Elle est ensuite oxydée en présence d' $O_2^{\cdot-}$  en BET, un agent intercalant de l'ADN ( $\lambda_{Ex} \text{ Max} = 488 \text{ nm}$  ;  $\lambda_{Em} \text{ Max} = 575 \text{ nm}$ ) (Stowe DF, 2009). Cette sonde mesure la production d'anions superoxydes intracellulaires. Néanmoins, cette sonde peut également être oxydée par les cytochrome c lorsque celui-ci est relarguée dans les cellules apoptotiques (Gomes A, 2005).

Enfin, le MitoSox Red (Invitrogen M36008) est un dérivé cationique de la dihydroéthidine. Il pénètre dans les cellules vivantes et se fixe spécifiquement aux mitochondries. Une fois dans la mitochondrie, le MitoSox Red est oxydé par les anions superoxydes et émet une fluorescence rouge ( $\lambda_{Ex} \text{ Max} = 510 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{Em} \text{ Max} = 580 \text{ nm}$ ). Ce fluorochrome est oxydé par les anions superoxydes, et faiblement par d'autres ERO. Cette sonde mesure spécifiquement la production mitochondriale d'anions superoxydes.

## **B. Mode opératoire**

Une suspension cellulaire préalablement enrichie en lymphocytes T  $CD4^+$  par tri immunomagnétique est mise en suspension à  $1.10^6$  cellules/ml dans du milieu de culture complet contenant 2,5% de SVF dans des tubes de 5mL à fond rond (Falcon) et, quand indiqué dans la légende des figures, pré-traitée par des traitements antioxydants ou pharmacologiques (*cf* VIII). Après le pré-traitement, les cellules sont lavées et pré-incubées avec 0,25  $\mu\text{M}$  de sonde  $H_2DCF$ -DA (Life technologies, C6827) ou 1 $\mu\text{M}$  de DHE (Life technologies D1168), pendant 45 minutes à 4°C et à l'abri de la lumière.

Les cellules sont ensuite resuspendues dans du milieu complet contenant 2,5% de SVF, 0,25  $\mu\text{M}$  de sonde  $H_2DCF$ -DA ou 1 $\mu\text{M}$  de DHE, et soumises à une agression oxydante aiguë induite soit par l'addition de 250 $\mu\text{M}$  de TBHP, ou par l'exposition au CFC à 5 ou 10% (*cf* VII.A.) pendant 30 minutes à 37°C, 5%  $CO_2$  ( $1.10^6$  cellules/ 200 $\mu\text{L}$ ), en présence ou non des traitements anti-oxydants ou pharmacologiques.

Dans le cas d'une analyse de la production d'ERO mitochondriales à l'aide de la sonde MitoSox Red (Invitrogen M36008), les cellules sont re-suspendues dans du milieu complet contenant 2,5% de SVF, et exposées au CFC à 5% pendant 30 minutes à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> (1.10<sup>6</sup> cellules/ml). La sonde MitoSox est rajoutée dans le milieu de culture à la concentration de 5 µM, 10 minutes avant la fin de l'exposition au CFC.

Les cellules sont ensuite lavées par du tampon de tri, marquées par les anticorps permettant de distinguer les sous-populations de cellules produisant des ERO, et analysées sur un cytomètre Cyan ADP LX7 (Beckman Coulter) pour les expériences avec les sondes H<sub>2</sub>DCF-DA et DHE, ou sur un cytomètre LSR Fortessa X20 (BD Biosciences) pour les expériences avec le MitoSox. Les résultats sont ensuite analysés à l'aide du logiciel Flow-Jo (BD Biosciences).

## **X. Analyse par immunocytofluorescence de l'expression de différentes protéines dans les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> exposés au condensat de fumée de cigarette.**

### **A. Principe**

L'immunocytofluorescence consiste à mettre en évidence l'expression et la localisation d'une protéine dans des cellules ou des tissus, à l'aide d'anticorps spécifiques de cette protéine couplés directement à un fluorophore, ou qui pourront être eux-même mis en évidence à l'aide d'un anticorps « secondaire » couplé au fluorophore. Les cellules marquées par les fluorophores pourront être détectées et analysées à l'aide d'un microscope à fluorescence, ou épifluorescence. Celui-ci dispose d'une source lumineuse suffisamment puissante et de longueur d'onde appropriée pour exciter les fluorophores qui vont émettre des photons qui pourront être détectés.

### **B. Analyse de l'expression de p16<sup>INK4a</sup>.**

Des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Treg/ Th17 CCR6<sup>+</sup> / « non Th17 »CCR6<sup>-</sup> obtenus comme décrit précédemment sont re-suspendus à la concentration de [1.10<sup>6</sup> cellules/ml] dans du milieu complet contenant 2,5% de SVF. Les cellules peuvent être pré-traitées (ou non) par différents traitements anti-oxydants ou des inhibiteurs pharmacologiques comme décrit précédemment, puis être exposées (ou non) à 5 % de condensat de fumée de cigarette, pendant 24 heures à 37°C

et 5% CO<sub>2</sub>. La stimulation est arrêtée en lavant les cellules dans un volume équivalent de PBS froid.

Les cellules ( $1.10^5/5\mu\text{L}/\text{condition}$  expérimentale) sont ensuite étalées sur des lames « superfrost-plus » (Thermo scientific J1800AMNZ), fixées et perméabilisées avec du PBS contenant 4% de formaldéhyde pendant 10 minutes à température ambiante. Après 3 lavages avec du PBS 1X, les cellules sont incubées dans un milieu de saturation des sites non-spécifiques : PBS 1X contenant 0,3% de Triton X-100 et 5% de sérum de l'espèce dans laquelle a été produit l'anticorps secondaire, ici du sérum de chèvre. Les cellules sont ensuite incubées en présence d'un anticorps anti-p16<sup>INK4a</sup> (Abcam ab108349) dilué au 1:250 dans du PBS, 0,3% Triton X-100, 0,1% BSA, ou en présence de l'isotype contrôle correspondant à la même concentration, à 4°C pendant 24 heures. A l'issue de cette incubation, les cellules sont lavées 3 fois avec du PBS, et incubées 1 heure, à température ambiante et à l'abri de la lumière, en présence de l'anticorps secondaire « goat anti rabbit » conjugué Alexa 594 (Invitrogen A11012), dilué au 1:200 dans du PBS, 0,3% Triton X-100, 0,1% BSA. Les cellules sont ensuite lavées 3 fois avec du PBS, et du milieu Prolong Gold + DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) (Invitrogen P36931) est rajouté. Les lames sont enfin recouvertes d'une lamelle et observées avec un microscope Axioimager M2 (Zeiss) doté de 4 diodes lasers (405, 488, 555 et 639 nm) pour la fluorescence permettant la détection et l'analyse des molécules fluorescentes les plus utilisées en recherche biologique (DAPI, A488/FITC, A547/TRITC, To-Pro3/Cy5). Les observations sont faites avec un objectif Plan-Neofluar au grossissement x40/0,75. Les images sont obtenues par la caméra monochrome Zeiss MRm. Le logiciel Zen 2012 pilote le microscope et la caméra. Pour chaque condition, 8 à 10 champs distincts représentatifs de l'ensemble de la condition expérimentale analysée sont photographiés. Un nombre minimum de 600 cellules par condition expérimentale est compté. Le pourcentage de cellules présentant un marquage positif pour p16<sup>INK4a</sup> est exprimé par rapport au nombre de cellules totales du champ. Les comptages sont réalisés par deux observateurs indépendants.

### **C. Analyse par immunocytofluorescence de la phosphorylation et de la localisation de ERK1/2.**

Des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Treg/ Th17CCR6<sup>+</sup> / « non Th17 » CCR6<sup>-</sup> obtenus comme décrit précédemment sont re-suspendues à la concentration de [ $1.10^6$  cellules/ml] dans du milieu complet contenant 2,5% de SVF. Les cellules sont ré-traitées (ou non) par différents traitements anti-oxydants ou des inhibiteurs pharmacologiques comme décrit précédemment, avant d'être

exposées (ou non) à 5 ou 10% de CFC pendant 15 minutes à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>. Un témoin positif de phosphorylation de ERK1/2 est réalisé par une stimulation par du PMA (200 nM) pendant 15 minutes. La stimulation est arrêtée en lavant les cellules dans un volume équivalent de PBS froid contenant des inhibiteurs dirigés contre un large spectre de phosphatases (fluorure de sodium 10mM, orthovanadate de sodium 1mM). Les inhibiteurs de phosphatases sont ajoutés à chaque étape de la procédure suivante.

Les cellules (1.10<sup>5</sup>/5µL/condition expérimentale) sont étalées sur des lames « superfrost-plus » (Thermo scientific J1800AMNZ), fixées et perméabilisées avec du PBS contenant 4% de formaldéhyde pendant 15 minutes à température ambiante. Les cellules sont ensuite lavées 3 fois avec du PBS, puis incubées dans du PBS contenant 0,3% de Triton X-100 pendant 30 minutes à température ambiante. Les cellules sont ensuite « surfixées » dans du PBS contenant 50% de méthanol pendant 15 minutes à 4°C. Après 3 lavages avec du PBS, les sites non spécifiques de liaison des anticorps sont saturés à l'aide de sérum normal de chèvre dilué à 5% dans PBS contenant 0,3% de Triton X-100, pendant 1 heure à température ambiante. Puis les cellules sont incubées en présence d'un anticorps spécifique de la forme phosphorylée d'ERK1/2 (Cell signaling #9101) dilué au 1:25 dans du PBS, 0,3% Triton X-100, 0,1% BSA, ou l'anticorps d'isotype -contrôle correspondant, à la même concentration, à 4°C pendant 48 heures. Les cellules sont ensuite à nouveau lavées 3 fois avec du PBS, et incubées 1 heure, à température ambiante et à l'abri de la lumière, en présence de l'anticorps secondaire « goat anti rabbit » conjugué Alexa 488 (Invitrogen A11008), dilué au 1:5.000 dans du PBS, 0,3% Triton X-100, 0,1% BSA. Les cellules sont ensuite lavées 3 fois avec du PBS, et du milieu Prolong Gold + DAPI (Invitrogen P36931) est rajouté. Les lames sont enfin recouvertes d'une lamelle et observées, comme précédemment, au microscope Axioimager M2 (Zeiss) et à l'objectif Plan-Neofluar au grossissement x40/0,75. Pour chaque condition, 8 à 10 champs distincts représentatifs de l'ensemble de la condition expérimentale analysée sont photographiés. Un nombre minimum de 600 cellules par condition expérimentale est compté. Le pourcentage de cellules présentant un marquage phospho-ERK1/2 cytoplasmique ou cytoplasmique et nucléaire est exprimé par rapport au nombre de cellules totales du champ. Les comptages sont réalisés par deux observateurs indépendants.

## **XI. Analyse de l'expression des gènes par réaction de polymérisation en chaîne après transcription inverse, quantifiée en temps réel (RT-qPCR) dans les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> exposés au condensat de fumée de cigarette.**

### **A. Conditions de culture et exposition des cellules au condensat de fumée de cigarette.**

Des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Treg/ Th17 CCR6<sup>+</sup>/ « non Th17 » CCR6<sup>-</sup> préalablement triés et laissés au repos pendant la nuit dans du milieu complet contenant 10% de SAB (37°C, 5% CO<sup>2</sup>) sont lavés et remis en suspension à la concentration de [1.10<sup>6</sup> cellules/ml] dans du milieu complet contenant 10% de SAB, et mis en culture dans des plaques 96 puits à fond rond, en présence ou non de 5% de CFC, pendant 48H à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>. Des cultures stimulées par un mélange d'anticorps anti-CD3ε préalablement fixés sur les plaques, et d'anticorps anti-CD28 solubles, constituent un témoin positif d'activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>.

A la fin de la stimulation, les suspensions cellulaires sont centrifugées (400G ; 10 minutes). Les culots cellulaires sont lysés par 350µL de tampon « RLT + 2-β-Mercaptoethanol » (Qiagen) pour pouvoir en extraire les ARN totaux. Les surnageants des cultures sont conservés à -80°C pour analyse du sécrétome.

### **B. Principe de la qPCR.**

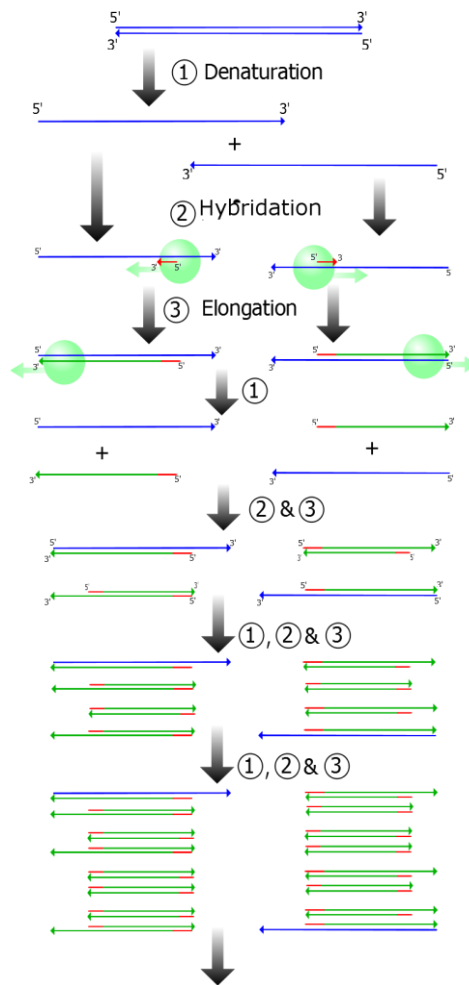
La réaction de polymérisation en chaîne, ou PCR, est une des techniques les plus puissantes de la biologie moléculaire (Schmittgen D, 2008). A l'aide de cette technique, des séquences de nucléotides bien précises au sein d'un échantillon d'ADN ou d'ADNc peuvent être copiées et leur nombre amplifié, en théorie, de manière exponentielle, à l'aide d'une ADN polymérase et d'amorces nucléotidiques précises et spécifiques. En fin de réaction, le nombre de copies de la séquence nucléotidique amplifiée est proportionnel au nombre de copies présentes initialement dans l'échantillon analysé.

L'amplification nécessite :

- une matrice d'ADN double brin contenant la séquence nucléotidique à amplifier
- un couple d'amorces sens (ou « forward ») et anti-sens (ou « reverse ») spécifiques de la séquence d'intérêt

- l'enzyme Taq Polymérase (ADN polymérase), résistante aux variations de températures importantes imposées à chaque cycle d'amplification
- des désoxyribonucléotides (dNTPs), utilisés par la Taq Polymérase pour synthétiser les brins d'ADN complémentaires

Une réaction de PCR consiste dans une succession de cycles d'amplification 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 (Fig.MM4).



**Fig. MM 4. Déroulement des 4 premiers cycles d'une réaction de PCR.**

○ : Taq Polymérase ; → : amorce

La détection et la quantification de la séquence amplifiée peut se faire à la fin de la réaction et à la fin du dernier cycle de PCR ; on parle alors de PCR « en point limite ». Cette méthode est

réalisée par l'analyse à l'aide d'un analyseur d'image, des produits d'amplification de la PCR après leur migration sur un gel d'agarose.

Dans la PCR quantitative en temps réel, la quantité de séquence amplifiée est mesurée à chaque cycle. La mesure de la quantité des produits de la réaction de PCR pendant sa phase exponentielle permet de déterminer avec précision la quantité initiale de la séquence amplifiée. La quantité d'ADN est mesurée après chaque cycle à l'aide de marqueurs fluorescents. L'augmentation d'intensité du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité de produits de PCR générée pendant la phase exponentielle de la réaction. Dans le travail présenté ici, nous utilisons comme marqueur fluorescent le SybrGreen, un agent intercalant de l'ADN qui se lie au produit de la PCR lorsque celui-ci est sous forme double-brin. L'instrument utilisé pour l'amplification combine un thermocycleur et un détecteur de fluorescence. En reliant la quantité de fluorescence avec le nombre de cycles d'amplification, l'appareil de PCR quantitative génère une courbe de fluorescence qui représente l'accumulation du produit de PCR amplifié et quantifié pendant toute la durée de la réaction de PCR.

### **C. Design des couples d'amorces nucléotidiques utilisés pour la PCR.**

Un des paramètres les plus importants pour la réussite de la quantification de l'expression des gènes par PCR quantitative en temps réel est la sélection des couples d'amorces nucléotidiques. Les couples d'amorces (ou « primers ») sont déterminés à partir des banques de données génomiques (GenBank, NCBI, Ensembl), et en particulier à partir de séquences de référence correspondant à l'ARN du gène d'intérêt (séquences annotées NM dans la banque de données). L'analyse préalable des publications scientifiques existantes est essentielle afin de bien identifier le gène d'intérêt et ses isoformes potentielles afin de pouvoir choisir entre la possibilité de construire des primers communs à plusieurs isoformes ou spécifiques d'une isoforme particulière.

Le design des primers est effectué à l'aide des logiciels Primer Express (Applied), Primer Blast (NCBI), Light Cycler Probe Design (Roche). Cette étape répond à des critères et à une démarche de qualité très stricts. Les produits de PCR amplifiés par les couples de primers doivent avoir une taille comprise entre 80 et 400 paires de bases (bp) (idéalement 80 à 150bp) afin d'optimiser l'efficacité de la PCR. Les primers (sens et anti-sens) doivent avoir une taille comprise idéalement entre 16 et 25 bp et une température de demi-dénaturation (ou  $T_m$ ) proche de 60°C avec la différence de  $T_m$  ( $\Delta T_m$ )  $\leq 2^\circ\text{C}$  entre les 2 primers. Ils ne doivent pas contenir de structures secondaires, de répétitions de bases. Ils doivent contenir peu de bases guanine et

cytosine (GC) à leur extrémité 3', afin d'éviter qu'ils ne se replient sur eux-mêmes, et avoir un contenu en GC de 40 à 60% pour éviter les hybridations non spécifiques particulièrement entre les primers eux-mêmes (dimères). Les primers sens et anti-sens doivent être construits sur des exons différents séparés par un intron suffisamment grand afin d'éviter l'amplification d'ADN génomique qui fausserait le calcul de quantité d'ARN. Enfin, une première vérification de la spécificité du produit amplifié par PCR est réalisée à l'aide d'un algorithme permettant de comparer *in silico* les séquences nucléotidiques entre elles (Basic Local Alignment Search Tool/ »BLAST »). La séquence nucléotidique du primer est ainsi comparée aux séquences de référence NM correspondant au génome humain.

La spécificité des couples de primers est ensuite testée sur plusieurs tissus, organes ou lignées cellulaires lors d'une première PCR. Une courbe de fusion est réalisée sur l'appareil de PCR quantitative et seuls les couples de primers générant un produit de PCR ne présentant qu'un seul et unique pic de T<sub>m</sub>, signe d'un produit de PCR unique, sont retenus. La taille des produits de PCR est ensuite vérifiée par migration des produits de PCR sur gel 2% agarose (masse/volume), 1X TBE.

Enfin, l'efficacité d'amplification de la PCR avec le couple de primers sélectionné est vérifiée en réalisant une courbe standard en utilisant des quantités connues d'ADNc issues de séries de dilutions à partir d'un échantillon dans lequel le gène d'intérêt est fortement exprimé, et répondant aux critères de qualité précédents (un seul pic de T<sub>m</sub> et produit de PCR à la taille attendue). Tous les couples de primers utilisés dans notre travail ont montré une efficacité d'amplification comprise entre 90 et 100%.

#### **D. Déroulement d'une analyse de l'expression de gènes par RT- PCR quantitative en temps réel**

Dans ce travail nous avons adopté un système de RT-qPCR quantitative en temps réel en 2 étapes. La première étape consiste en une réaction de synthèse d'ADNc (ou reverse transcription). De l'ARN total est converti en ADNc à l'aide d'une enzyme transcriptase inverse. A la suite de la synthèse d'ADNc, une quantité appropriée de celui-ci est transféré dans un nouveau tube pour la réaction de PCR.

Le déroulement d'une analyse de l'expression de gènes par PCR quantitative en temps réel comporte donc plusieurs étapes :

- extraction d'ARN
- synthèse d'ADN complémentaire (ADNc)

- réaction de PCR
- analyse quantitative des résultats

### **1. Extraction des ARN**

Les ARN totaux sont extraits des cellules à l'aide du kit RNeasy Mini (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur. Cette méthode de purification des ARN sur colonne permet d'obtenir un ARN libre de tout contaminant (phénol, éthanol, protéines, RNases...) et permet de standardiser l'extraction. Un traitement par la DNase (rDNase, Macherey-Nagel) est pratiqué directement sur la colonne d'extraction des ARN afin d'éliminer l'ADN génomique contaminant. La concentration en ARN des échantillons obtenus est déterminée par une méthode fluorimétrique en utilisant le kit « Qubit RNA Assay » (Life technologies) en suivant le protocole et les recommandations du fournisseur. La qualité des ARN est vérifiée par l'analyse du profil de migration de 400 à 500ng d'ARN sur un gel 1% agarose (m/v), 1X TBE.

### **2. « Reverse transcription » ou synthèse d'ADN complémentaire.**

Les ARN totaux isolés à partir des cellules sont rétro-transcrits en ADN complémentaire. Une même quantité d'ARN totaux de chaque échantillon est utilisée pour synthétiser de l'ADN complémentaire. Les ARN sont tout d'abord incubés 5 minutes à 65°C en présence de 4µM d'oligo-(dT) 12-18 (Invitrogen) et 0,8mM de dNTP (GE Healthcare). Les échantillons sont ensuite placés dans de la glace, et un « mix » contenant 10mM de DTT et du tampon M-MLV (1X) est ajouté. Les échantillons sont incubés 2 minutes à 37°C, puis 8U d'enzyme transcriptase inverse M-MLV (Invitrogen) sont ajoutées. La réaction de transcription inverse (RT : « reverse transcription ») s'effectue à 37°C pendant 50 minutes, et est arrêtée par une incubation de 15 minutes à 70°C, qui a pour effet d'inactiver la transcriptase inverse.

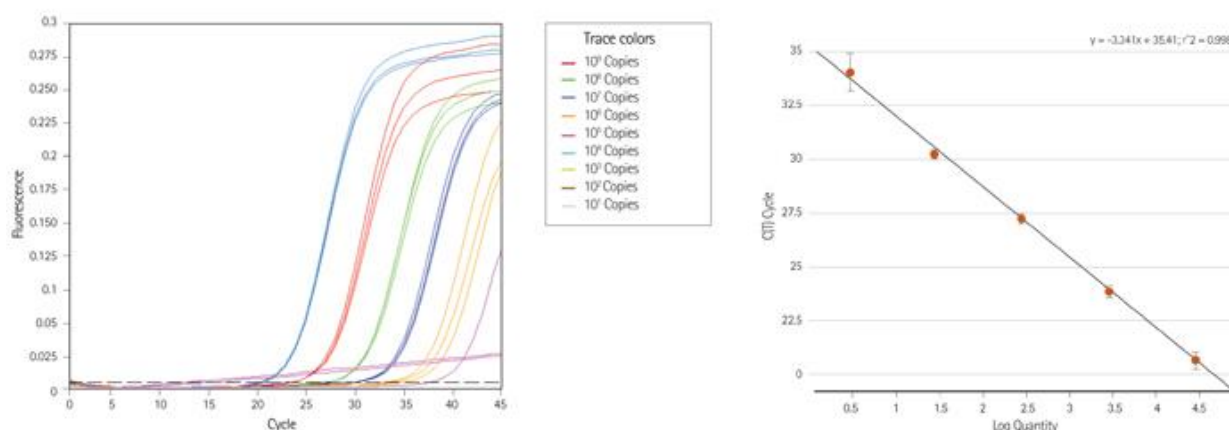
### **3. PCR et analyse des résultats.**

Les réactions de PCR sont réalisées à l'aide d'un appareil de PCR quantitative en temps réel ABI Prism 7900 (Applied), en utilisant un kit GoTaq® qPCR Master Mix (Promega). Les ADN complémentaires et le « mix » sont répartis dans des plaques de 384 puits à l'aide d'un robot pipeteur (Hamilton).

Le « mix » de la réaction de PCR comprend: 1µl d'ADNc, 5µL du Master Mix, 0,3µL de la solution-mère de chaque amorce nucléotidique [10µM] (table MM5) et 3,4µl d'eau RNASE free. Les différentes étapes de la réaction de PCR s'enchaînent comme suit : dénaturation initiale de l'ADN complémentaire à 95°C pendant 2 minutes, puis 40 cycles « dénaturation des ADN double brin à 95°C pendant 3 secondes / hybridation et extension des amorces à 60°C pendant 30 secondes ». Une même quantité d'ADNc, évaluée par son équivalent en ARN, est utilisée pour l'amplification de chaque gène. Le niveau d'expression des gènes d'intérêt est normalisé par rapport à celui de l'expression du gène « de ménage » SF3A1. Ce gène « de ménage » a été choisi, après avoir testé plusieurs autres gènes « de ménage », en raison de sa stabilité d'expression dans les différentes conditions expérimentales utilisées dans notre étude. La quantification relative de l'expression des ARNm des gènes d'intérêt dans les échantillons est réalisée par rapport à un échantillon-calibrateur constitué d'un mélange d'aliqots de chaque échantillon cellulaire testé pour l'expression des gènes d'intérêt.

L'explication de la méthode de quantification relative des produits de la réaction de PCR nécessite la définition de quelques termes :

- La ligne de base, ou bruit de fond, correspond au niveau de signal fluorescent durant les premiers cycles de PCR, pendant lesquels il y a peu ou pas de changement dans l'intensité de la fluorescence.
- Le « threshold », ou « seuil de sortie du bruit de fond », correspond au niveau de signal fluorescent qui représente une augmentation statistiquement significative de l'intensité de la fluorescence comparativement à la ligne de base. La majorité des appareils de PCR quantitative détermine automatiquement ce seuil quand l'intensité de fluorescence atteint une valeur correspondant à 10 fois la déviation standard de la valeur de la fluorescence de la ligne de base.
- Le Ct, ou « crossing threshold », correspond au nombre de cycles de PCR à partir duquel l'intensité du signal de fluorescence de la réaction de PCR atteint le « threshold ». La réaction de PCR entre à ce stade dans une phase exponentielle. Ce Ct est utilisé pour calculer la quantité initiale de copies d'un gène car sa valeur est inversement proportionnelle à la quantité de copies d'un gène dans le mélange réactionnel de départ (Fig.MM5).



**Fig. MM 5. Quantification d'un gène d'intérêt dans une série de dilutions d'un même échantillon.**

La quantification relative de l'expression des gènes d'intérêt dans un échantillon est obtenue en utilisant la méthode des  $\Delta\Delta Ct$  (Pfaffl, MW, 2001) décrite ci-dessous pour un gène d'intérêt donné:

*Etape 1: normalisation par rapport au gène de ménage*

$$Ct_{\text{gène d'intérêt}} - Ct_{\text{gène de ménage}} = \Delta Ct$$

*Etape 2: normalisation par rapport au calibrateur*

$$\Delta Ct_{\text{échantillon}} - \Delta Ct_{\text{calibrateur}} = \Delta\Delta Ct$$

*Etape 3: détermination de la variation du nombre de copies du gène d'intérêt*

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

| NOM                             | SeqRef(S)<br>des différents<br>isoformes |                   | SEQUENCES DES PRIMERS<br>(5'-3')                                   | TAILLE DES<br>AMPLICONS<br>(pbs) |
|---------------------------------|------------------------------------------|-------------------|--------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| <b>SF3A1</b>                    | NM_005877<br>NM_001005409                | Sens<br>Anti sens | TGCAGGATAAGACGGAATGGAACT<br>GA<br>GTAGTAAGCCAGTGAGTTGGAATCTT<br>TG | 179                              |
| <b>ATF3<br/>LONG<br/>FORM</b>   | NM_001674<br>NM_001030287                | Sens<br>Anti sens | TCCATCACAAAAGCCGAGGTA<br>GCTTCTCCGACTCTTTCTGCAG                    | 136                              |
| <b>BCL2</b>                     | NM_000633<br>NM_000657                   | Sens<br>Anti sens | AGGATTGTGGCCTTCTTTGAGTT<br>CCTCAGCCCAGACTCACATCA                   | 185                              |
| <b>BCLXL<br/>SHORT<br/>FORM</b> | NM_001191                                | Sens<br>Anti sens | GCTTTGAACAGGATACTTTTGTGGA<br>TCAGGAACCAGCGGTTGAAG                  | 93                               |
| <b>BCLXL<br/>LONG<br/>FORM</b>  | NM_138578.1                              | Sens<br>Anti sens | AACGGCGGCTGGGATACT<br>TCAGGAACCAGCGGTTGAAG                         | 93                               |

|                             |                |           |                                       |     |
|-----------------------------|----------------|-----------|---------------------------------------|-----|
| <b>BIM</b>                  | NM_001204106   | Sens      | CTTGTTCCCCCAAATGTCTGA                 | 127 |
|                             | NM_001204107   | Anti sens | GCAGGCTGCAATTGTCTACCT                 |     |
|                             | NM_001204108   |           |                                       |     |
|                             | NM_001204109   |           |                                       |     |
|                             | NM_001204110   |           |                                       |     |
|                             | NM_001204111   |           |                                       |     |
|                             | NM_001204112   |           |                                       |     |
|                             | NM_001204113   |           |                                       |     |
|                             | NM_006538      |           |                                       |     |
|                             | NM_138621      |           |                                       |     |
|                             | NM_138622      |           |                                       |     |
|                             | NM_138623      |           |                                       |     |
|                             | NM_138624      |           |                                       |     |
|                             | NM_138625      |           |                                       |     |
|                             | NM_138626      |           |                                       |     |
|                             | NM_138627      |           |                                       |     |
|                             | NM_207002      |           |                                       |     |
|                             | NM_207003      |           |                                       |     |
| <b>FAS</b>                  | NM_000043      | Sens      | ACCCGCTCAGTACGGAGTTG                  | 215 |
|                             | NM_152871      | Anti sens | TGCAGGCCTTCCAAGTTCTG                  |     |
|                             | NM_152872      |           |                                       |     |
|                             | NM_152873      |           |                                       |     |
|                             | NM_152874      |           |                                       |     |
|                             | NM_152875      |           |                                       |     |
|                             | NM_152876      |           |                                       |     |
|                             | NM_152877      |           |                                       |     |
| <b>FOXP3</b>                | NM_014009      | Sens      | TCCACAACATGCGACCCCTTTCA               | 217 |
|                             |                | Anti sens | ACAGCCCCCTTCTCGCTCTCCA                |     |
| <b>GATA3</b>                | NM_002051      | Sens      | GCCCCTCATTAAGCCCAAGCGA                | 169 |
|                             | NM_001002295   | Anti sens | CAGGGGTCTGTTAATATTGTGAAGCT<br>TGTAAGT |     |
| <b>LMB1</b>                 | NM_001198557.1 | Sens      | CCAGGGAAGAACTGATGGAA                  | 177 |
|                             | NM_005573.3    | Anti sens | CCGCCATCTCTCTCTCTTTG                  |     |
| <b>p21<sup>CDKN1A</sup></b> | NM_000389      | Sens      | GAGACTCTCAGGGTCGAAAACG                | 95  |
|                             | NM_078467      | Anti sens | GGATTAGGGCTTCCTCTTGGA                 |     |
| <b>p53</b>                  | NM_000546      | Sens      | CCTGAGGTTGGCTCTGACTGTA                | 139 |
|                             | NM_001126112   | Anti sens | TGTTCCGTCCCAGTAGATTACCA               |     |
|                             | NM_001126113   |           |                                       |     |
|                             | NM_001126114   |           |                                       |     |
|                             | NM_001126115   |           |                                       |     |

|               |                                                                                                           |                   |                                                           |     |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|-----------------------------------------------------------|-----|
|               | NM_001126116                                                                                              |                   |                                                           |     |
|               | NM_001126117                                                                                              |                   |                                                           |     |
| <b>PEA-15</b> | NM_003768                                                                                                 | Sens<br>Anti sens | AGCTCAAGTCGGCCTGCAAGGA<br>TTTCAGCACACGGGTTCTGTAGTCAA<br>C | 200 |
| <b>RORC2</b>  | NM_001001523                                                                                              | Sens<br>Anti sens | CCTGCTGAGAAGGACAGGGAG<br>AGACGACTTGTCCCCACAGATT           | 103 |
| <b>TBET</b>   | NM_013351                                                                                                 | Sens<br>Anti sens | TGTACGTCCACCCGGACTC<br>TGGAGGGACTGGAGCACAAT               | 136 |
| <b>TGFβ</b>   | NM_000660                                                                                                 | Sens<br>Anti sens | GGCCTTTCCTGCTTCTCATG<br>GGTCCTTGC GGAAGTCAATG             | 153 |
| <b>TNF-α</b>  | NM_000594                                                                                                 | Sens<br>Anti sens | CCCAGGCAGTCAGATCATCTTC<br>GGACCTGGGAGTAGATGAGGTACA        | 195 |
| <b>TNFR2</b>  | NM_001066                                                                                                 | Sens<br>Anti sens | CACTGGCGACTTCGCTCTTC<br>ATGATGACACAGTTCACCACTCCTA         | 90  |
| <b>VEGFα</b>  | NM_001025366<br>NM_003376<br>NM_001025367<br>NM_001025368<br>NM_001025369<br>NM_001025370<br>NM_001025370 | Sens<br>Anti sens | AGAAGGAGGAGGGCAGAATCATCAC<br>GTGAGGTTTGATCCGCA            | 247 |

**Table MM 5. Liste des amorces nucléotidiques utilisées pour l'analyse du transcriptome des différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> exposés ou non au condensat de fumée de cigarette.**

Les couples de « primers » sont déterminés à partir des banques de données génomiques (GenBank, NCBI, Ensembl), et en particulier à partir de séquences de référence correspondant à l'ARN du gène d'intérêt et à ses différents isoformes (séquences annotées NM dans la banque de données). Pour un gène donné, le nombre d'isoforme existant peut être important. L'analyse préalable des publications scientifiques existantes est essentielle afin de bien identifier le gène d'intérêt et ses isoformes potentielles, et de pouvoir choisir entre la possibilité de construire des primers communs à plusieurs isoformes ou spécifiques d'une isoforme particulière. Ce tableau liste les différentes isoformes amplifiées par les primers construits pour chaque gène. Sauf précision (ATF3, BCLXL), nous avons construits des couples d'amorces communs aux différentes isoformes.

## **XII. Analyse du sécrétome des différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> exposées au condensat de fumée de cigarette.**

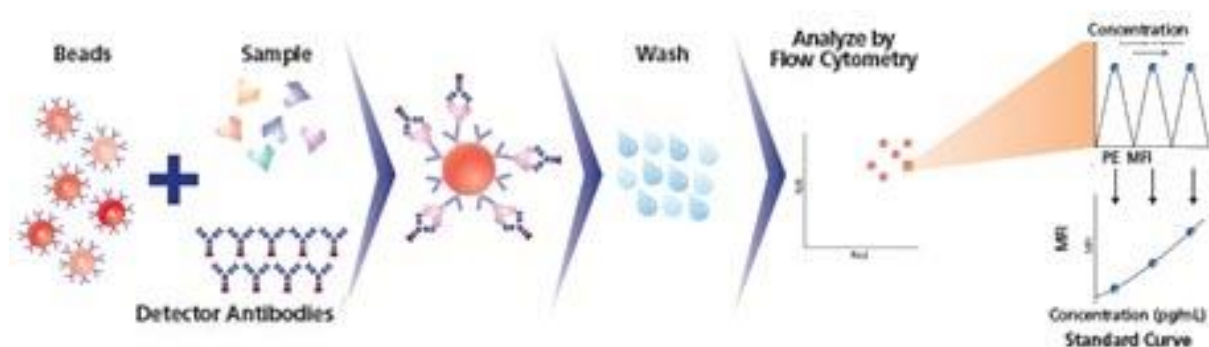
La production de diverses protéines constituant une partie du sécrétome des différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Treg/ Th17 CCR6<sup>+</sup>/« non Th17 » CCR6<sup>-</sup> cultivées dans

les mêmes conditions que celles décrites dans le paragraphe XI.A est quantifiée dans les surnageants de culture par la technique de « cytometric beads array » (CBA) ou par la technique de Luminex, selon les protéines.

### A. Principe.

Les techniques de CBA et Luminex sont des méthodes basées sur l'utilisation de la cytométrie en flux pour quantifier plusieurs protéines à la fois dans un surnageant de culture. Elles correspondent toutes les deux à un test Elisa réalisé en suspension. Ces méthodes associent les capacités de détection d'une grande gamme de signaux fluorescents par la cytométrie en flux, et des billes auxquelles sont fixés des anticorps de capture spécifiques des protéines à détecter. Chacune des billes utilisées est associée à deux fluorochromes dans des ratios différents afin d'assigner à chaque bille une signature spectrale unique. Ceci permet d'utiliser simultanément plusieurs billes dirigées contre des protéines différentes dans un seul tube. Après incubation avec l'échantillon, les protéines présentes qui se sont fixées aux anticorps de capture sont détectées avec des anticorps de révélation spécifiques des protéines à détecter et couplés à la phycoérythrine (PE). Les protéines mises en évidence peuvent être quantifiées grâce à des gammes-étalons.

Lors de la lecture, les billes passent une par une dans un cytomètre ou le système de lecture Luminex. Le premier laser, rouge (635nm), permet d'exciter les deux fluorochromes associés aux billes, et celles-ci vont émettre une fluorescence rouge (675nm) et infrarouge (>712nm). Chaque bille émet d'une façon différente et est identifiée par les intensités des deux fluorescences rouge et infrarouge. Le second laser, vert (532nm), excite le fluorochrome couplé à l'anticorps de détection et mesure la quantité de cytokine couplée à la surface de la bille (Fig. MM6).



**Fig. MM 6. Principe des techniques du Cytometric Bead Array et du Luminex.**

## **B. Quantification de protéines par la technique Cytometric Beads Array (CBA).**

La production des cytokines pro- inflammatoires : IFN- $\gamma$ , IL1 $\alpha$ , et  $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-13, IL-17 A et F, IL-23p40, LT $\alpha$ , sCD40L, TNF- $\alpha$ , et anti-inflammatoire : IL-10, des chimiokines : MCP-1/CCL2, MIG, MIP1 $\alpha$ /CCL3, MIP1 $\beta$  (Macrophage Inflammatory Protein 1 $\beta$ )/CCL4, RANTES/CCL5, et des facteurs de croissances : FGF (fibroblast growth factor), G-CSF, GM-CSF, TGF- $\beta$ , VEGF, sécrétés a été évaluée dans les surnageants de culture de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Treg/Th17 CCR6<sup>+</sup>/ « non Th17 » CCR6<sup>-</sup> dans les conditions déjà décrites au chapitre XI.A par la technique multiplex de CBA, en utilisant un kit CBA préparé à façon (CBA Flex Set, BD-Biosciences) conformément aux instructions du fabricant. Les échantillons sont analysés par cytométrie en flux (LSR2, BD Biosciences) à l'aide des logiciels DIVA et FCAP (BD Biosciences). Une gamme d'étalonnage est réalisée en parallèle avec des cytokines purifiées de concentration connue.

## **C. Quantification des protéines par la technique Luminex**

La production d'autres cytokines (IL-21, IL-22, TRAIL), chimiokines CCL20 et facteurs de croissance (EGF/epidermal growth factor, PDGF-BB/Platelet-derived growth factor) sécrétés a été évaluée dans les mêmes surnageants de culture que ceux analysés avec la technique CBA, par la technique Luminex en utilisant un kit Luminex (ProcartaPlex Mix&Match human 6-Plex, Affymetrix) conformément aux instructions du fabricant. Les échantillons sont analysés à l'aide d'un Bio-Plex 200 et du logiciel d'analyse Bio-Plex Manager software (Biorad). Une gamme d'étalonnage est réalisée en parallèle avec des cytokines purifiées de concentration connue.

## **XIII. Statistiques.**

Compte tenu du nombre limité d'expériences réalisées pour les différentes expérimentations réalisées dans notre travail, des tests non paramétriques sont utilisés pour l'analyse statistique des résultats. La comparaison des groupes entre eux est tout d'abord effectuée à l'aide du test d'analyse de variance de Kruskal-Wallis. En cas de différence significative pour ce test, un test de Mann-Whitney permettant de comparer les groupes deux à deux est utilisé. L'analyse des résultats est effectuée à l'aide du logiciel Graphpad Prism 5.00 (Graphpad Prism Software Inc.).

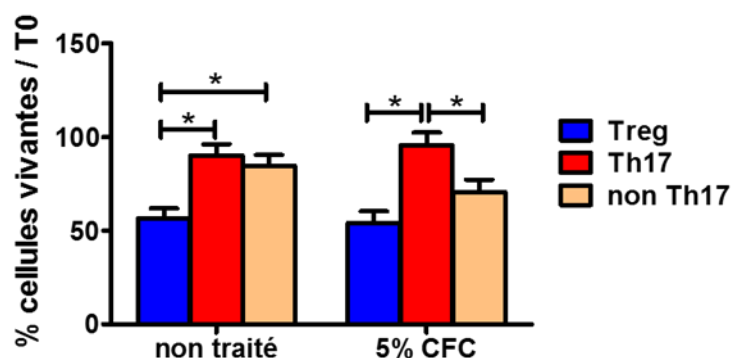
La différence entre les groupes est considérée comme significative quand la valeur de  $p$  est inférieure à 0,05.

## Chapitre 4 : Résultats

**I. L'exposition au condensat de fumée de cigarette induit une augmentation de différents marqueurs de sénescence dans les lymphocytes Th17 quiescents: augmentation de l'activité  $\beta$ -galactosidase et de l'expression des inhibiteurs du cycle cellulaire p16<sup>INK4a</sup> et ATF3.**

Dans la première partie de ce travail nous avons analysé différents paramètres visant à évaluer un effet potentiel de l'exposition à la fumée de cigarette sur la prolifération ou l'apoptose des différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> après tri cellulaire séparant les Th17 CD4<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> CCR6<sup>+</sup>, les autres lymphocytes T CD4<sup>+</sup> auxiliaires/conventionnels CCR6<sup>-</sup> (« non-Th17 ») et les Tregs CD4<sup>+</sup>.

Dans un premier temps, l'analyse de la viabilité et de la prolifération des cellules Th17, « non Th17 » et Tregs, exposées au CFC pendant 48H a été effectuée par numération au bleu Trypan ; les résultats sont présentés en pourcentage de cellules vivantes à 48H par rapport au nombre de cellules mises en culture (T0). Les résultats obtenus montrent qu'après 48H de culture en absence de CFC, on n'observe pas un nombre plus important de cellules des différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Cependant, la viabilité des Th17 et des « non Th17 » est significativement meilleure que celle des Tregs. La viabilité des Th17 et des « non Th17 » est la même (Fig. R1). En revanche, après exposition au CFC, la viabilité des Th17 est identique à celle obtenue dans la condition de culture sans CFC, alors que celle des « non Th17 » est diminuée ( $p=0,0649$ ), suggérant une meilleure résistance des Th17 à la mort cellulaire induite par l'exposition à la fumée de cigarette (Fig. R1). La faible viabilité des Tregs n'est pas modifiée dans les cultures avec CFC.



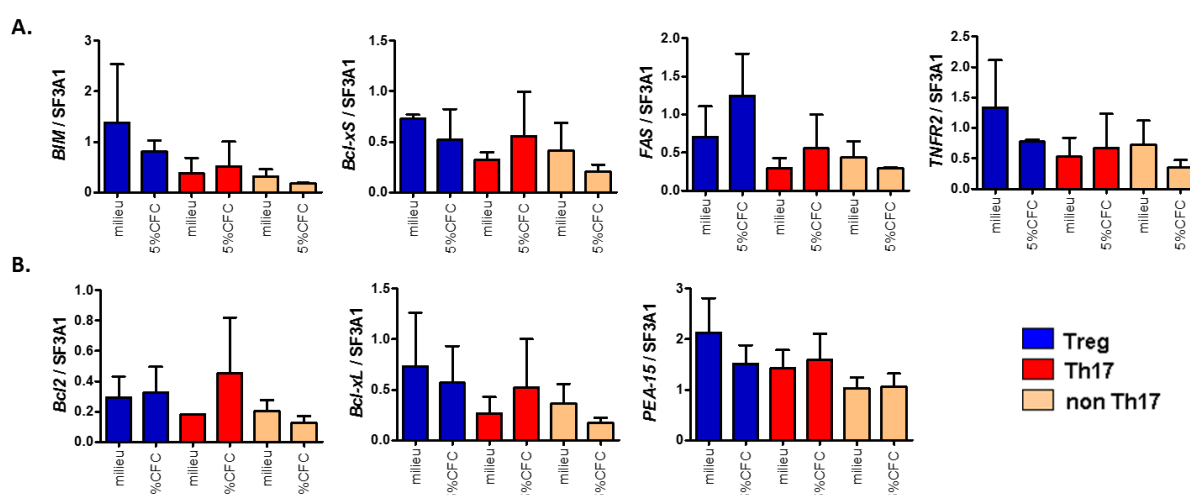
**Fig. R 1. L'exposition des Th17 à la fumée de cigarette n'induit pas leur prolifération mais n'a pas d'effet sur leur viabilité.**

La viabilité et la prolifération des différentes sous-populations des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> triées et exposées ou non à la fumée de cigarette a été estimée par numération des cellules au bleu Trypan après 48H de culture en présence ou non de 5% de CFC. Les moyennes +/- SEM des

numérations exprimées en pourcentage du nombre de cellules mises en culture à T0 (n=7) sont représentées.

\*  $p < 0,05$ , Mann-Whitney U.

Dans le but de rechercher une éventuelle moindre susceptibilité des Th17 à l'apoptose induite par l'exposition au CFC, nous avons analysé l'expression de gènes impliqués dans une réponse pro- ou anti-apoptotique. L'analyse par la technique de PCR quantitative en temps réel, de l'expression des gènes pro- (BIM, Bcl-xS, Fas et TNFR2) ou anti-apoptotiques (Bcl2, Bcl-xL et PEA-15) dans les Th17 et « non Th17 », et les Tregs, après 48H d'exposition au CFC, ou non, ne montre pas de variation de leur expression entre les deux conditions de culture, ce qui suggère fortement une absence de stimulation de l'une ou l'autre réponse dans les différentes sous-populations (Fig. R2) par l'exposition au CFC.



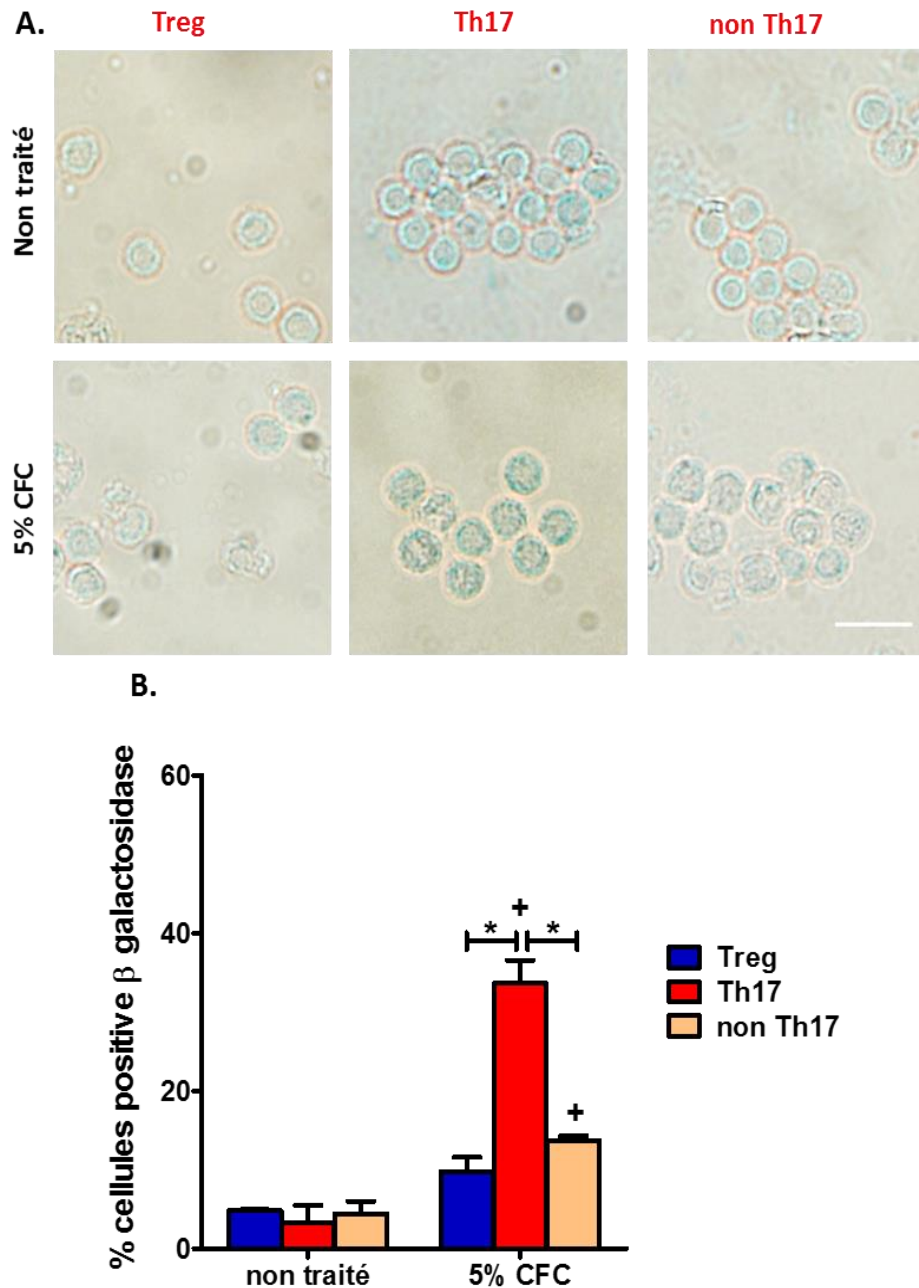
**Fig. R 2. Expression des gènes pro- ou anti-apoptotiques des différentes sous-populations exposées à 5% de condensat de fumée de cigarette pendant 48H.**

L'expression relative de gènes pro-apoptotiques (BIM, Bcl-Xs, FAS, TNFR2) (A.), ou anti-apoptotiques (Bcl2, Bcl-XL et PEA-15) (B.), est analysée par RT-qPCR quantitative en temps réel dans les sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> après tri. Les résultats sont normalisés par rapport à l'expression de SF3A1 et exprimés en  $\Delta\Delta Ct$  par rapport à l'expression du gène d'intérêt dans un calibrateur constitué par un mélange des échantillons étudiés ; les moyennes  $\pm$  SEM de 2 ou 7 (PEA-15) expériences sont représentées.

La sénescence cellulaire est une autre forme de résistance à la mort des cellules exposées à des stress. En plus de l'altération de leur réponse à des stimuli pro-apoptotiques, les cellules

sénescentes restent métaboliquement actives, mais présentent un blocage en phase G1 du cycle cellulaire, associé à des modifications morphologiques et de l'expression des gènes, et expriment un sécrétome pro-inflammatoire. L'augmentation de l'activité  $\beta$ -galactosidase à pH6 est un marqueur couramment utilisé pour caractériser des cellules sénescentes. La  $\beta$ -galactosidase peut cliver le substrat chromogénique 5-bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -galactopyranoside (X-gal), ce qui se traduit par la production d'un marquage bleu cytoplasmique périnucléaire en forme de grains très denses, dans les cellules qui présentent une augmentation de l'activité de cette enzyme.

Nous avons analysé l'activité  $\beta$ -galactosidase dans les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> triés exposés ou pas à 5% de CFC pendant 48H. La figure R3. A. montre qu'après 48H de culture en absence d'exposition au CFC, les différentes sous-populations, Tregs, Th17 et « non Th17 » ne présentent pas d'activité  $\beta$ -galactosidase. En revanche, ces mêmes cellules exposées au CFC pendant 48H montrent une augmentation de l'activité  $\beta$ -galactosidase. Cette augmentation est significative dans les Th17 et « non Th17 » par rapport à la condition sans CFC, et l'activité  $\beta$ -galactosidase des lymphocytes Th17 exposés au CFC est significativement plus importante que celle des « non Th17 » et des Tregs dans la même condition (Fig. R3 B.).



**Fig. R 3. Les lymphocytes Th17 exposés à 5% de condensat de fumée de cigarette pendant 48H présente une activité  $\beta$ -galactosidase plus importante comparativement aux lymphocytes conventionnels « non Th17 » et aux Tregs.**

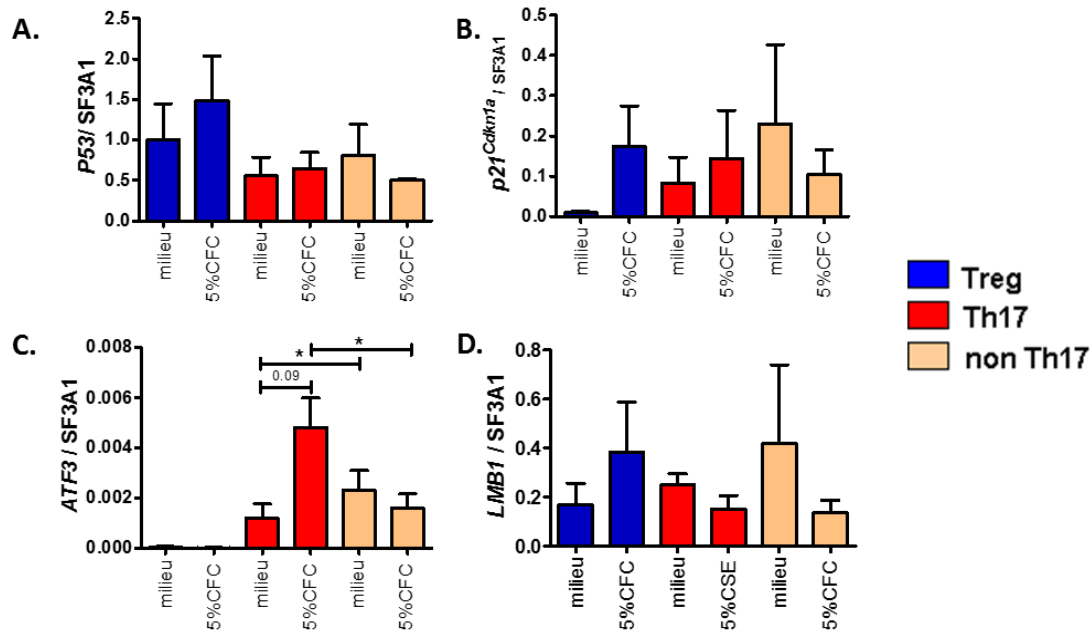
Des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> conventionnels Th17 et « non Th17 », et Tregs, triés, ont été exposés au condensat de fumée de cigarette à 5% pendant 48H. L'activité  $\beta$ -galactosidase à pH6 est ensuite déterminée à l'aide d'un kit de marquage  $\beta$ -galactosidase et par numération des cellules présentant une coloration cytoplasmique prenant l'aspect de granules fortement colorés en bleu. Des images représentatives des 3 sous-populations en absence de traitement ou exposées à 5% de CFC sont montrées en A., la barre d'échelle correspond à 20 $\mu$ m, les

*moyennes +/- SEM des numérations des cellules positives pour le marquage  $\beta$ -galactosidase sont présentées en B. N=3.*

*\*  $p < 0,05$ , +  $p < 0,05$  par rapport à la condition non traitée. Mann-Whitney U.*

Par ailleurs, des modifications morphologiques parmi lesquelles une augmentation de la taille de la cellule et du noyau, et des irrégularités de l'enveloppe nucléaire ont été décrites pour les cellules sénescents. La partie interne de l'enveloppe nucléaire est recouverte de lamines qui contribuent à la taille, la forme et la stabilité du noyau. Les travaux de l'équipe de J. Campisi ont montré que la perte de l'expression de la lamine B1 (LMB1), au niveau ARN, dans des fibroblastes humains primaires est associée à la sénescence induite par des dommages à l'ADN (Freund A, 2012). Nous avons donc évalué ce caractère dans les cultures de lymphocytes exposés au CFC ; les résultats obtenus dans nos conditions de culture ne montrent pas de modification de l'expression de LMB1 dans les Th17 et les « non Th17 » exposés au CFC pendant 48H en comparaison de la condition sans exposition au CFC (Fig. R4 D).

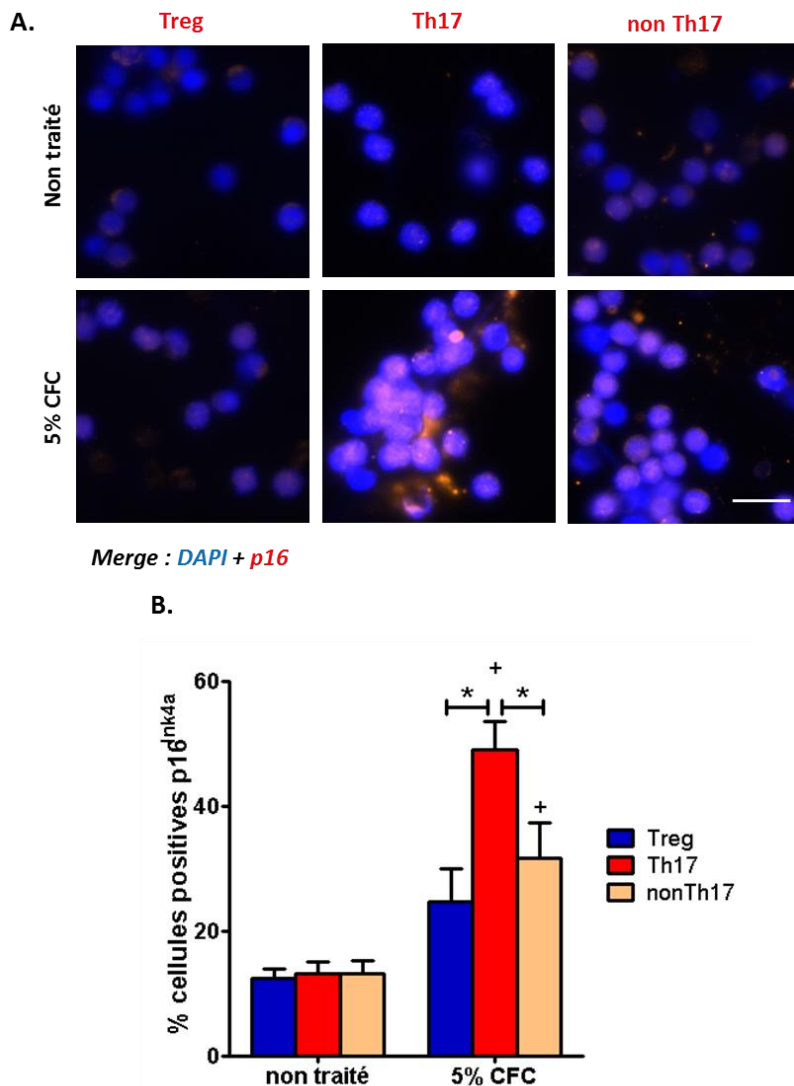
Le phénotype « sénescence » est associé à une modification de l'expression de gènes et protéines impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, des kinases dépendantes des cyclines et une accumulation de la forme hypophosphorylée de Rb, qui aboutissent à un blocage du cycle cellulaire en phase G1. L'augmentation de l'expression de la protéine p16<sup>INK4a</sup> est donc associée à l'induction de la sénescence, et c'est cette protéine qui assure l'inhibition à long terme des kinases CDK4 et 6, responsables du niveau de phosphorylation de la protéine Rb dans d'autres modèles cellulaires comme les fibroblastes (Alcorta DA, 1996, Brookes S, 2004). Nous avons donc analysé en immunocytofluorescence l'expression de cette protéine dans les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> exposés à la fumée de cigarette. Les résultats de la figure R5A montrent que les cellules exprimant p16<sup>INK4a</sup> présentent un marquage sous forme de points rouges localisés dans le noyau ; ces résultats montrent que l'expression de p16<sup>INK4a</sup> est la même dans les Tregs, Th17 et « non Th17 » en absence d'exposition au CFC. L'exposition au CFC pendant 24H induit une augmentation significative de l'expression de p16<sup>INK4a</sup> dans les Th17 et « non Th17 ». Cependant, l'expression de p16<sup>INK4a</sup> est significativement plus importante dans les Th17 exposés au CFC que dans les « non Th17 » (Fig. R5 B.).



**Fig. R 4. Expression de molécules impliquées dans l'arrêt de la progression dans le cycle cellulaire, p53, p21<sup>Cdkn1a</sup> et ATF3, ou associée aux changements morphologiques caractéristiques des cellules sénescents, LMB1, dans les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> exposées à 5% de condensat de fumée de cigarette pendant 48H.**

Des lymphocytes Tregs, Th17 et T CD4<sup>+</sup> conventionnels « non Th17 » triés ont été exposés ou non au condensat de fumée de cigarette à 5% pendant 48H. Après extraction des ARNs de ces cellules, l'expression relative des gènes a été analysée par RT-qPCR quantitative en temps réel. Les résultats sont normalisés par rapport à l'expression de SF3A1 et exprimés en  $\Delta\Delta Ct$  par rapport à l'expression du gène d'intérêt dans un calibrateur constitué par un mélange des échantillons étudiés ; les moyennes +/- SEM de 5 expériences sont représentées.

\*  $p < 0,05$ , Mann-Whitney U.



**Fig. R 5. Les lymphocytes Th17 exposés à 5% de condensat de fumée de cigarette pendant 48H expriment plus fortement  $p16^{INK4a}$  comparativement aux lymphocytes conventionnels « non Th17 » et aux Tregs.**

Des lymphocytes T  $CD4^+$  conventionnels Th17, « non Th17 » et Tregs triés, ont été exposés ou non à 5% de condensat de fumée de cigarette pendant 24H. L'expression de  $p16^{INK4a}$  est analysée en immunocytofluorescence, et par numération des cellules présentant un marquage positif pour  $p16^{INK4a}$  se présentant sous la forme d'un marquage nucléaire en pointillé de couleur rouge. Les noyaux sont identifiés à l'aide d'un marquage par le DAPI de couleur bleue. Des images représentatives des 3 sous-populations lymphocytaires exposées ou non à 5% de CFC sont montrées en A., la barre d'échelle correspond à  $20\mu m$ , les moyennes  $\pm$  SEM des numérations des cellules positives pour le marquage  $p16^{INK4a}$  sont présentées en B. N=13.

\*  $p < 0,05$ , +  $p < 0,05$  par rapport à la condition non traitée. Mann-Whitney U.

Nous avons également analysé l'expression en ARN d'autres molécules diversement impliquées dans la progression dans le cycle cellulaire, p53, p21<sup>CDKN1a</sup>, et ATF3 (Activating Transcription Factor 3), après exposition au CFC des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> conventionnels Th17 et « non Th17 », et Tregs triés.

Une augmentation de l'expression du facteur de transcription ATF3 a été décrite et associée à un arrêt de la croissance cellulaire dans des cellules myéloïdes humaines et des cellules A549, en réponse à des dommages à l'ADN (Fan F, 2002). ATF3 est capable de se lier au promoteur du gène codant la cycline D1 (Lu D, 2006). L'analyse de l'expression de l'ARN de ATF3 dans les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> montre que l'expression basale de ATF3 est plus importante dans les « non Th17 » que dans les Th17 dans les cellules non exposées au CFC. L'exposition au CFC induit une forte augmentation de l'expression de ATF3 dans les Th17, et cette expression devient alors significativement plus importante dans les Th17 que dans les « non Th17 » exposés à la fumée de cigarette (Fig. R4 C.). En revanche, l'expression de ATF3 dans les « non-Th17 » n'est pas modifiée après exposition au CFC. Enfin, ATF3 est difficilement détectable dans les Tregs dans les deux conditions de culture.

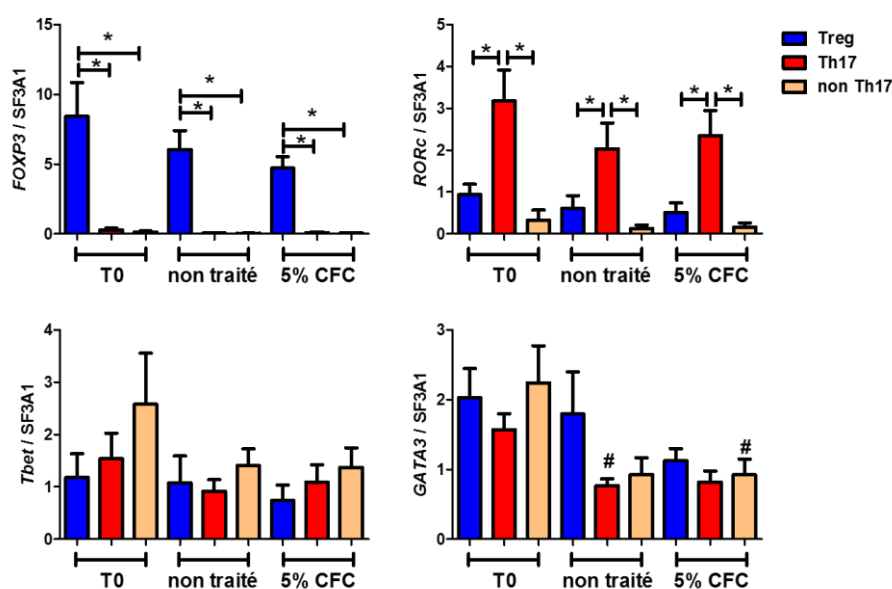
p21<sup>CDKN1a</sup> est un inhibiteur de CDK2 dont l'expression en ARN et protéine est augmentée lors de l'établissement de la sénescence, mais diminue rapidement une fois la sénescence établie (revue dans Muller M, 2009). L'activation de p53 est à l'origine de la transcription de p21<sup>CDKN1a</sup>. Les résultats obtenus ne montrent pas de modification de l'expression de p21<sup>CDKN1a</sup> après l'exposition au CFC pendant 48H dans les trois sous-populations Th17, « non-Th17 » et Tregs (Fig. R4 B.). De même, le niveau d'expression de l'ARN de p53 dans les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> n'est pas modifié par l'exposition au CFC (Fig. R4 A.).

## **II. L'exposition au CFC induit l'augmentation de la sécrétion de l'IL-8 par les lymphocytes Th17 quiescents, et une inhibition du secrétome spécifique des lymphocytes Th17 activés.**

Une autre caractéristique des cellules sénescents est la modification de leurs capacités sécrétoires en faveur d'une augmentation de la sécrétion de molécules pro-inflammatoires, ou SASP (Senescence Associated Secretory Phenotype) (Coppé JP, 2010). Nous avons donc recherché si l'exposition au CFC des différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> provoquait une modification de la nature ou de la quantité de la sécrétion de cytokines pro-ou

anti-inflammatoires, de chimiokines impliquées dans le recrutement ou l'activation d'autres cellules immunitaires, ou de facteurs de croissances susceptibles d'avoir une action sur le microenvironnement tissulaire. En préalable à une analyse du sécrétome protéique, nous avons analysé l'expression des gènes codant pour des cytokines, des chimiokines ou de facteurs de croissances exprimés par toutes les sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, ou spécifiquement par les Tregs, Th17 et « non Th17 » (Table R.1).

De plus, compte-tenu de la plasticité fonctionnelle qui existe entre les populations Treg et Th17, et Th17 et Th1, et pourrait contribuer à l'accumulation de cellules Th17 dans les tissus et au niveau circulant chez les fumeurs, nous avons éliminé la possibilité d'un changement de phénotype fonctionnel des différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> induit par l'exposition à la fumée de cigarette. Pour cela, nous avons analysé par RT-qPCR quantitative, l'expression des facteurs de transcription spécifiques de chaque sous-population, FOXP3 pour les Tregs, RORc pour les Th17, Tbet pour les Th1 et GATA3 pour les Th2, après tri, ou après 48H d'exposition ou non au CFC. Les résultats présentés sur la Fig. R6 montrent que l'expression des facteurs de transcription spécifiques de chaque sous-population de Th est stable dans les différentes conditions de culture, et permettent de conclure à l'absence de changement de phénotype fonctionnel de l'une ou l'autre sous-population de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> lors d'une exposition à la fumée de cigarette.



**Fig. R 6. Expression des facteurs de transcription spécifiques des différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> après exposition à 5% de condensat de fumée de cigarette pendant 48H.**

Des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> conventionnels Th17 et « non Th17 » et Tregs triés, ont été exposés ou non au condensat de fumée de cigarette à 5% pendant 48H. L'expression relative des gènes

est ensuite analysée par RT-qPCR quantitative en temps réel. Les résultats sont normalisés par rapport à l'expression de SF3A1 et les moyennes +/- SEM de 5 expériences sont représentées.

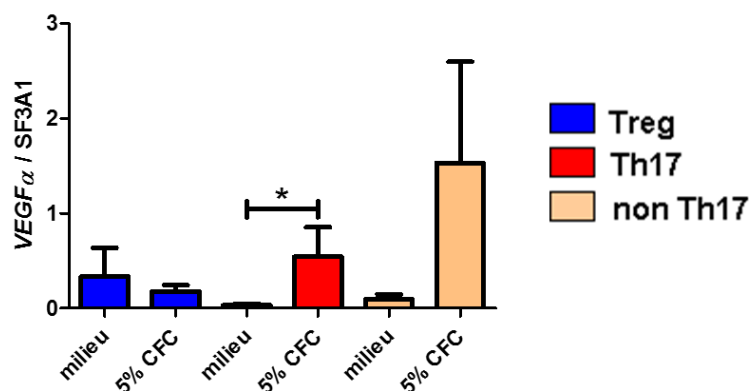
\*  $p < 0,05$ , #  $p < 0,05$  par rapport à la condition T0. Mann-Whitney U.

Parmi les gènes dont nous avons analysé l'expression, seule l'expression du gène du VEGF $\alpha$  est modulée lors d'une exposition au CFC. Les résultats présentés ici montrent une augmentation de la transcription du gène codant pour le VEGF $\alpha$  dans les Th17 et « non Th17 » en réponse à l'exposition au CFC. Cette augmentation est significative dans les Th17 uniquement (Fig. R7). Cependant, cette variation d'expression du VEGF n'a pas été retrouvée lors de l'analyse des protéines sécrétées dans les surnageants par la technique de CBA. Pour le reste des gènes analysés, nous n'avons pas retrouvé d'induction ou de modulation de l'expression lors d'une exposition à la fumée de cigarette (Table R.1).

| Treg                                                         | Th17                                                                                                                    | Th1                                                                                             | Th2                                        | Toutes les cellules T CD4+                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|--------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>TGF<math>\beta</math></b><br><i>IL-10</i><br><i>IL-35</i> | <i>IL-17a,f</i><br><i>IL-6</i><br><i>IL-21</i><br><i>IL-22</i><br><i>IL-9</i><br><i>CCL20 (MIP3<math>\alpha</math>)</i> | <i>IL-2</i><br><b>IFN-<math>\gamma</math></b><br><b>TNF<math>\alpha</math></b><br><i>GM-CSF</i> | <i>IL-4</i><br><i>IL-5</i><br><i>IL-13</i> | <i>IL-8</i><br><i>IL-1<math>\alpha</math>, <math>\beta</math></i><br><i>IL-9</i><br><i>CCL2 (MCP1)</i><br><i>CCL3 (MIP1<math>\alpha</math>)</i><br><b>CCL4 (MIP1<math>\beta</math>)</b><br><b>CCL5 (RANTES)</b><br><i>CCL11 (Eotaxin)</i><br><i>CXCL10</i><br><b>VEGF<math>\alpha</math></b> |

**Table R 1. Cytokines, chimiokines et facteurs de croissance spécifiques de chaque sous-population de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, ou exprimés par toutes les sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> analysés dans ces cellules en absence d'exposition ou après 48H d'exposition au CFC.**

*Les gènes écrits en italique ne sont pas détectés.*



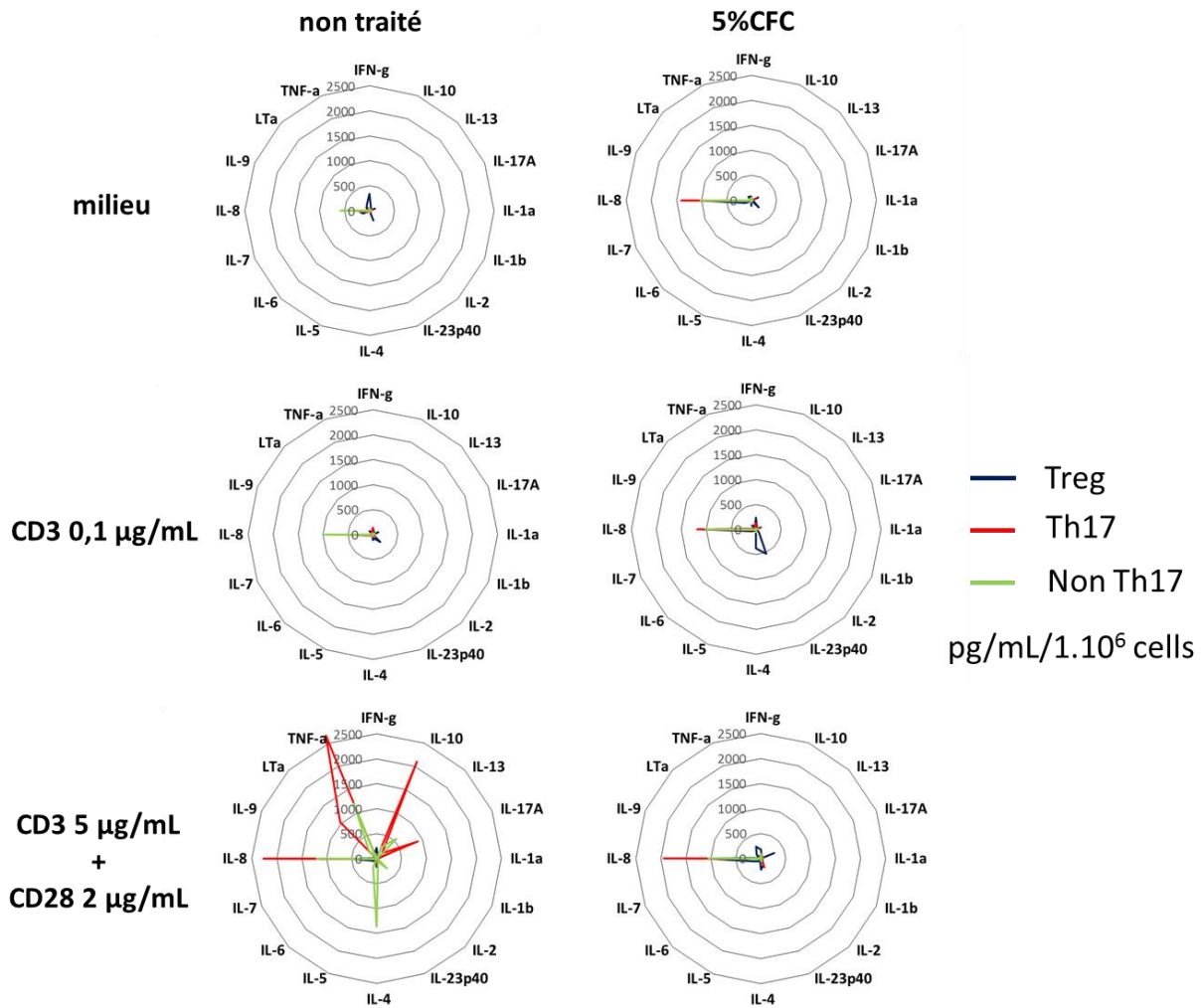
**Fig. R 7. L'expression du VEGF $\alpha$  est augmentée dans les lymphocytes Th17 exposées à 5% de condensat de fumée de cigarette pendant 48H.**

Des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> conventionnels Th17 et « non Th17 », et Tregs isolés, ont été exposés ou non au condensat de fumée de cigarette à 5% pendant 48H. L'expression relative des gènes est analysée par RT-qPCR quantitative en temps réel. Les résultats sont normalisés par rapport à l'expression de SF3A1 et exprimés en  $\Delta\Delta C_t$  par rapport à l'expression du gène d'intérêt dans un calibrateur constitué par un mélange des échantillons étudiés, et les moyennes  $\pm$  SEM de 5 expériences sont représentées.

\*  $p < 0,05$ , Mann-Whitney U.

Nous avons ensuite évalué avec les techniques de CBA ou de Luminex appliquées aux surnageants des différentes cultures, le taux d'expression de différentes cytokines pro- ou anti-inflammatoires (Fig. R8 & R11), ou chimioattractantes pour d'autres cellules inflammatoires (Fig. R8, R9 & R10), et de facteurs de croissances (Fig. R12). En plus des surnageants des cultures des cellules quiescentes exposées ou non au CFC, deux autres types de surnageant ont été analysés qui proviennent de cultures « contrôle » mimant différentes conditions d'activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> par stimulation du complexe TCR : d'une part des surnageants de cellules cultivées en présence d'un anticorps anti-CD3 $\epsilon$  à la concentration de 0,1 $\mu$ g/mL ; cette condition de stimulation simule des conditions de faible stimulation du TCR, rencontrées par les cellules T matures dans les tissus périphériques ou lors de leur passage dans les organes lymphoïdes secondaires où ils sont susceptibles de subir des contacts avec des complexes « peptides du soi-CMH du soi » sans co-signal d'activation. D'autre part, une combinaison pro-mitogénique d'anticorps anti-CD3 $\epsilon$  à la concentration de 5 $\mu$ g/mL et d'anticorps anti-CD28 à la concentration de 2 $\mu$ g/mL a été utilisée en tant que témoin positif d'activation en présence de l'antigène et du co-signal d'activation délivré par la cellule dendritique mature.

Les résultats présentés sur les figures R8, R9, R10 montrent que l'IL-8 est la seule cytokine chimioattractante dont la sécrétion est stimulée par l'exposition au CFC seul pendant 48H indépendamment de toute stimulation du TCR dans les Th17, les « non Th17 » et les Tregs, et que cette production est plus importante dans les Th17 comparativement aux autres sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. La stimulation par une dose submitogénique d'anticorps anti-CD3 induit une production d'IL-8 par les « non Th17 » uniquement ; le niveau de cette production n'est pas modifiée par l'exposition simultanée au CFC. De même, le niveau de production d'IL-8 par les Th17 exposés au CFC pendant 48H, n'est pas modifié par l'adjonction d'une stimulation par une dose submitogénique d'anticorps anti-CD3, et est comparable à celle observée dans les « non Th17 » dans les mêmes conditions de culture. Enfin, la stimulation mitogénique induite par une combinaison d'anticorps anti-CD3 (5µg/mL) et anti-CD28 (2µg/mL) en absence de CFC induit dans les Th17 une forte production d'IL-8, plus importante que celle observée en présence de CFC seul ; l'adjonction de 5% de CFC aux cultures ne modifie pas ce taux de sécrétion. En ce qui concerne les « non Th17 », la stimulation pro-mitogénique induite par une combinaison d'anticorps anti-CD3 (5µg/mL) et anti-CD28 (2µg/mL), en absence et en présence de CFC, induit un taux de sécrétion d'IL-8 comparable à celui observé en présence d'anticorps anti-CD3 seul ou avec 5% de CFC, et en présence de 5% CFC seul.

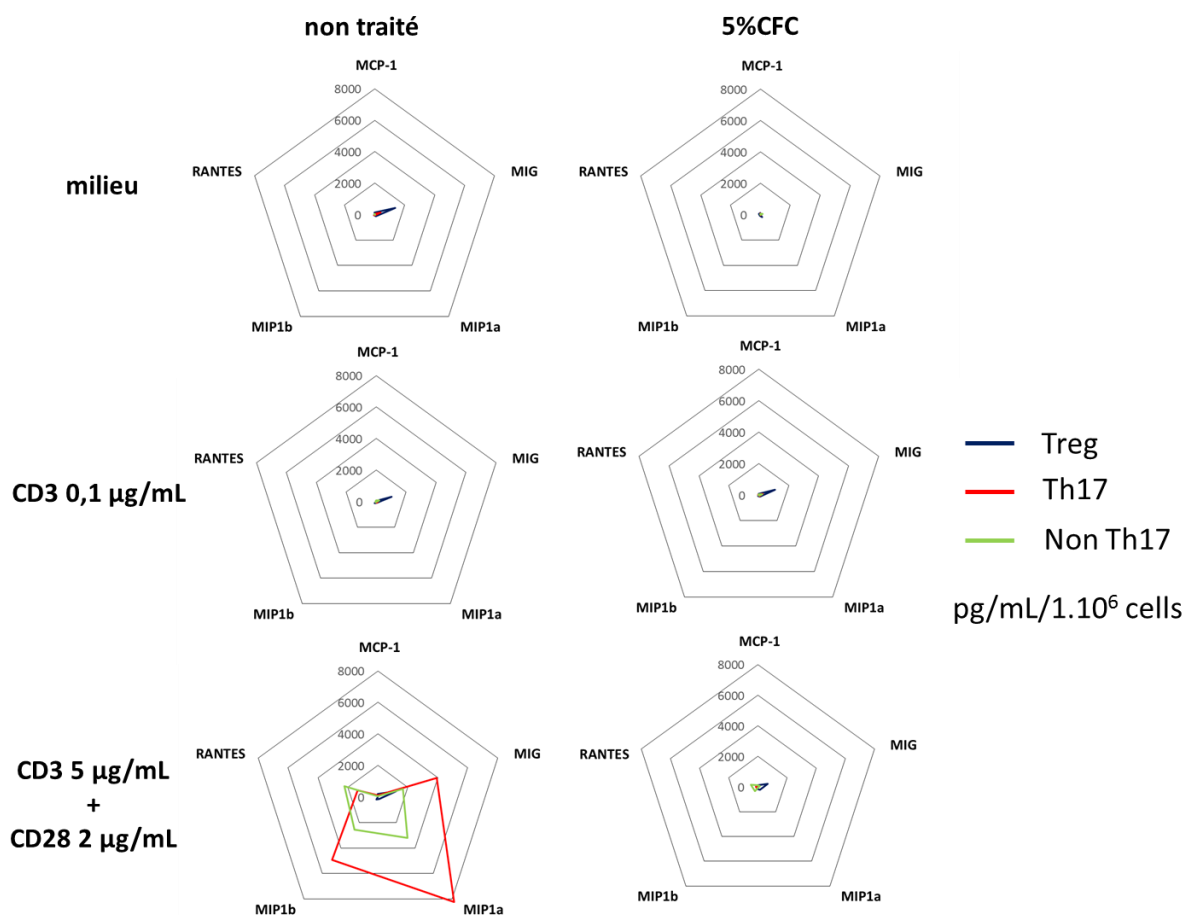


**Fig. R 8. La sécrétion d'IL-8 est induite par l'exposition au condensat de fumée de cigarette de lymphocytes Th17 en l'absence de stimulation du TCR.**

Des lymphocytes Tregs, Th17 et T CD4<sup>+</sup> conventionnels « non Th17 » isolés ont été exposés ou non au condensat de fumée de cigarette à 5% pendant 48H en absence d'activation (non traité) ou en présence d'une stimulation par un anticorps anti-CD3ε (CD3 0,1µg/mL), ou par un mélange d'anticorps anti-CD3ε (5µg/mL) et d'anticorps anti-CD28(2µg/mL). En fin de culture, la sécrétion des différentes cytokines a été dosée dans les surnageants à l'aide de la technique de CBA. Les résultats présentés sont exprimés en pg/mL/1.10<sup>6</sup> cellules mises en culture à T0 et représentent la moyenne de 4 expériences distinctes.

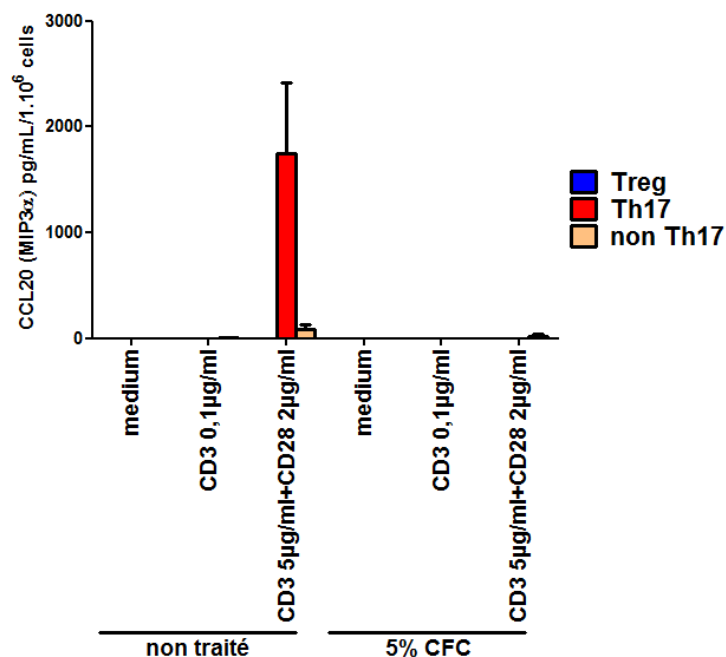
En revanche, les résultats présentés sur les figures R9 et R10 montrent que seule la condition de culture pendant 48H en présence d'une combinaison pro-mitogénique d'anticorps anti-CD3 (5µg/mL) et anti-CD28 (2µg/mL) permet d'induire la sécrétion des chimiokines CCL3 (MIP1α), CCL4 (MIP1β), MIG, CCL5 (RANTES) et CCL20 (MIP-3α) par les Th17 et « non

Th17 », et que ces chimiokines sont plus fortement exprimées par les Th17 comparativement aux « non Th17 ». L'adjonction de 5% de CFC à ces cultures inhibe la production de ces chimiokines par les deux types cellulaires.



**Fig. R 9. L'exposition à 5% de condensat de fumée de cigarette inhibe la sécrétion des chimiokines RANTES, MIG, MIP1 $\alpha$  et MIP1 $\beta$  par les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> activés par une combinaison pro-mitogénique d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28.**

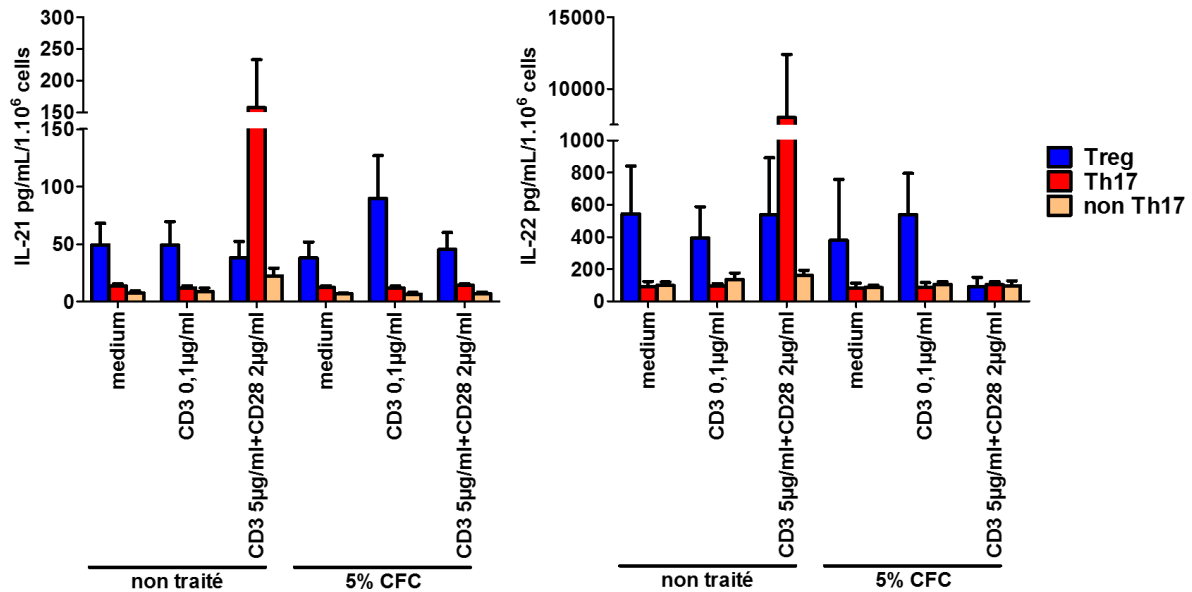
Des lymphocytes Tregs, Th17 et T CD4<sup>+</sup> conventionnels « non Th17 » isolés ont été exposés ou non au condensat de fumée de cigarette à 5% pendant 48H en absence de stimulation (non traité) ou en présence d'une stimulation par un anticorps anti-CD3 $\epsilon$  (CD3 0,1 $\mu$ g/mL), ou d'une stimulation par une combinaison d'anticorps anti-CD3 $\epsilon$  (5 $\mu$ g/mL) et anti-CD28 (2 $\mu$ g/mL). En fin de culture, les surnageants ont été récupérés et les différentes chimiokines dosées à l'aide de la technique CBA. Les résultats présentés sont exprimés en pg/mL/1.10<sup>6</sup> cellules mises en culture à T0, et représentent la moyenne de 4 expériences distinctes.



**Fig. R 10. L'exposition à 5% de condensat de fumée de cigarette inhibe la sécrétion de la chimiokine CCL20(MIP-3 $\alpha$ ) par les sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Th17 et « non-Th17 » activés par une combinaison mitogénique d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28.**

Des lymphocytes Tregs, Th17 et T CD4<sup>+</sup> conventionnels « non Th17 » isolés ont été exposés ou non au condensat de fumée de cigarette à 5% pendant 48H en absence de stimulation (non traité) ou en présence d'une stimulation par un anticorps anti-CD3 $\epsilon$  (0,1 $\mu$ g/mL), ou d'une combinaison pro-mitogénique d'anticorps anti-CD3 $\epsilon$  (5 $\mu$ g/mL) et anti-CD28 (2 $\mu$ g/mL). En fin de culture, les surnageants ont été récupérés et la chimiokine CCL20 dosée à l'aide de la technique de Luminex. Les résultats présentés sont exprimés en pg/mL/1.10<sup>6</sup> cellules mises en culture à T0 et représentent la moyenne de 4 expériences distinctes.

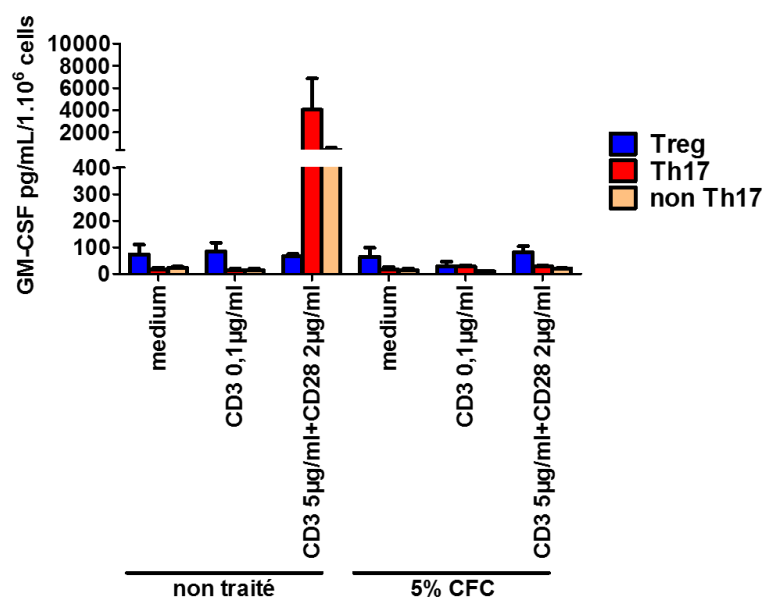
De même, les résultats présentés sur les figures R8 & R11 montrent que seule la condition de culture en présence d'une combinaison pro-mitogénique d'anticorps anti-CD3 (5 $\mu$ g/mL) et anti-CD28 (2 $\mu$ g/mL) pendant 48H permet d'induire la sécrétion des cytokines spécifiques des Th1 (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , LT $\alpha$ ), des « non-Th17 » pour Th2/Th9 (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, principalement), des Tregs (IL-10), et des Th17 (IL-17A, IL-6, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-21, IL-22, IL-10 possible aussi) dans les sous-populations correspondantes. L'adjonction de 5% de CFC aux cultures inhibe la production de ces différentes cytokines. Nous avons également analysé la sécrétion du TGF- $\beta$ ) dans les mêmes conditions, mais les résultats obtenus étaient ininterprétables.



**Fig. R 11. L'exposition au condensat de fumée de cigarette pendant 48H inhibe l'expression de l'IL-21 et l'IL-22 dans les lymphocytes Th17 activés par une combinaison pro-mitogénique d'anti-CD3 et d'anti-CD28.**

Des lymphocytes Tregs, Th17 et T CD4<sup>+</sup> conventionnels « non Th17 » isolés ont été exposés ou non au condensat de fumée de cigarette à 5% pendant 48H en absence d'activation (non traité) ou en présence d'une stimulation par un anticorps anti-CD3ε (CD3 0,1µg/mL), ou par une combinaison mitogénique d'anticorps anti-CD3ε (5µg/mL) et anti-CD28 (2µg/mL). En fin de culture, la sécrétion des différentes cytokines a été dosée dans les surnageants à l'aide de la technique Luminex. Les résultats présentés sont exprimés en pg/mL/1.10<sup>6</sup> cellules mises en culture à T0 et représentent la moyenne de 4 expériences distinctes.

Enfin, nous avons analysé l'expression protéique de facteurs de croissance susceptibles d'activer d'autres cellules immunitaires, ou d'avoir un effet sur les épithéliums (FGF, G-CSF, GM-CSF, EGF, PDGF-BB, VEGF). Les résultats obtenus montrent uniquement une induction de la production de GM-CSF par les Th17 et « non Th17 » stimulés par une combinaison pro-mitogénique d'anticorps anti-CD3ε (5µg/mL) et anti-CD28 (2µg/mL). L'adjonction de 5% de CFC dans ces conditions de culture a pour effet d'inhiber l'expression du GM-CSF (Fig. R12). Pour les autres facteurs de croissance testés, nous avons constaté une absence d'expression ou de modulation de la sécrétion dans les différentes conditions analysées.



**Fig. R 12. L'exposition au condensat de fumée de cigarette pendant 48H inhibe l'expression du GM-CSF dans les lymphocytes Th17 et « non-Th17 » activés par une combinaison pro-mitogénique d'anti-CD3 et d'anti-CD28.**

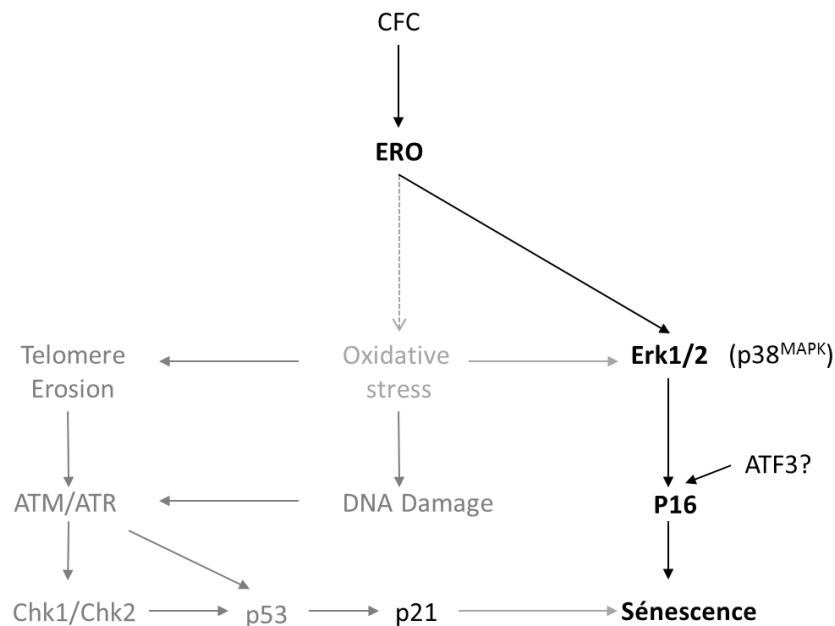
Des lymphocytes Tregs, Th17 et T CD4<sup>+</sup> conventionnels « non Th17 » isolés ont été exposés ou non au condensat de fumée de cigarette à 5% pendant 48H en absence de stimulation (non traité) ou en présence d'une stimulation par un anticorps anti-CD3ε (CD3 0,1µg/mL), ou en présence d'une combinaison mitogénique d'anti-CD3ε (5µg/mL) et d'anti-CD28 (2µg/mL). En fin de culture, les surnageants ont été récupérés et les différentes chimiokines ont été dosées à l'aide de la technique CBA. Les résultats présentés sont exprimés en pg/mL/1.10<sup>6</sup> cellules mises en culture à T0, et représentent la moyenne de 4 expériences distinctes.

### III. La voie des MAPKs ERK1/2 est impliquée dans la sur-expression de p16<sup>INK4a</sup> dans les lymphocytes Th17 quiescents en réponse à une exposition au CFC.

Il a été montré dans différents types cellulaires que la voie ERK1/2 est impliquée dans l'expression de p16<sup>INK4a</sup> (Ye J, 2012, Shin J, 2013, Wu PK, 2015) et/ou dans la sénescence (Wang W, 2002). Par ailleurs, différents travaux, dont les nôtres, montrent une régulation particulière de la voie ERK1/2 dans les lymphocytes Th17 par rapport aux autres sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Tan AH, 2010, Liu H, 2013, Kerbrat S, 2015).

Après avoir mis en évidence l'induction d'une expression de p16<sup>INK4a</sup> plus importante dans les Th17 que dans les « non Th17 » et les Tregs après une exposition au CFC, nous avons donc analysé le rôle de la voie de signalisation ERK1/2 dans l'expression de p16<sup>INK4a</sup> dans les

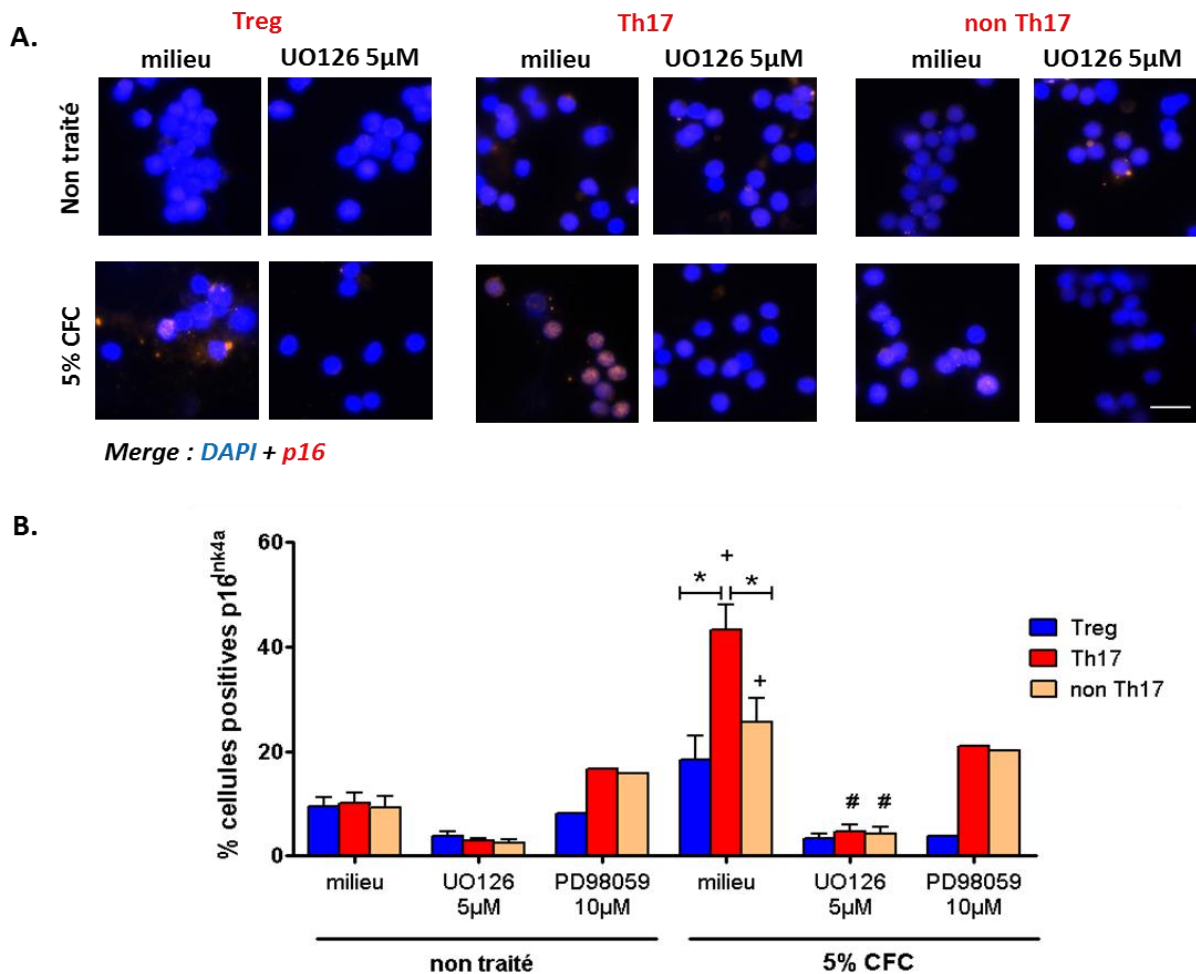
différentes sous-populations de LT CD4<sup>+</sup> après exposition au CFC. Le fil directeur de notre analyse est résumé dans la figure R13.



**Fig. R 13. Place de la voie ERK1/2 dans les voies de signalisation susceptibles d'induire la sénescence des cellules exposées au condensat de fumée de cigarette.**

*D'après Muller M, 2009.*

Nous avons tout d'abord vérifié que la voie des MAPks ERK1/2 est impliquée dans l'expression de p16<sup>INK4a</sup> induite après une exposition au CFC de sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Th17 et « non-Th17 » quiescents. Pour cela nous avons analysé l'effet d'un prétraitement par deux inhibiteurs de MAPkinases kinases (MAPKK), UO126 et PD98059, qui inhibent la phosphorylation de ERK1/2 par MEK1 & MEK2, sur l'induction de l'expression de p16<sup>INK4a</sup> dans les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> après exposition, ou non, à 5% de CFC pendant 24H. Les résultats présentés sur la Fig. R14 montrent que le prétraitement par l'inhibiteur UO126 prévient l'induction de l'expression de p16<sup>INK4a</sup> dans les différentes sous-populations exposées à la fumée de cigarette, et supprime la différence de taux d'expression de p16<sup>INK4a</sup> entre les Th17 et les deux autres sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. L'inhibiteur PD98059 supprime également la différence de taux d'expression de p16<sup>INK4a</sup> entre les Th17 et les « non-Th17 », malgré un effet inhibiteur moindre sur l'expression de p16<sup>INK4a</sup> induite par l'exposition au CFC. Nos résultats sont donc en faveur du rôle de la voie de signalisation impliquant ERK1/2 dans l'expression de p16<sup>INK4a</sup> induite par l'exposition au CFC de façon plus importante dans les Th17 que dans les autres lymphocytes T CD4<sup>+</sup> conventionnels.



**Fig. R 14. Les inhibiteurs de la voie ERK1/2 préviennent la sur-expression de  $p16^{INK4a}$  induite dans les Th17 exposés au condensat de fumée de cigarette.**

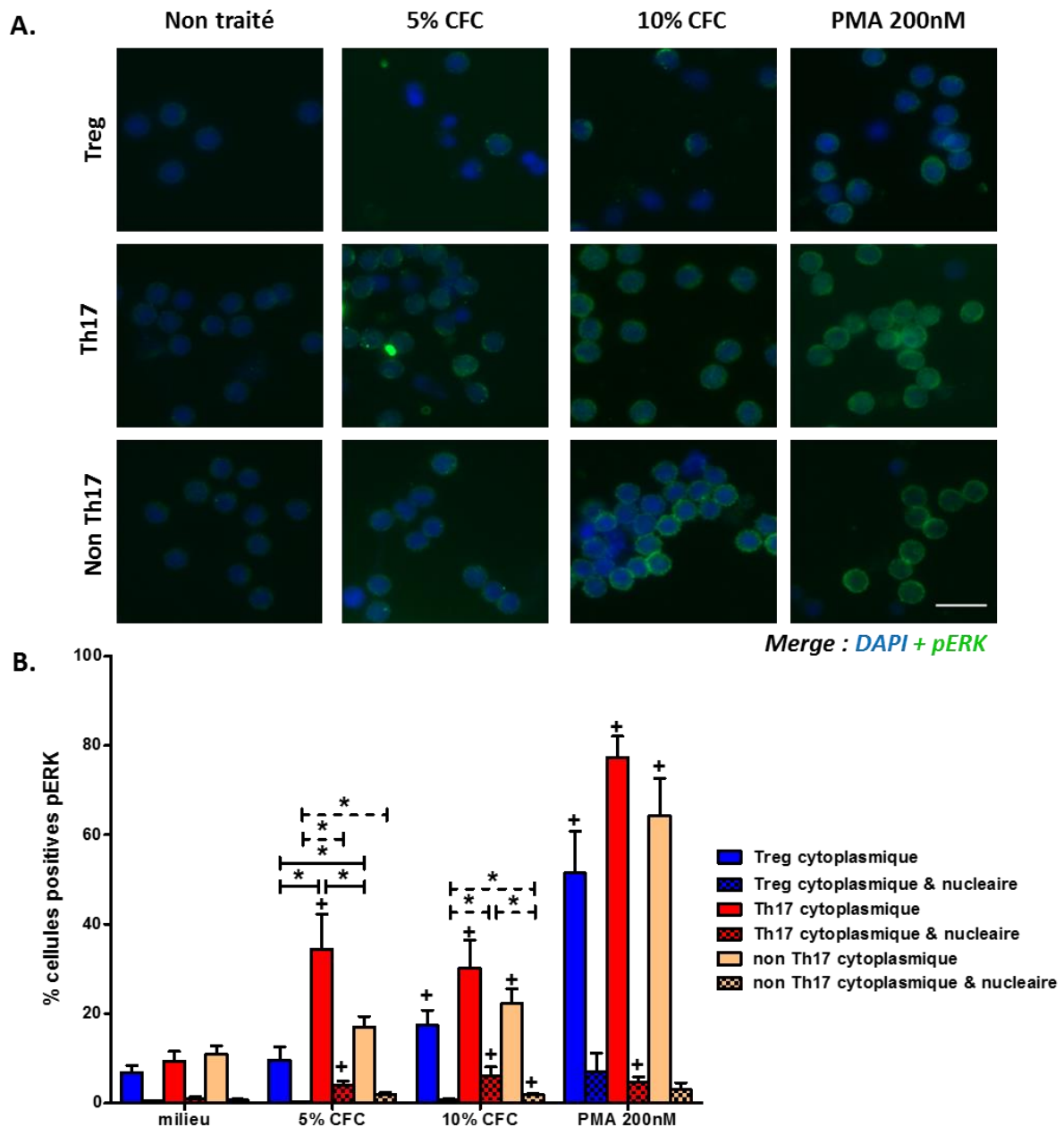
Des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> conventionnels Th17 et « non Th17 » et Tregs isolés, et préalablement traités par des inhibiteurs de MAPKK, UO126 à 5μM et PD98059 à 10μM, ont ensuite été exposés ou non au CFC à 5% pendant 24H. L'expression de  $p16^{INK4a}$  est analysée en immunocytofluorescence, et la numération des cellules présentant un marquage positif pour  $p16^{INK4a}$  (marquage nucléaire en pointillés de couleur rouge) est réalisée. Les noyaux sont identifiés à l'aide d'un marquage par le DAPI de couleur bleue. Des images représentatives des 3 sous-populations en absence de traitement par le CFC ou exposées à 5% de CFC sont montrées en A., la barre d'échelle correspond à 20μm, les moyennes +/- SEM des numérations des cellules positives pour le marquage  $p16^{INK4a}$  sont présentées en B. UO126 N=4, PD98059 N=1.

\*  $p < 0,05$ , +  $p < 0,05$  par rapport à la condition non traitée par CFC, #  $p < 0,05$  par rapport à la condition milieu correspondante. Mann-Whitney U.

Nous avons ensuite vérifié que ces kinases ERK1/2 sont bien activées lors d'une exposition au CFC. Nous avons donc analysé par ICF la phosphorylation et la localisation sub-cellulaire des formes phosphorylées de ERK1/2 dans les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> en l'absence d'exposition au CFC ou après exposition au CFC pendant 15 minutes. La stimulation par du PMA, un analogue du diacylglycérol, qui permet de simuler une activation de ERK1/2 dépendante du complexe TCR/CD3 en évitant les phases membranaires de cette activation a été utilisée comme témoin positif.

Nos résultats montrent qu'en absence d'exposition au CFC, on observe un niveau de phosphorylation de ERK1/2 très faible et comparable dans les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Fig. R15 A&B). L'exposition à 5% de CFC induit une augmentation du pourcentage de cellules Th17 présentant un marquage positif pour phospho-ERK1/2 cytoplasmique significativement plus important que dans les Tregs et « non Th17 » (Fig. R15 A&B). L'exposition à 10% de CFC permet d'induire une augmentation du nombre de cellules présentant un marquage phospho-ERK1/2 cytoplasmique dans les trois sous-populations étudiées. En revanche, l'exposition au CFC, quel que soit la dose, n'induit la translocation nucléaire des formes phosphorylées de ERK1/2, identifiée par un marquage sous forme de pointillés dans le noyau, que dans les lymphocytes Th17. De même la stimulation par le PMA induit une phosphorylation de ERK1/2 dans les trois sous-populations étudiées, mais seuls les Th17 présentent un marquage-type de translocation nucléaire des formes phosphorylées de ERK1/2 statistiquement significatif.

Au total, les résultats présentés ici indiquent clairement que la voie ERK1/2 est plus sensible et régulée de façon particulière dans les Th17 en réponse à une exposition à la fumée de cigarette.



**Fig. R 15. L'exposition au CFC induit une activation et une translocation nucléaire de ERK1/2 plus importante dans les Th17.**

Des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> conventionnels Th17 et « non Th17 » et Tregs isolés, ont été exposés au condensat de fumée de cigarette à 5% ou 10%, ou stimulés par du PMA (200 nM) pendant 15 minutes. L'expression de phospho-Erk1/2 est analysée par immunocytofluorescence et la numération des cellules présentant un marquage cytoplasmique de couleur verte, ou un marquage nucléaire prenant l'aspect de pointillés verts a été réalisée. Les noyaux sont marqués par le DAPI. Des images représentatives des 3 sous-populations en absence de traitement, exposées à 5% et 10% de CFC, ou stimulées par du PMA, sont montrées en A., la barre d'échelle

correspond à 20µm, les moyennes +/- SEM des numérations des cellules présentant un marquage phospho-ERK1/2 cytoplasmique, ou un marquage phospho-ERK1/2 cytoplasmique et nucléaire sont présentées en B. N=10.

\*  $p < 0,05$ , +  $p < 0,05$  par rapport à la condition non traitée. Mann-Whitney U.

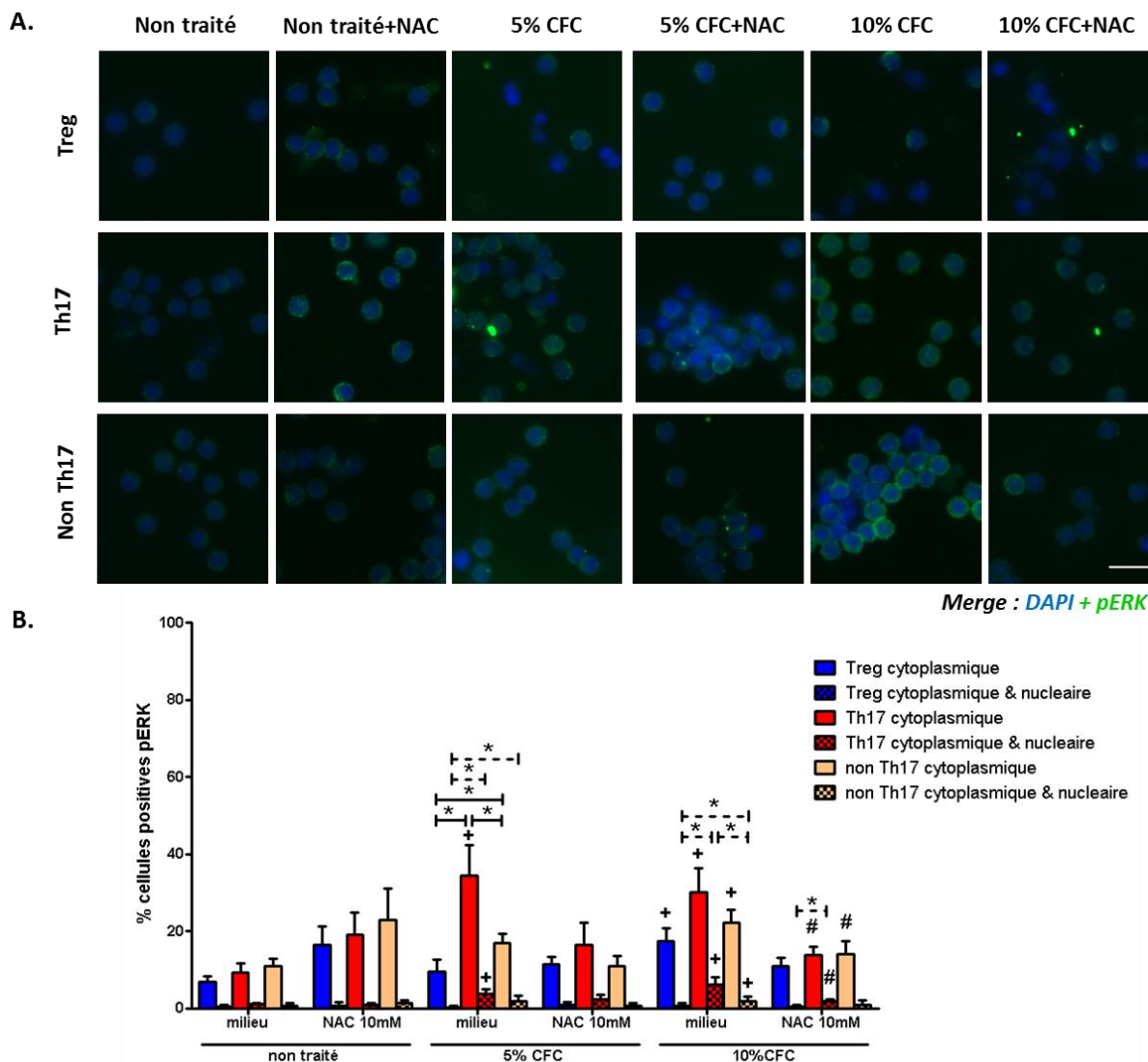
#### IV. Les espèces réactives de l'oxygène contribuent à la spécificité de l'activation de ERK1/2 dans les lymphocytes Th17 quiescents exposés au CFC.

La fumée de cigarette contient plus de 4500 composés et parmi eux des ERO (Pryor WA, 1993, Wooten JB, 2006, Valavanidis A, 2009). Le rôle des ERO a été démontré dans l'induction de la sénescence de différents types cellulaires (Chen QM, 2000, Tsuji T, 2004, Nyunoya T, 2006) (Fig. R13). Par ailleurs, il a été montré que l'activation de la voie de signalisation ERK1/2 dans les lymphocytes T est sensible à la présence d'ERO, et en particulier par l'inhibition des phosphatases liée à la production d' $H_2O_2$  (Guyton KZ, 1996, Finkel T, 1998, Devadas S, 2002, Kwon J, 2003).

Nous avons donc ensuite analysé le rôle potentiel des ERO présentes dans le CFC et/ou produites en réponse à l'exposition au CFC, dans l'induction de la phosphorylation de ERK1/2 et de sa translocation nucléaire. Pour cela, nous avons prétraité pendant 1H30 des cellules triées Tregs, Th17 et « non Th17 » par de la NAC (10mM) avant de les exposer au CFC à 5 % ou à 10%, pendant 15 minutes. Dans ces conditions de prétraitement, la NAC agit comme agent piègeur des radicaux libres, en interagissant avec l' $HO^\bullet$  et l' $H_2O_2$  (Zafarullah M, 2002) ; en effet, dans les lymphocytes T, les temps de traitement par la NAC, précurseur de la L-cystéine et du glutathion réduit, permettant de reconstituer les stocks de glutathion réduit sont de 24H (Maurice MM, 1997).

Les résultats obtenus (Fig. R16) montrent que le prétraitement par la NAC permet de réduire le pourcentage de cellules présentant un marquage phospho-ERK1/2 cytoplasmique dans les 3 sous-populations de lymphocytes T, et de prévenir la translocation nucléaire des formes phosphorylées de ERK1/2 dans les Th17 lors d'une exposition au CFC à 10%. De même, l'effet inhibiteur de la NAC est observé pour l'activation d'ERK1/2 dans les Th17, en cas d'exposition à 5% de CFC. En absence d'exposition au CFC, le prétraitement par la NAC induit une tendance à l'augmentation de la phosphorylation de ERK1/2 dans les différentes sous-populations, sans pour autant induire une translocation nucléaire des formes phosphorylées de ERK1/2. Nos résultats suggèrent donc que les ERO apportées par le CFC ou produites en réponse à

l'exposition au CFC sont impliquées dans l'activation et la translocation nucléaire de ERK1/2 dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ; de plus, nos résultats suggèrent également que les Th17 sont plus sensibles à l'effet du CFC que les « non-Th17 » et les Tregs.



**Fig. R 16. Lors d'une exposition au CFC, les ERO sont responsables de l'activation de ERK1/2 et de sa translocation nucléaire dans les lymphocytes Th17.**

Des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> conventionnels Th17 et « non Th17 », et Tregs isolés, ont été prétraités par de la NAC à 10mM, puis ont été exposés ou non au condensat de fumée de cigarette à 5% ou 10% pendant 15 min. L'expression de phospho-Erk1/2 est ensuite analysée par immunocytofluorescence, et la numération des cellules présentant un marquage cytoplasmique de couleur verte, ou un marquage nucléaire prenant l'aspect de pointillés verts est réalisée. Les noyaux sont marqués par le DAPI. Des images représentatives des 3 sous-populations en absence de traitement, exposées à 5% et 10% de CFC, ou stimulées par du PMA

200nM, sont montrées en A., la barre d'échelle correspond à 20µm, les moyennes +/- SEM des numérations des cellules présentant un marquage phospho-ERK1/2 cytoplasmique, ou un marquage phospho-ERK1/2 cytoplasmique et nucléaire sont présentées en B. N=6.

\*  $p < 0,05$ , +  $p < 0,05$  par rapport à la condition non traitée, #  $p < 0,05$  par rapport à la condition milieu correspondante. Mann-Whitney U.

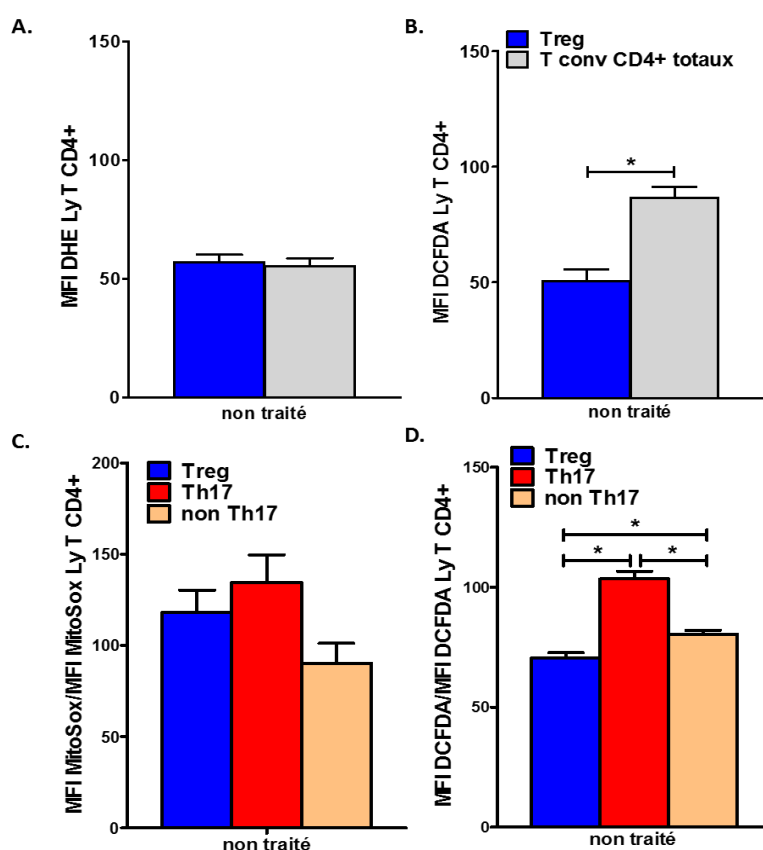
## V. Les lymphocytes Th17 quiescents exposés au condensat de fumée de cigarette produisent plus d' $H_2O_2$ que les « non Th17 » et les Tregs.

Les résultats obtenus précédemment impliquent clairement les ERO dans la phosphorylation de ERK1/2 et sa translocation nucléaire dans les Th17 en réponse à l'exposition au CFC. Une production d'ERO stimulée de façon plus importante dans les Th17 par l'exposition au CFC pourrait expliquer la plus grande susceptibilité de ces lymphocytes à la sénescence dépendante d'ERK1/2 induite par l'exposition à la fumée de cigarette. Nous avons donc analysé les niveaux d'ERO des différentes sous-populations de lymphocytes T  $CD4^+$  après exposition au CFC, ou non. Cette analyse est réalisée en cytométrie en flux, grâce à une stratégie de « gating » (cf Matériels et méthodes) permettant d'identifier simultanément les Tregs, Th17 et « non Th17 », et les différentes sondes rendues fluorescentes par oxydation en présence des différentes ERO produites.

Nous avons tout d'abord analysé les niveaux d'ERO dans les différentes sous-populations de lymphocytes T  $CD4^+$  en absence d'exposition au CFC, à l'aide de trois sondes, le DHE, le DCFDA et le MitoSox. Le DHE est une forme réduite du bromure d'éthidium (BET) et est oxydé de manière sélective par l' $O_2^{\bullet-}$ . Le MitoSox également est oxydé de manière sélective par l' $O_2^{\bullet-}$ ; c'est un composant qui cible particulièrement les mitochondries dans les cellules vivantes, et l'oxydation du MitoSox par l' $O_2^{\bullet-}$  mitochondrial produit une augmentation de la fluorescence de cette sonde. Enfin, une augmentation de la fluorescence du DCFDA indique une oxydation préférentielle par les radicaux peroxydes, peroxynitrite et/ou les radicaux hydroxyles. Néanmoins, il existe un consensus quant à une augmentation de la fluorescence du DCFDA proportionnelle à la concentration intracellulaire en  $H_2O_2$ .

Les résultats obtenus montrent qu'en absence d'exposition au CFC, les lymphocytes Tregs et les lymphocytes T  $CD4^+$  conventionnels totaux présentent une oxydation identique de la sonde DHE indiquant des niveaux identiques de production globale d' $O_2^{\bullet-}$  (Fig. R17 A.). De même,

l'analyse des taux d' $O_2^{\bullet-}$  à l'aide de la sonde MitoSox montre une production basale d' $O_2^{\bullet-}$  par la mitochondrie de niveau comparable entre les Th17 et les Tregs et « non Th17 » (Fig. R17 C.). En revanche, l'analyse de l'oxydation de la sonde DCFDA, montre une production basale d'ERO plus importante dans les T CD4<sup>+</sup> conventionnels totaux par rapport aux Tregs (Fig. R18 B.). Parmi les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> conventionnels totaux, les Th17 présentent une oxydation de la sonde DCFDA significativement plus importante que celle des Tregs et « non Th17 », et les « non Th17 » présentent une oxydation du DCFDA plus importante que celle des Tregs (Fig. R18 D.). Ces résultats suggèrent un taux basal d' $H_2O_2$  plus important dans les Th17 quiescents.



**Fig. R 17. Les lymphocytes Th17 ont un taux basal d' $H_2O_2$  plus élevé que les Tregs et « non Th17 ».**

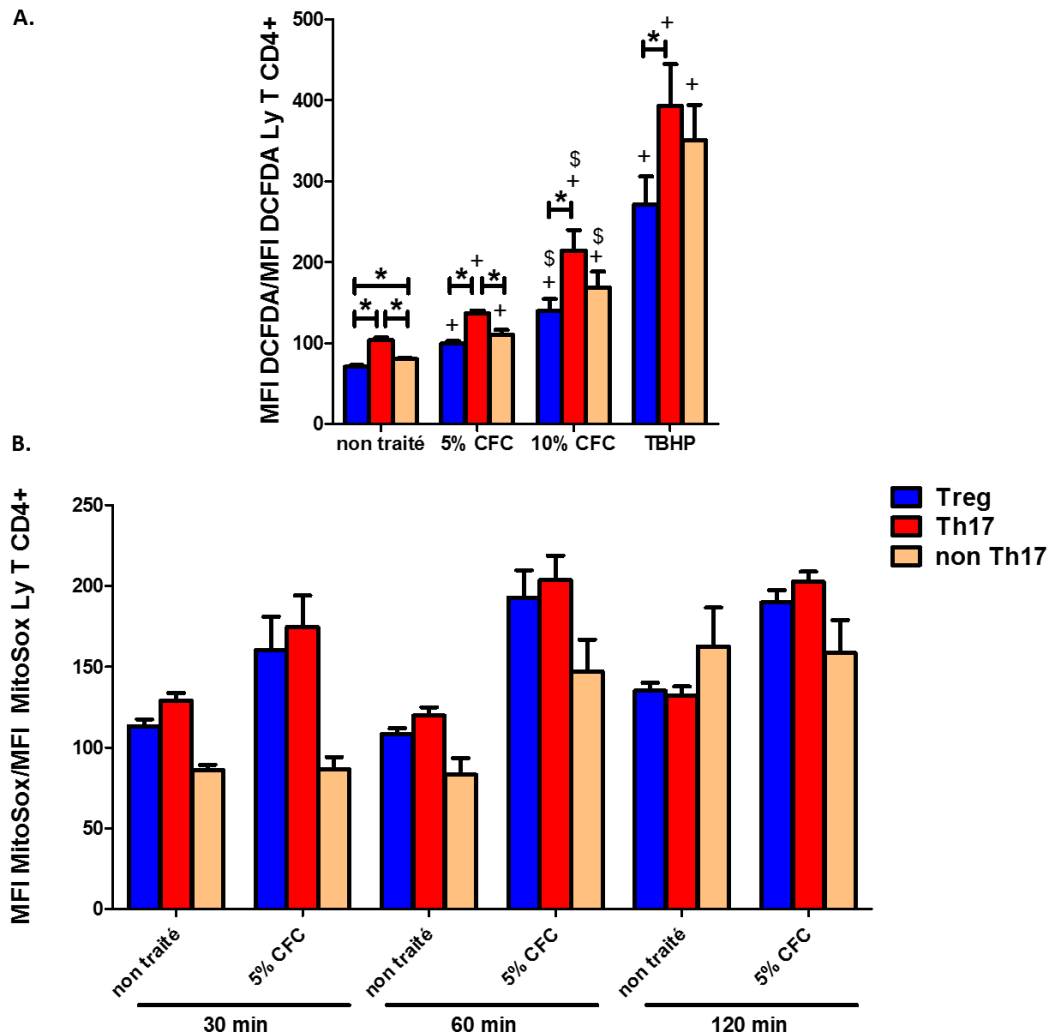
Les niveaux d' $O_2^{\bullet-}$  et d' $H_2O_2$  ont été mesurés par cytométrie en flux dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> conventionnels Th17 et « non Th17 », et Tregs, identifiés à l'aide d'une stratégie de « gating » adaptée au sein de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> totaux. **(A. et B.)** Les niveaux d' $O_2^{\bullet-}$  et d' $H_2O_2$  en absence de stimulation ont été mesurés à l'aide respectivement des sondes DHE et  $H_2DCF$ -DA dans les Tregs et les T CD4<sup>+</sup> conventionnels totaux à 30 minutes. **(C.)** Les niveaux d' $O_2^{\bullet-}$  mitochondriaux ont été mesurés à 30 minutes à l'aide de la sonde MitoSox, et **(D.)** les niveaux

*d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ont été mesurés à l'aide de la sonde H<sub>2</sub>DCF-DA dans les Tregs, et T CD4<sup>+</sup> conventionnels Th17 et « non Th17 » à 30minutes. Les données présentées sont les moyennes +/-SEM des moyennes de fluorescence (MFI) de la sonde correspondante dans les différentes sous-populations normalisées par rapport à la MFI de la sonde correspondante dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> totaux en absence de stimulation, de 4 (A. et B.), 3 (C.) et 16 (D.) expériences.*

*\* p<0,05, Mann-Whitney U*

Nous avons ensuite analysé la variation de production d'ERO dans les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> en réponse à une exposition au CFC à 5% et 10%. Les résultats présentés sur la Fig.R18 A montrent que l'exposition au CFC induit une augmentation de l'oxydation de la sonde DCFDA dans les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Cette augmentation est dépendante de la dose de CFC, et est de niveau comparable à celle observée en réponse à l'exposition au *tert*-butyl hydrogen peroxide (TBHP), utilisé comme contrôle positif de la production d'ERO. De plus, comme à l'état basal, le taux d'oxydation de la sonde DCFDA est plus important dans les Th17 que dans les « non-Th17 » et les Tregs pour une exposition à 5% de CFC ; en revanche pour une exposition à 10% de CFC le taux d'oxydation de la sonde DCFDA dans les Th17 et les « non-Th17 » est comparable, tout comme dans le cas d'une stimulation par le TBHP. Ce résultat suggère que les Th17 sont réactifs à des taux plus faibles de CFC et produisent plus d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que les « non-Th17 » à l'exposition au CFC, alors qu'à des taux plus élevés la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est comparable ; les Tregs produisent moins d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que les Th17 quel que soit le taux de CFC dans les cultures.

Dans les lymphocytes T la chaîne respiratoire mitochondriale est une source d'ERO importante. L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> généré par la dismutation de l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> mitochondrial produit par les complexes I et III de la chaîne respiratoire mitochondriale, est nécessaire pour la cascade d'activation spécifique de l'antigène des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Kaminski MM, 2012, Sena LA, 2013). Nous avons donc également analysé à l'aide de la sonde MitoSox la production d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> mitochondrial en réponse à une exposition de 30, 60 et 120 minutes à 5% de CFC. Les résultats obtenus ne montrent pas d'augmentation significative de la production d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> mitochondrial lors d'une exposition à 5% de CFC quel que soit le temps d'exposition. De plus, les taux d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> mitochondrial restent comparables dans les différentes sous-populations de lymphocytes T étudiées et exposées au CFC (Fig. R18 B.).



**Fig. R 18.** En réponse à une exposition au CFC, la production d' $H_2O_2$  est augmentée dans les Th17 et « non Th17 », Tregs, mais pas la production d' $O_2^{\bullet-}$  mitochondrial.

**(A.).** L'oxydation de la sonde  $H_2DCF-DA$  a été mesurée en cytométrie en flux dans les lymphocytes Tregs, et  $T CD4^+$  conventionnels Th17 et « non-Th17 » après 30 minutes d'exposition à 5 et 10% de CFC. La mesure de l'oxydation de la même sonde en réponse à 30 minutes d'exposition au TBHP est utilisée comme contrôle positif de la production d'ERO. **(B.)** Les niveaux d' $O_2^{\bullet-}$  mitochondriaux ont été mesurés après 30, 60 et 120 minutes d'exposition à 5% de CFC à l'aide de la sonde MitoSox. Les données présentées montrent les moyennes  $\pm$  SEM MFI de la sonde correspondante dans les différentes sous-populations normalisées par rapport à la MFI de la sonde correspondante dans les lymphocytes  $T CD4^+$  totaux en absence de stimulation de 5 (A. 5% CSE), 15 (A. 10% CFC) et 3 (B.) expériences.

\*  $p < 0,05$ , +  $p < 0,05$  par rapport à la condition non traité, \$  $p < 0,05$  par rapport à la condition 5% CFC. Mann-Whitney U.

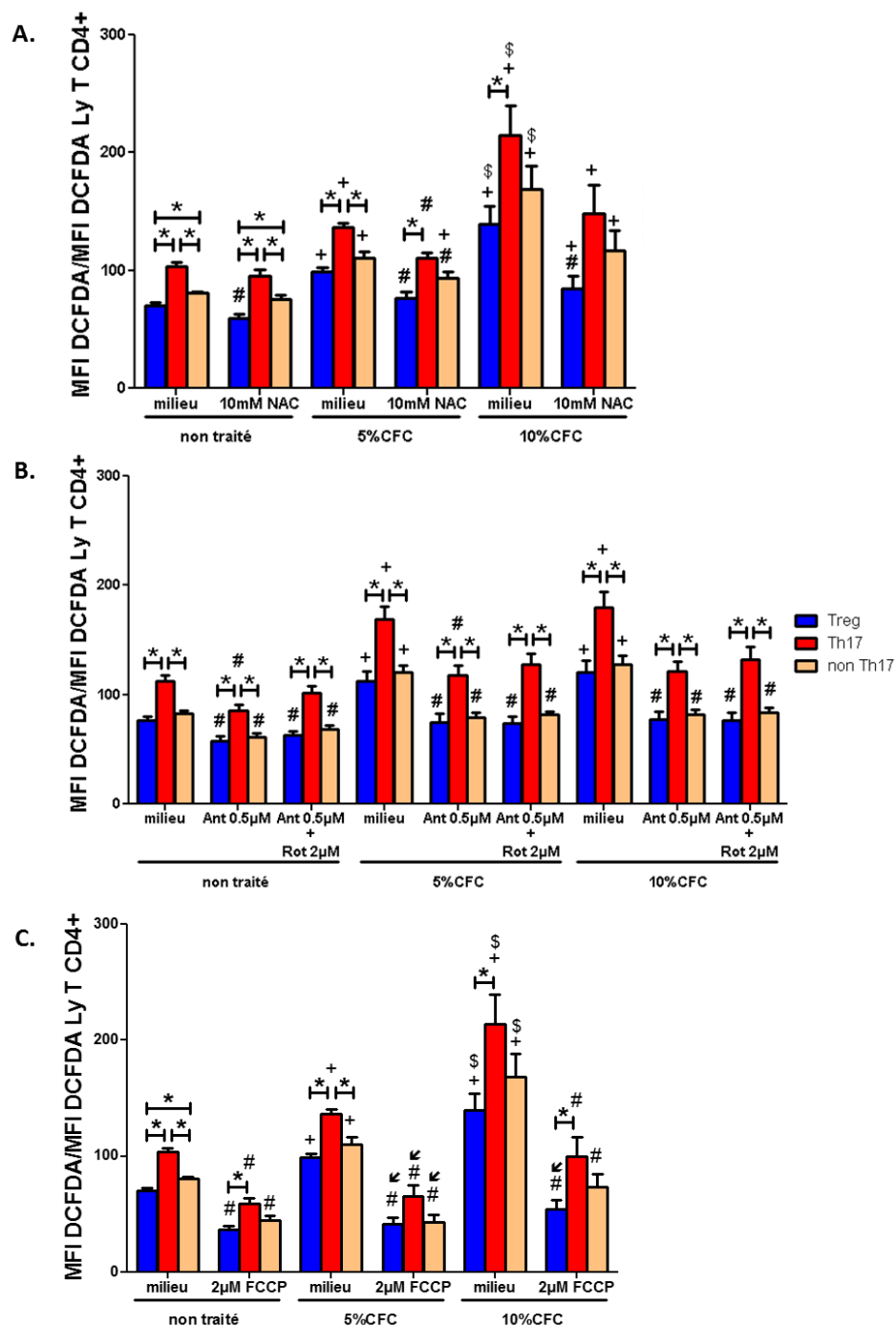
La NAC est utilisée dans notre système expérimental dans des conditions de piégeur des ERO intracellulaires. Les résultats présentés sur la figure R19A montrent que le prétraitement par la NAC, en absence de stimulation ne modifie pas les niveaux de production basale d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> des Th17 et « non Th17 », et les différences relatives de taux basal d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> observées entre les différentes sous-populations. En réponse à une exposition à des doses croissantes de CFC, les niveaux d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sont augmentés de manière dépendante des doses et les différences relatives observées entre les différentes sous-populations en l'absence d'exposition au CFC sont conservées. Lorsque les cellules sont exposées à une dose de 5% de CFC, le prétraitement par la NAC permet de prévenir l'augmentation des niveaux d'ERO dans les Tregs et les Th17, et de partiellement prévenir cette augmentation dans les « non Th17 ». En revanche, le prétraitement par la NAC n'inhibe que partiellement l'augmentation de la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les cellules exposées à 10% de CFC. Cependant, le traitement par la NAC supprime les différences de taux d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entre Th17 et « non-Th17 » observées en absence et en présence d'exposition au CFC.

L'absence d'effet de la NAC sur les niveaux d'ERO produites en absence d'exposition au CFC, et la diminution partielle des taux d'ERO dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> prétraités par la NAC et exposés à des doses croissantes de CFC montrent que les ERO contenues dans le CFC sont impliquées mais ne sont que partiellement responsables de l'augmentation des taux d'ERO dans les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> exposés au CFC. Ces résultats suggèrent que l'augmentation de la production d'ERO observée lors d'une exposition au CFC est liée à une production endogène d'ERO.

Le prétraitement par des inhibiteurs des complexes I et III de la chaîne respiratoire mitochondriale (Fig R19B), montre que, en absence d'exposition au CFC, le prétraitement par l'antimycine, l'inhibiteur du complexe III, et le prétraitement par la combinaison de l'antimycine avec la roténone, un inhibiteur du complexe I, diminuent significativement les niveaux d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> des Tregs et « non Th17 ». Le prétraitement par l'antimycine seule diminue significativement les niveaux de production basale d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> des Th17, alors que la combinaison de l'antimycine et de la roténone ne modifie pas les niveaux d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> des Th17. Ces deux prétraitements conservent la production basale d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plus importante dans les Th17 en absence de stimulation. Lorsque les cellules sont exposées à des doses de 5% et 10% de CFC, le prétraitement par l'antimycine, et le prétraitement par la combinaison de l'antimycine avec la roténone, préviennent partiellement l'augmentation des niveaux d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> des Tregs, Th17 et « non Th17 ». De plus, le prétraitement par ces inhibiteurs de la chaîne respiratoire

mitochondriale conserve la différence de production d' $\text{H}_2\text{O}_2$  dans les Th17, plus importante que dans les deux autres sous-populations.

Enfin, le découplage de la chaîne électronique mitochondriale par le prétraitement par le FCCP (Fig R19C), en absence d'exposition au CFC, diminue significativement les niveaux de production basale d' $\text{H}_2\text{O}_2$  des Tregs, Th17 et « non Th17 ». De plus, ce prétraitement supprime la différence de taux basal d' $\text{H}_2\text{O}_2$  entre Th17 et « non-Th17 » mais pas celle entre Tregs et Th17. En réponse à une exposition à des doses croissantes de CFC, le prétraitement par le FCCP prévient totalement l'augmentation des niveaux d'ERO dans les trois sous-populations de lymphocytes T  $\text{CD4}^+$ . De plus, lorsque les cellules sont exposées à une dose de 5% de CFC, le prétraitement par le FCCP supprime les différences de taux d' $\text{H}_2\text{O}_2$  observées à l'état basal entre les 3 sous-populations. Dans les cellules exposées à 10% de CFC le prétraitement par le FCCP supprime également les différences de taux d' $\text{H}_2\text{O}_2$  observées à l'état basal entre Th17 et « non-Th17 » mais celle entre Tregs et Th17 est conservée.

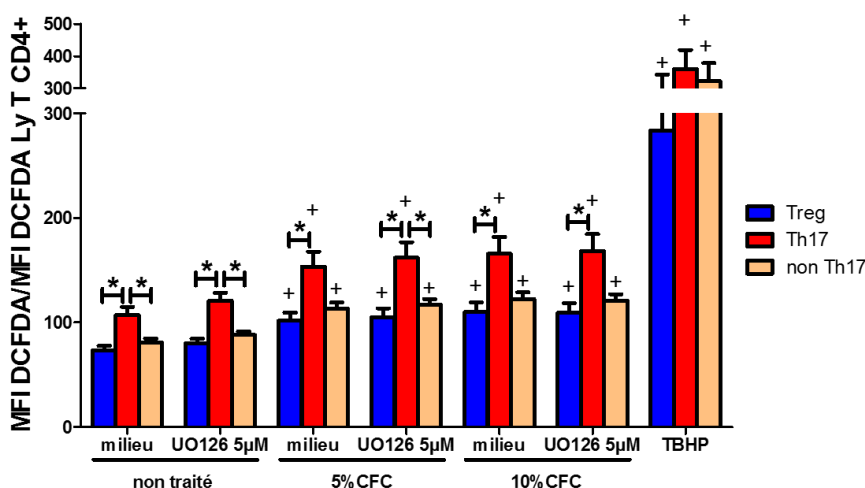


**Fig. R 19. Effet du traitement anti-oxydant par la NAC, et des traitements par l'antimycine, la rotéonone et le FCCP sur la production d'ERO dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> exposés à la fumée de cigarette.**

Des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ont préalablement été traités par (A.) de la NAC (10mM) pendant 1H30, (B.) de l'antimycine (0,5µM) ou une combinaison d'antimycine (0,5µM) et de roténone (2µM) pendant 30 min, (C.) du FCCP (2µM) pendant 30 min. L'oxydation de la sonde H<sub>2</sub>DCF-DA a été ensuite mesurée par cytométrie en flux dans les lymphocytes Tregs, et T CD4<sup>+</sup> conventionnels Th17 et « non-Th17 » après 30 minutes d'exposition à 5 et 10% de CFC. Les

données présentées montrent les moyennes  $\pm$  SEM MFI de la sonde  $H_2DCF\text{-}DA$  dans les différentes sous-populations normalisées par rapport à la MFI de la sonde dans les lymphocytes  $T\ CD4^+$  totaux en absence de stimulation de respectivement 8, 6 et 8 expériences. \*  $p < 0,05$ , + augmentation  $p < 0,05$  par rapport à la condition milieu non traitée,  $\nabla$  diminution  $p < 0,05$  par rapport à la condition milieu non traitée, #  $p < 0,05$  par rapport à la condition milieu correspondante, \$  $p < 0,05$  par rapport à la condition 5% CFC. Mann-Whitney U.

Nous avons précédemment montré que les ERO sont responsables de la phosphorylation et de la translocation des formes phosphorylées de ERK1/2 dans les Th17 (Fig. R16). Nous ne savons, en revanche, pas si la production d'ERO induites par l'exposition au CFC est cause ou conséquence de l'activation de la voie de signalisation de ERK1/2. Pour répondre à cette question nous avons pré-traité des cellules  $T\ CD4^+$  par un inhibiteur des MAPKK, le UO126 ( $5\mu M$ ) avant d'exposer les cellules au CFC. Les résultats obtenus (Fig R20) montrent que ce prétraitement n'a pas d'effet sur la production basale d'ERO. De même l'augmentation de la production d'ERO en réponse à une exposition au CFC n'est pas modifiée par le prétraitement par le UO126 des différentes sous-populations de lymphocytes  $T\ CD4^+$  analysées.



**Fig. R 20. La production d'ERO dans les lymphocytes  $T\ CD4^+$  exposés au CFC, n'est pas modifiée par la présence d'inhibiteurs de MAPKK.**

Des lymphocytes  $T\ CD4^+$  ont préalablement été traités par du UO126 à la concentration finale de  $5\mu M$  pendant 30 min. L'oxydation de la sonde  $H_2DCF\text{-}DA$  a été ensuite mesurée par cytométrie en flux dans les lymphocytes  $T\ CD4^+$  conventionnels Th17 et « non-Th17 », et des Tregs, après 30 minutes d'exposition à 5 et 10% de CFC. La mesure de l'oxydation de la même

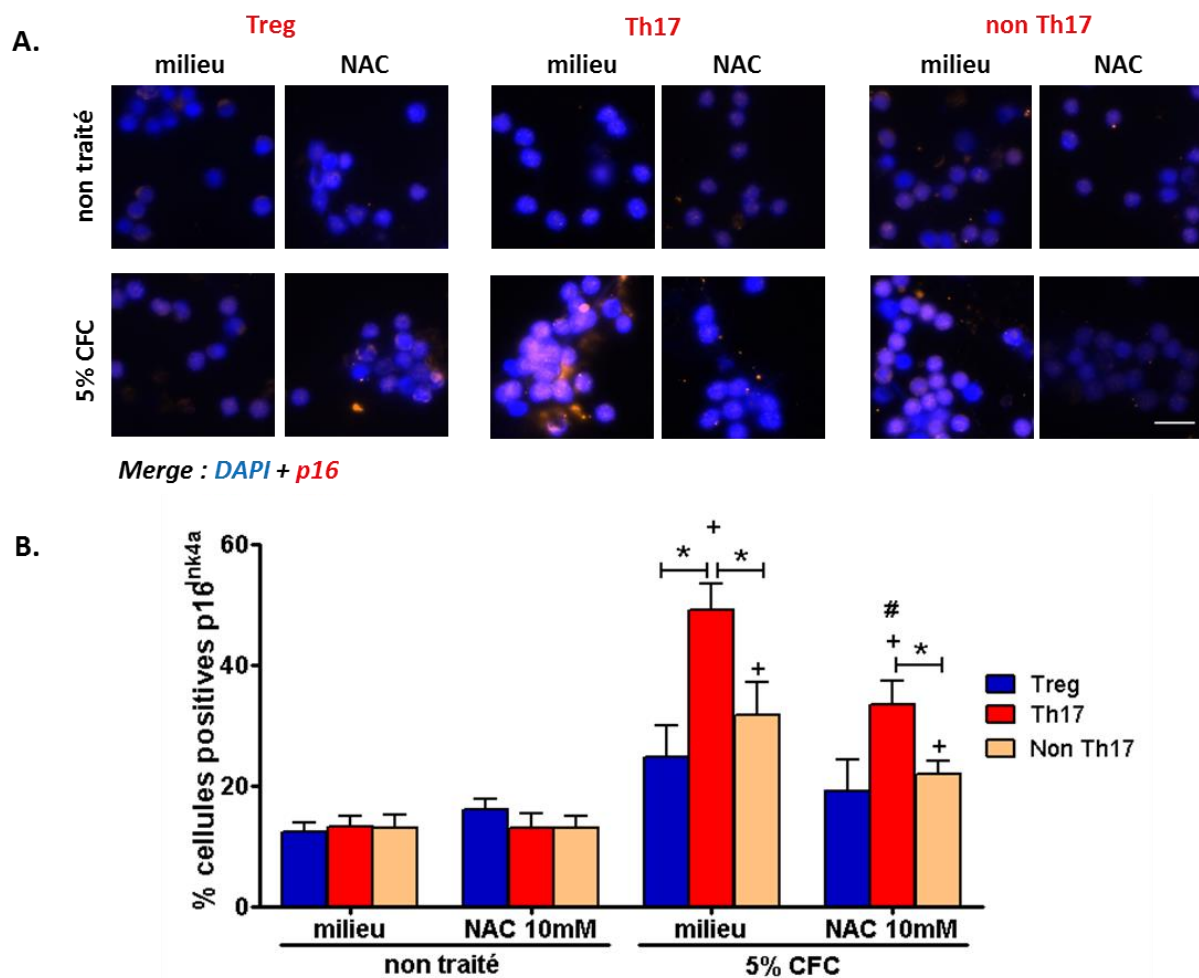
sonde en réponse après 30 minutes d'exposition au TBHP est utilisée comme contrôle positif de la production d'ERO. Les données présentées sont les moyennes  $\pm$  SEM MFI de la sonde H<sub>2</sub>DCF-DA dans les différentes sous-populations normalisées par rapport à la MFI de la sonde dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> totaux en absence de stimulation (N= 6 expériences).

\*  $p < 0,05$ , +  $p < 0,05$  par rapport à la condition non traitée, Mann-Whitney U.

## VI. La chaîne respiratoire mitochondriale est impliquée dans la sur-expression de p16<sup>INK4a</sup> induite dans les lymphocytes Th17 quiescents lors d'une exposition au CFC.

De même que nous avons montré que les ERO contenues dans le CFC ou produites en réponse à une exposition au CFC stimulent la phosphorylation de ERK1/2 et sa translocation nucléaire dans les Th17, nous avons ensuite analysé le rôle causal potentiel de ces ERO sur l'expression de p16<sup>INK4a</sup>.

Comme précédemment, nous avons pré-traité les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> par de la NAC à 10mM avant de les exposer au CFC pendant 24H. Les résultats présentés sur la Fig. R21 montrent que le prétraitement par la NAC prévient significativement l'augmentation de l'expression de p16<sup>INK4a</sup> dans les Th17 et les « non-Th17 » induite par l'exposition au CFC. Néanmoins, le prétraitement par la NAC ne permet pas de diminuer le niveau d'expression de p16<sup>INK4a</sup> dans les Th17 et « non Th17 » à un niveau comparable à celui de la condition basale. De plus, les différences observées dans le niveau d'expression de p16<sup>INK4a</sup> entre les Th17 et « non Th17 » après exposition au CFC sont conservées en cas de prétraitement par la NAC. En absence d'exposition au CFC, le prétraitement par la NAC ne modifie pas l'expression basale de p16<sup>INK4a</sup> dans les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>.

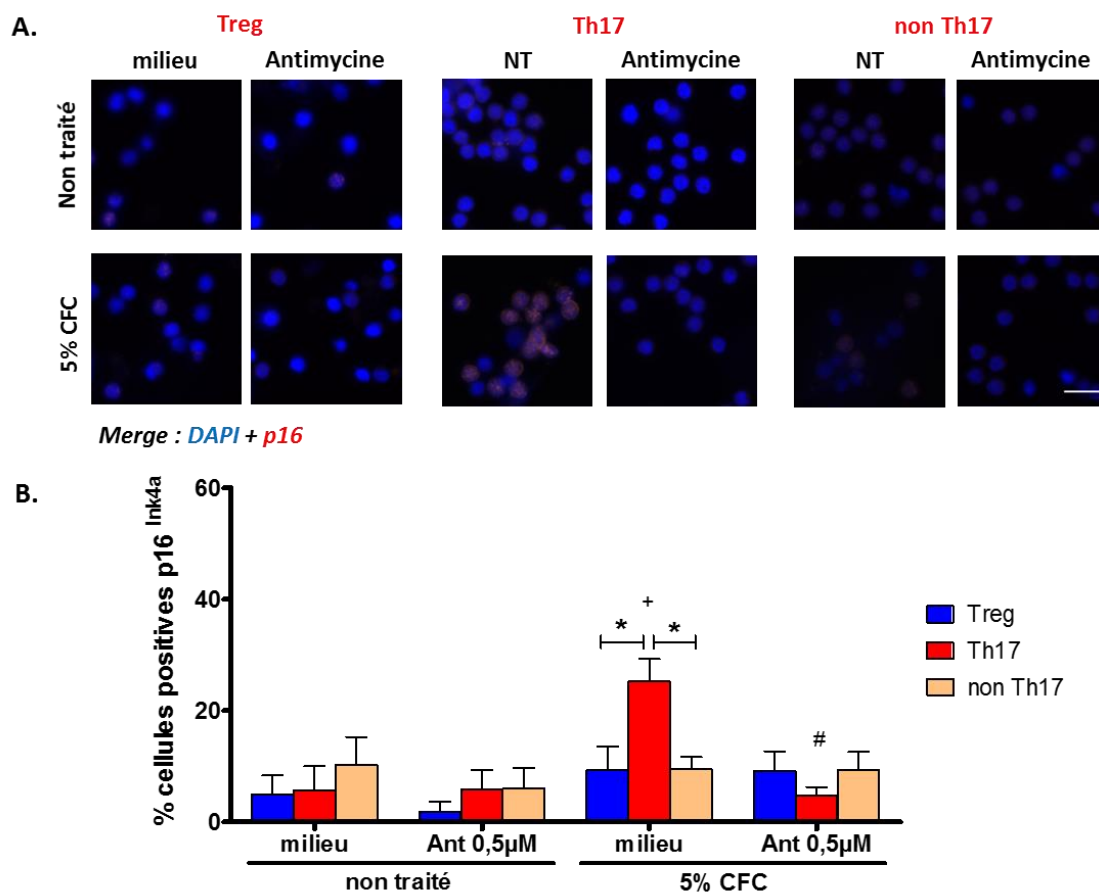


**Fig. R 21. L'expression de  $p16^{INK4a}$  induite dans les Th17 et les « non-Th17 » exposés au CFC est partiellement inhibée par la NAC.**

Des lymphocytes Tregs, et  $T CD4^+$  conventionnels Th17 et « non Th17 » isolés et préalablement traités par la NAC 10mM pendant 1h30, ont ensuite été exposés ou non au condensat de fumée de cigarette à 5% pendant 24H. L'expression de  $p16^{INK4a}$  est analysée en immunocytofluorescence, et la numération des cellules présentant un marquage positif pour  $p16^{INK4a}$  se présentant sous la forme d'un marquage nucléaire en pointillés de couleur rouge est réalisée. Les noyaux sont identifiés à l'aide d'un marquage par le DAPI de couleur bleue. Des images représentatives des 3 sous-populations de lymphocytes T en absence de traitement ou exposées à 5% de CFC sont montrées en A., la barre d'échelle correspond à  $20\mu m$ , les moyennes  $\pm$  SEM des numérations des cellules positives pour le marquage  $p16^{INK4a}$  sont présentées en B. N=6.

\*  $p < 0,05$ , +  $p < 0,05$  par rapport à la condition non traitée, #  $p < 0,05$  par rapport à la condition milieu correspondante. Mann-Whitney U.

L'effet limité de la NAC sur l'expression de p16<sup>INK4a</sup> dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Th17 et « non-Th17 » exposés au CFC, en dépit de son effet inhibiteur sur l'activation associée d'ERK1/2, nous a fait postuler que l'effet piègeur de la NAC sur les ERO présentes n'était pas suffisant pour inhiber l'effet de l'exposition au CFC. Nous avons précédemment mis en évidence la production de ERO par la mitochondrie en réponse à l'exposition au CFC. Pour analyser le rôle potentiel de la chaîne respiratoire mitochondriale dans l'induction de l'expression de p16<sup>INK4a</sup> dans les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> en réponse à l'exposition au CFC, nous avons donc testé l'effet des différents inhibiteurs de la chaîne respiratoire mitochondriale. Nous avons tout d'abord analysé l'effet de l'activité du complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale sur l'expression de p16<sup>INK4a</sup> en prétraitant par l'antimycine les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> quiescents exposés à 5 % de CFC, ou non, pendant 24H. Les résultats présentés sur la Fig R22 montrent que le prétraitement par l'antimycine prévient l'augmentation de l'expression de p16<sup>INK4a</sup> dans les Th17 exposés à 5% de CFC pendant 24H observée comme précédemment, cette expression étant plus importante dans les Th17 en comparaison des Tregs et des « non Th17 », le niveau d'expression de p16<sup>INK4a</sup> est alors identique dans les 3 sous-populations étudiées, et comparable au niveau d'expression de p16<sup>INK4a</sup> en absence d'exposition au CFC. Ces résultats montrent que l'activité du complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale contribue à la sur-expression de p16<sup>INK4a</sup> dans les lymphocytes Th17 exposés au CFC.



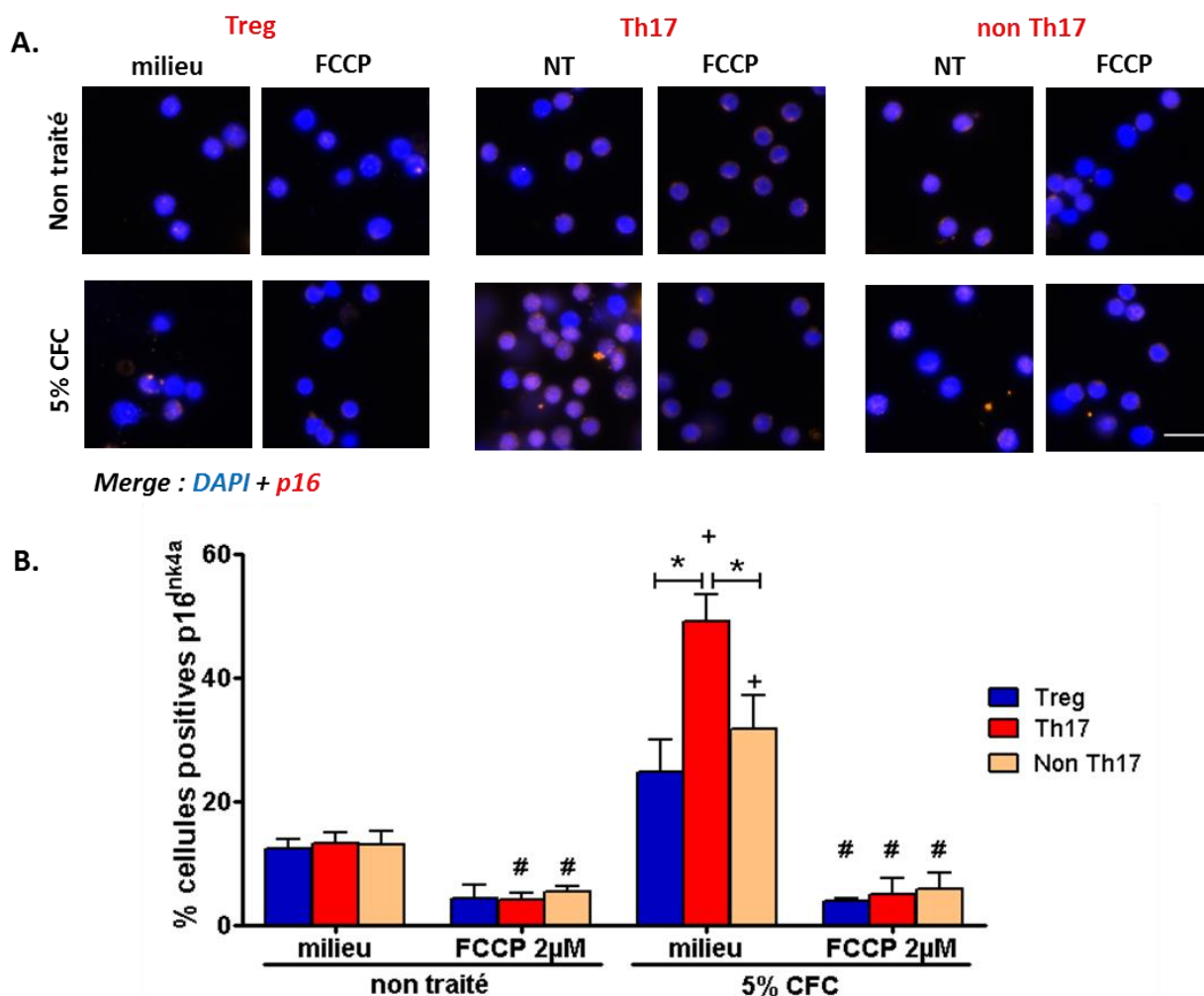
**Fig. R 22. L'inhibition du complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale prévient la sur-expression de  $p16^{INK4a}$  dans les lymphocytes Th17 exposés au CFC.**

Des lymphocytes Tregs, et  $T CD4^+$  conventionnels Th17 et « non Th17 » isolés, ont été pré-traités par de l'antimycine ( $0,5\mu M$ ) pendant 30 minutes avant d'être exposés ou non au condensat de fumée de cigarette à 5% pendant 24H. L'expression de  $p16^{INK4a}$  est analysée en immunocytofluorescence, et la numération des cellules présentant un marquage positif pour  $p16^{INK4a}$  se présentant sous la forme d'un marquage nucléaire en pointillés de couleur rouge est effectuée. Les noyaux sont identifiés à l'aide d'un marquage par le DAPI de couleur bleue. Des images représentatives des 3 sous-populations en absence de traitement ou exposées à 5% de CFC sont présentées en A., la barre d'échelle correspond à  $20\mu m$ , les moyennes  $\pm$  SEM des numérations des cellules positives pour le marquage  $p16^{INK4a}$  sont présentées en B.  $N=4$ , \*  $p<0,05$ , +  $p<0,05$  par rapport à la condition non traitée, #  $p<0,05$  par rapport à la condition milieu correspondante. Mann-Whitney U.

Nous avons ensuite analysé l'effet du prétraitement par le FCCP, un agent pharmacologique découpleur de la chaîne de transport électronique mitochondriale, sur l'expression de  $p16^{INK4a}$

dans les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> quiescents exposés, ou non, à 5% de CFC pendant 24H. Comme rapporté précédemment, les résultats présentés sur la Fig. R23 montrent que l'exposition au CFC induit une augmentation de l'expression de p16<sup>INK4a</sup> significative dans les Th17 et « non Th17 », l'expression de p16<sup>INK4a</sup> étant plus importante dans les Th17 comparativement aux autres sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Le prétraitement par le FCCP prévient totalement l'augmentation de l'expression de p16<sup>INK4a</sup> dans les trois sous-populations et cette expression est alors comparable à celle observée dans les cellules pré-traitées par le FCCP sans exposition au CFC. Dans les cultures contrôles faites en absence d'exposition au CFC, nous observons un niveau faible d'expression de p16<sup>INK4a</sup> (environ 15% de cellules présentant un marquage positif), identique dans les Tregs, Th17 et « non Th17 ». Le prétraitement par le FCCP diminue l'expression de p16<sup>INK4a</sup> dans les Th17 et les « non-Th17 » (environ 5% de cellules positives).

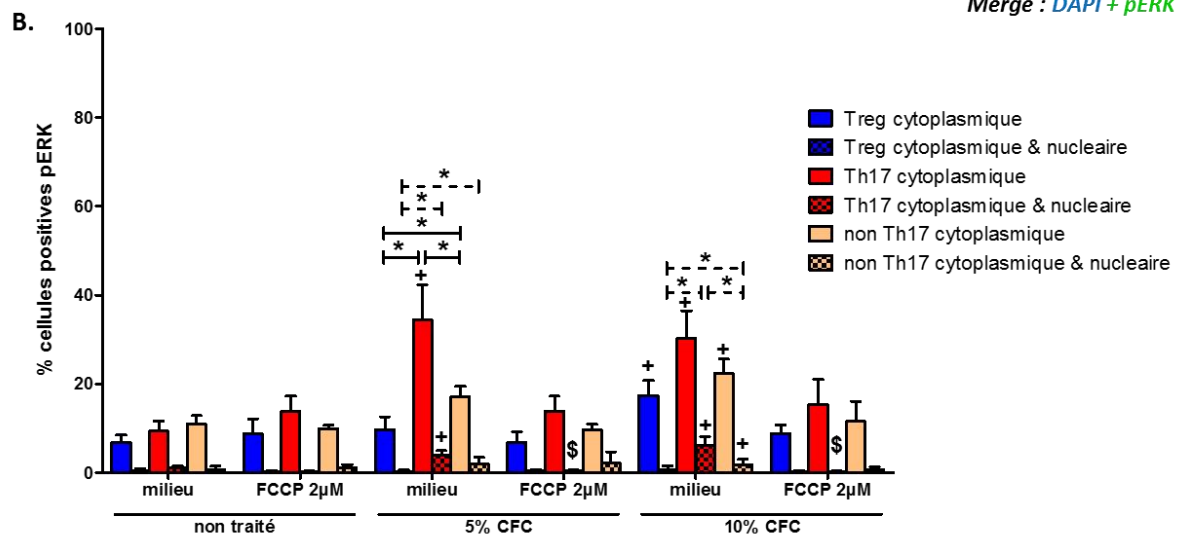
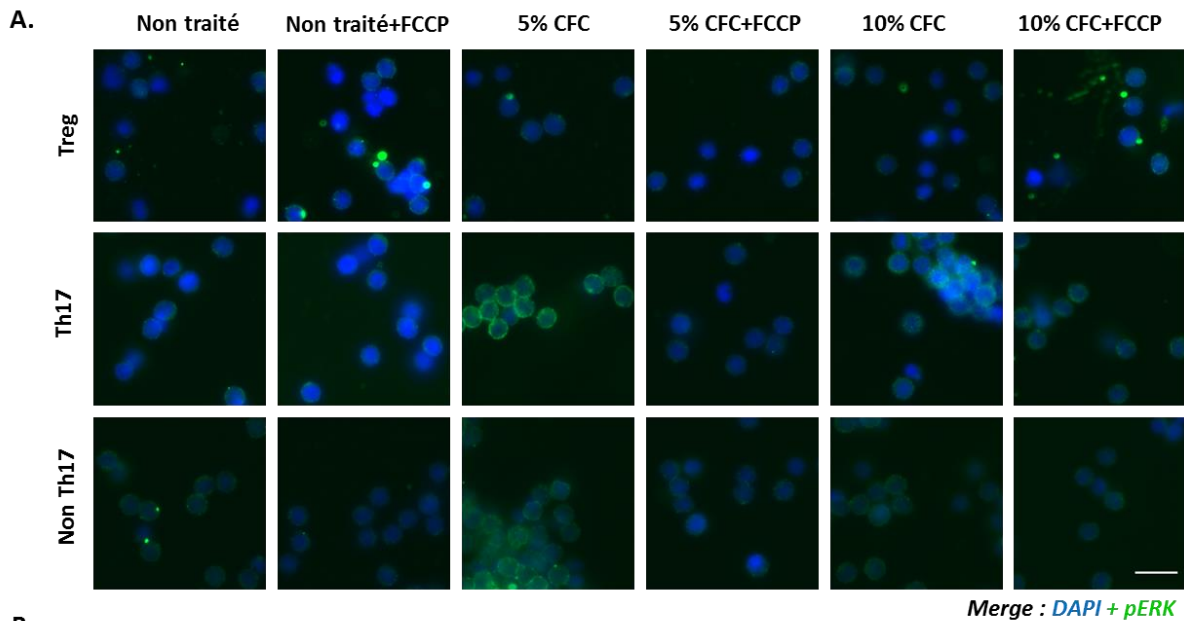
Au total, les résultats présentés ici montrent que l'activité mitochondriale contribue à la sur-expression de p16<sup>INK4a</sup> dans les lymphocytes Th17 exposés au CFC.



**Fig. R 23. Le découplage de la chaîne respiratoire mitochondriale prévient l'expression de  $p16^{INK4a}$  dans les lymphocytes T  $CD4^+$  exposés au CFC.**

Des lymphocytes Tregs, et T  $CD4^+$  conventionnels Th17 et « non Th17 » isolés, ont ensuite été pré-traités par du FCCP à  $2\mu M$  pendant 30 minutes avant d'être exposés ou non au condensat de fumée de cigarette à 5% pendant 24H. L'expression de  $p16^{INK4a}$  est analysée en immunocytofluorescence et la numération des cellules présentant un marquage positif pour  $p16^{INK4a}$  sous la forme d'un marquage nucléaire en pointillés de couleur rouge est effectuée. Les noyaux sont identifiés à l'aide d'un marquage par le DAPI de couleur bleue. Des images représentatives des 3 sous-populations en absence de traitement ou exposées à 5% de CFC sont présentées en A., la barre d'échelle correspond à  $20\mu m$ , les moyennes  $\pm$  SEM des numérations des cellules positives pour le marquage  $p16^{INK4a}$  sont présentées en B. N=6, \*  $p < 0,05$ , +  $p < 0,05$  par rapport à la condition non traitée, #  $p < 0,05$  par rapport à la condition milieu correspondante. Mann-Whitney U.

Compte-tenu de l'association démontrée dans nos résultats précédents entre la production d'ERO, l'activation de ERK1/2 et l'expression de p16<sup>INK4a</sup> induites de façon plus importante dans les Th17 par l'exposition au CFC, nous avons ensuite analysé l'effet d'un prétraitement par le FCCP sur la phosphorylation et la translocation des formes phosphorylées de ERK1/2 dans les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> exposés au CFC. Les résultats présentés sur la Fig R24 montrent que le prétraitement par le FCCP prévient la translocation nucléaire de phospho-ERK1/2 dans les Th17 et tend à prévenir la phosphorylation de ERK1/2 dans les 3 sous-populations étudiées de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> exposées à 10% de CFC. Lors d'une exposition à 5% de CFC, l'effet n'est observé que pour les Th17 puisqu'ils présentent seuls une translocation nucléaire de ERK1/2. En absence d'exposition au CFC, le prétraitement au FCCP ne modifie pas le niveau basal de phosphorylation de ERK1/2 dans les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, ni le taux des formes phosphorylées nucléaires de ERK1/2. Ce résultat montre donc que, en réponse à une exposition au CFC, la stimulation de la chaîne respiratoire mitochondriale est associée à la phosphorylation de ERK1/2 dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et de la translocation nucléaire de phospho-ERK1/2 dans les Th17, et que cet effet intervient pour des doses plus faibles de CFC dans les Th17.



**Fig. R 24. Le découplage de la chaîne respiratoire mitochondriale prévient l'activation de ERK1/2 et sa translocation nucléaire dans les lymphocytes Th17 exposés au CFC.**

Des lymphocytes Tregs, et T CD4<sup>+</sup> conventionnels Th17 et « non Th17 » isolés, ont été pré-traités par du FCCP (2µM) avant d'être exposés ou non au condensat de fumée de cigarette à 5% ou 10% pendant 15 min. L'expression de phospho-Erk1/2 est analysée par immunocytofluorescence, et la numération des cellules présentant un marquage cytoplasmique de couleur verte, ou un marquage nucléaire à l'aspect de pointillés verts est réalisée. Les noyaux sont marqués par le DAPI. Des images représentatives des 3 sous-populations en absence de traitement, exposées à 5% et 10% de CFC, ou stimulées par du PMA 200nM, sont montrées en A., la barre d'échelle correspond à 20µm, les moyennes +/- SEM des numérations des cellules présentant un marquage phospho-ERK1/2 cytoplasmique, ou un marquage phospho-ERK1/2 cytoplasmique et nucléaire sont présentées en B. N=3.

*\*  $p < 0,05$ , +  $p < 0,05$  par rapport à la condition non traitée, \$  $p < 0,05$  par rapport à la condition milieu correspondante. Mann-Whitney U.*

## **Chapitre 5 : Discussion, conclusion, perspectives**

## I. Rappel de la problématique et des principaux résultats.

Le tabagisme majore la gravité de nombreuses maladies inflammatoires chroniques associées à la sous-population des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> de type Th17, telles que la BPCO dont c'est le principal facteur étiologique, la maladie de Crohn, l'arthrite rhumatoïde, le psoriasis. La majorité des données concernant les fumeurs sains et pathologiques proviennent des études sur la BPCO parmi lesquelles certaines ont montré que la sénescence des cellules pulmonaires participe à la genèse et au développement de cette pathologie. Par ailleurs, il a été montré que l'induction de la sénescence des lymphocytes T est associée à la modulation de la voie de signalisation des MAPKs et plus particulièrement de ERK1/2 et de p38 (Ye J, 2012).

De nombreuses études rapportent une augmentation du nombre et du pourcentage de lymphocytes Th17 chez les fumeurs, au niveau pulmonaire et au niveau systémique, et cette augmentation est encore plus importante chez les patients atteints de BPCO. Les modèles murins précliniques de BPCO ont établi le rôle délétère des Th17 dans cette maladie. Les mécanismes permettant d'expliquer cette augmentation sont encore inconnus, et le rôle potentiel de la sénescence dans cette augmentation et dans la modification des fonctions des Th17 chez les fumeurs n'a jamais été exploré.

Dans cette étude, nous avons donc fait l'hypothèse que les lymphocytes Th17 présentent une susceptibilité particulière à la sénescence en comparaison des autres lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, qui serait responsable de l'augmentation en nombre et en proportion des Th17 chez les fumeurs, et de leur potentiel pro-inflammatoire, ce qui contribuerait à aggraver les maladies inflammatoires chroniques impliquant les Th17 chez les fumeurs. Nous avons donc analysé la susceptibilité des Th17 à la sénescence induite par l'exposition à la fumée de cigarette, et le rôle de l'activation de la voie de signalisation ERK1/2 dans ce phénomène. Nous avons également analysé le rôle des ERO qui sont dans la régulation de l'activation de ERK1/2 (Finkel T, 1998, Griffith CE, 1998, Lee K, 2002, Devadas S, 2002, Kwon J, 2003), et des médiateurs importants de la sénescence cellulaire (Michiels C, 1990, Wang Y, 2004, Duan J, 2005, Nyunoya T, 2006). Dans la première partie de ce travail, nos résultats montrent que, en réponse à une exposition au CFC *in vitro*, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Th17 quiescents présentent une augmentation de différents marqueurs de sénescence : activité  $\beta$ -galactosidase et expression des inhibiteurs du cycle cellulaire p16<sup>INK4a</sup> et ATF3. De plus, l'exposition au CFC modifie le profil sécrétoire des Th17 et induit la sécrétion de l'IL-8 par les lymphocytes Th17 quiescents, tout en inhibant la sécrétion des cytokines caractéristiques des Th17 activés *via* le TCR.

Dans la deuxième partie de ce travail, nos résultats montrent que la voie des MAPKs ERK1/2 est impliquée dans l'induction du phénotype sénescence des lymphocytes Th17 en réponse à une exposition au CFC : une sur-expression de p16<sup>INK4a</sup> est associée à une activation et une translocation nucléaire de ERK1/2 plus importante dans les Th17. Enfin, les résultats présentés ici suggèrent que l'activité mitochondriale plus élevée dans les Th17 à l'état basal, et stimulée par l'exposition au CFC, est responsable de la susceptibilité plus importante des Th17 à la sénescence.

## **II. L'exposition au condensat de fumée de cigarette induit une augmentation de l'activité $\beta$ -galactosidase et de l'expression des inhibiteurs du cycle cellulaire p16<sup>INK4a</sup> et ATF3 dans les lymphocytes Th17 quiescents.**

Dans la première partie de ce travail nous avons analysé plusieurs paramètres visant à évaluer un effet potentiel de l'exposition au CFC sur la prolifération ou l'apoptose des différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> après un tri cellulaire séparant les Th17 CD4<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> CCR6<sup>+</sup>, les autres lymphocytes T CD4<sup>+</sup> auxiliaires/conventionnels CCR6<sup>-</sup> (« non-Th17 ») et les Tregs CD4<sup>+</sup>, qui permettraient d'expliquer l'augmentation du nombre et du pourcentage de lymphocytes Th17 chez les fumeurs asymptomatiques, voire chez les patients BPCO.

Le choix d'étudier les Th17 identifiés par un marquage membranaire CCR6 est justifié par la protection des modèles murins déficient pour CCR6 contre l'emphysème et l'inflammation associée (Bracke KR, 2006, Harrison OJ, 2008). De plus dans un modèle animal d'arthrite rhumatoïde, ce sont principalement les Th17 exprimant CCR6 qui sont recrutés sur les sites inflammatoires (Hirota K, 2007). Plus récemment, des analyses de RNA seq sur cellules Th17 uniques ont confirmé l'expression de CCR6 dans les Th17 inflammatoires (Gaublomme JT, 2015).

Lorsque les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sont exposées au CFC pendant 48H, les Th17 ne prolifèrent pas mais présentent une meilleure viabilité en comparaison des Tregs et des « non Th17 », ce qui suggère qu'au sein des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, les lymphocytes Th17 sont résistants à la mort cellulaire induite par le CFC dans les autres sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Le travail de l'équipe de Rodriguez PC (Hernandez CP, 2013) a montré que des lymphocytes T humains totaux exposés à des doses similaires de CFC (5%) présentent un défaut de prolifération et une augmentation de leur taux d'apoptose à 72H en réponse à une activation par des anticorps anti-CD3 et CD28. Ces différences avec nos résultats peuvent s'expliquer par le fait que notre étude porte sur l'effet du CFC sur des

lymphocytes quiescents au sein desquels l'équilibre des signaux de survie est indépendant de l'activation *via* le TCR/CD3 (Roose JP, 2003). De plus, l'absence de séparation des différentes sous-populations de lymphocytes utilisées dans le travail de Hernandez et coll, et la faible représentation des lymphocytes Th17 au sein des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (3 à 6% dans le sang périphérique des donneurs sains) combinée à leur faible capacité de prolifération, pourraient masquer le comportement spécifique des Th17 dans l'étude d'Hernandez et coll.

La résistance à l'apoptose est une caractéristique intrinsèque des Th17 (McKinstry KK, 2010). Nos résultats ne mettent pas en évidence dans les Th17 un renforcement d'une réponse anti-apoptotique lors de l'exposition au CFC. La sénescence cellulaire est une autre forme de résistance à la mort cellulaire des cellules exposées à des stress qui menaceraient leur survie. Nos résultats montrent pour la première fois qu'au sein des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> du sang périphérique de donneurs sains, les lymphocytes Th17 quiescents présentent une susceptibilité plus importante à la sénescence induite par l'exposition au CFC comparativement aux autres sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. En effet, nos résultats montrent que les lymphocytes Th17 exposés à la fumée de cigarette présentent une augmentation de l'activité  $\beta$ -galactosidase, un marqueur classique de la sénescence, et une augmentation significative de l'expression protéique de p16<sup>INK4a</sup>, un régulateur négatif du cycle cellulaire également associé au phénotype sénéscent (Alcorta DA, 1996, Brookes S, 2004), plus importantes dans les Th17 comparativement aux Tregs et « non Th17 ». De plus, en réponse à une exposition au CFC, nous avons observé une augmentation de l'expression de ATF3 qui pourrait contribuer à l'induction de la sénescence des Th17 ; en effet, une augmentation de l'expression de ATF3 a été associée à un arrêt de la croissance cellulaire dans des cellules myéloïdes humaines et des cellules A549 (Fan F, 2002, Lu D, 2006), et participe également à la régulation de l'expression de p16<sup>INK4a</sup> (Hamdi F, 2007, Li J, 2011). Bien qu'aucune donnée n'existe sur la susceptibilité à la sénescence des différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> exposés à la fumée de cigarette, nos résultats sont cohérents avec des données existantes concernant des caractères compatibles avec la sénescence dans les lymphocytes du sang périphérique de fumeurs asymptomatiques ou atteints de BPCO. Un raccourcissement des télomères a été observé dans les PBMCs de patients atteints de BPCO (Savale L, 2009, Houben JM, 2009) et dans les lymphocytes circulants de fumeurs asymptomatiques ou atteints de BPCO (Morlà M, 2006, Song Z, 2010). Une perte d'expression de la molécule CD28 à la surface des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> dans le LBA (Barcelo B, 2008) et dans le sang périphérique, plus importante chez les fumeurs avec BPCO que chez les fumeurs asymptomatiques et les non-fumeurs a été montrée. Enfin, chez l'homme, l'expression de p16<sup>INK4a</sup> dans les lymphocytes T du sang

périphérique est augmentée avec l'âge des individus (Liu Y, 2011, Nelson JA, 2012) et l'augmentation de ce marqueur est significativement associée à la consommation de tabac (Liu Y, 2009).

Nous avons également analysé la voie d'induction de la sénescence en réponse à des dommages à l'ADN, dépendant de la voie p53/ p21<sup>CDKN1a</sup>. Les résultats obtenus ne montrent pas de modulation de l'expression d'ARN de p53 et de p21<sup>CDKN1a</sup> dans les Th17 exposés à la fumée de cigarette. Néanmoins, nous ne pouvons pas exclure un rôle éventuel de la voie p53 dans l'induction de la sénescence des lymphocytes Th17 exposés au CFC. En effet, la régulation de la voie p53 intervient essentiellement au niveau post-traductionnel. Nos résultats complémentaires montrent une augmentation significative de l'expression de l'enzyme NQO1 dans les Th17 (annexe Fig A.3). La transcription du gène de NQO1 est sous le contrôle de Nrf2 et AhR dont les ligands entrent dans la composition du CFC. Outre sa fonction antioxydante, NQO1 est impliquée dans la stabilisation de p53 en le protégeant contre la dégradation indépendante de l'ubiquitination (Ross D, 2004) et pourrait contribuer, par son action sur l'expression protéique de p53, à l'arrêt du cycle cellulaire des cellules Th17 exposées à la fumée de cigarette. De plus, l'action combinée de p53 et ATF3 inhibe la transcription de la phosphatase Cdc25A nécessaire au maintien du blocage du cycle cellulaire (Demidova AR, 2009). Enfin, ATF3 lui-même peut contribuer à la stabilité de l'expression protéique de p53 (Yan C, 2005, Wang H, 2010).

L'analyse du sécrétome des différentes sous-populations de lymphocytes Tregs, Th17 et « non Th17 » exposés au CFC montre qu'en réponse à l'exposition au CFC les lymphocytes Th17 produisent plus d'IL-8 que les « non Th17 ». Ce résultat montre qu'en absence de stimulation du TCR, l'exposition au CFC permet d'induire dans les Th17 un sécrétome de type pro-inflammatoire compatible avec l'induction d'un phénotype sénescence des Th17. Ce résultat est en accord avec les résultats obtenus par Ye J et coll. (Ye J, 2012) qui montrent que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> effecteurs dont la sénescence a été induite par les Tregs, sécrètent des quantités importantes d'IL-8. Nos résultats suggèrent qu'au sein des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, les lymphocytes Th17 pourraient être les principaux responsables de cette production d'IL-8. Le gène de l'IL-8 a été cloné à partir de lymphocytes T (Schröder JM, 1988). Cependant, il y a peu d'articles rapportant la sécrétion d'IL-8 par des lymphocytes T, qui n'a été décrite que dans des lignées clonales de Th17 (Pelletier M, 2010; Santarlasci V, 2012), dans des Tregs (Himmel ME, 2011), dans des cellules tumorales de leucémies T aiguës (Chiaretti S, 2004) et de lymphomes T cutanés (Hansen ER., 1991), et dans certains lymphocytes T de nouveaux-nés (Gibbons D, 2014). Dans les peaux lésées, il a été montré que des lymphocytes T CCR6<sup>+</sup> étaient responsables

de la production d'IL-8 contribuant ainsi au recrutement et à la survie des polynucléaires neutrophiles (Schaerli P, 2004). Enfin, de façon intéressante, il a été montré que des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs stimulés *in vitro* dans des conditions polarisantes pro-Th17 produisent de l'IL-8, et que l'activation de AhR par ses ligands stimule la production d'IL-8 par ces cellules (Gasch M, 2014). Or, l'un des ligands de AhR, le benzo[a]pyrene (B[a]P) est un composant du CFC (Hecht SS, 2003). Nos résultats sont donc cohérents avec ces données. Chez l'homme, une production d'IL-8 par les cellules épithéliales alvéolaires de type II plus importante chez les fumeurs par rapport aux non-fumeurs a déjà été montrée (Mio T, 1997, Kode A, 2006). Nos résultats suggèrent que les lymphocytes Th17 participent à la production d'IL-8 en réponse à une exposition à la fumée de cigarette. Enfin, dans les fibroblastes humains, l'IL-8 contribue au renforcement de l'arrêt de la croissance cellulaire et de la sénescence *via* son récepteur CXCR2 et les voies de signalisation NF-κB et p53 (Acosta JC, 2008). Il n'existe pas de données sur un tel mécanisme autocrine dans les lymphocytes T, mais cette augmentation de l'expression de l'IL-8 par les Th17 exposés au CFC pourrait participer au maintien de la sénescence dans les lymphocytes Th17 par un mécanisme autocrine, en plus d'un effet paracrine potentiel sur les fibroblastes, à l'instar du mécanisme d'action de la PGE2 sur l'amplification et le maintien de la sénescence des fibroblastes de patients BPCO démontré dans une autre étude menée dans notre laboratoire (Dagouassat M, 2013).

Conformément aux données de la littérature, nos résultats montrent que la stimulation par les anticorps anti-CD3 et CD28 permet d'induire dans les Th17 l'expression de cytokines et chimiokines produites spécifiquement par les Th17 (IL-17A, IL-21, IL-22, GM-CSF et CCL20) et de l'IL-10, et dans les « non Th17 » l'expression de l'IL-4 et l'IL-13. L'exposition au CFC seul n'a pas d'effet sur le profil de sécrétion des cytokines et chimiokines testées, mais, en revanche, confirmant les données de la littérature similaires sur les Th1 (Cozen W, 2004), cette exposition inhibe l'effet de la stimulation par les anticorps anti-CD3 et CD28 sur l'expression des cytokines spécifiques des Th17 et sur l'IL-10. En revanche, nos résultats ne vont pas dans le sens d'une plus forte production de cytokines Th2 en réponse à une stimulation par les anticorps anti-CD3 et CD28 lors d'une exposition au CFC, mais plutôt dans le sens d'un effet inhibiteur sur l'activation des différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Dans la littérature scientifique, les études sont contradictoires sur ce point et montrent un effet pro- (Nakamura Y, 2008, De Heens G, 2009) ou anti-Th2 (Kalra R, 2004, Tilp C, 2016) de la fumée de cigarette sur la réponse immune adaptative Th2.

Au total, la première partie de notre travail montre donc qu'en réponse à une exposition au CFC, en absence de stimulation antigénique, les lymphocytes Th17 quiescents présentent une

susceptibilité à la sénescence plus importante que les autres sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. La sénescence des Th17 pourrait permettre d'expliquer l'accumulation de ces cellules chez les fumeurs, et contribuer au caractère pro-inflammatoire de ces cellules *via* l'augmentation de leur sécrétion d'IL-8. L'induction de la sénescence des Th17 en réponse à l'exposition et la modification de leur secrétome au profit d'une augmentation de la production d'IL-8 pourrait contribuer au rôle pathogène de ces cellules dans les maladies inflammatoires chroniques et certains cancers. Une production excessive d'IL-8 par les Th17 sénescents s'accumulant dans les tissus pourrait également contribuer à la fibrose pulmonaire (Feugate JE, 2002, revue dans Qazi BS, 2011 & Russo RC, 2014, Palena C, 2012). L'association d'une production plus importante d'IL-8 avec la sur-expression de p16<sup>INK4a</sup>, sera évaluée par l'analyse de l'effet sur la production d'IL-8 induite par l'exposition au CFC, des différents traitements testés sur l'expression de p16<sup>INK4a</sup>. L'identification des mécanismes de production d'IL-8 par les Th17 permettrait d'identifier des cibles moléculaires pour la prévention de sa sécrétion.

### **III. La mitochondrie et la voie de signalisation ERK1/2 sont impliquées dans l'induction de la sénescence des Th17 exposés au CFC.**

Dans la deuxième partie de ce travail, nous nous sommes intéressés aux mécanismes potentiellement responsables de l'induction de la sénescence des lymphocytes Th17, préalablement établie sur la base de 3 critères : l'augmentation de l'activité de la  $\beta$ -galactosidase et de l'expression de p16<sup>INK4a</sup>, et la sécrétion d'IL-8. Dans la suite de notre travail, nous avons restreint notre évaluation de la sénescence à l'analyse de l'expression de p16<sup>INK4a</sup>, compte-tenu de la caractérisation générale de son expression dans de nombreux modèles cellulaires de sénescence (Alcorta DA, 1996, Brookes S, 2004).

#### **A. Rôle de la voie de signalisation ERK1/2 dans l'induction de la sénescence des lymphocytes Th17 exposés au CFC.**

##### **1. Rôle de ERK1/2 dans l'expression de p16<sup>INK4a</sup> dans les cellules T CD4<sup>+</sup> exposées au CFC.**

Nous avons analysé l'implication de la voie de signalisation ERK1/2 dans l'expression de p16<sup>INK4a</sup> induite par l'exposition au CFC. Nos résultats montrent que le prétraitement par les

inhibiteurs de MEK1/2, le UO126 et, dans une moindre mesure, le PD98059, permet d'inhiber l'expression de p16<sup>INK4a</sup> induite par l'exposition au CFC dans les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et plus particulièrement dans les Th17. Ces résultats confirment l'implication de la voie ERK1/2 dans l'expression de p16<sup>INK4a</sup> dans les lymphocytes Th17. Nos résultats sont en accord avec les données de la littérature qui suggèrent que dans les lymphocytes et dans d'autres types cellulaires, l'activation séquentielle des voies ERK1/2 et p38<sup>MAPK</sup> est impliquée dans l'expression de p16<sup>INK4a</sup> (revue dans Muller M, 2009, Ye J, 2012, Shin J, 2013, Wu PK, 2015). UO126 et PD98059 ne modifient pas l'activité des MEK3/6 qui régulent l'activation de p38<sup>MAPK</sup> (Roux PP, 2004), cependant, nous ne pouvons pas exclure un rôle de p38<sup>MAPK</sup> en aval de l'activation d'ERK1/2. Ces données sont en accord avec les résultats obtenus dans des fibroblastes embryonnaires murins qui montrent qu'une activité élevée de ERK1/2 a pour effet d'induire l'expression de p16<sup>INK4a</sup> et contribue ainsi à l'arrêt du cycle cellulaire (Malumbres M, 2000, Han J, 2005). D'autres études montrent que l'activation séquentielle des voies sensibles aux ERO, ERK1/2 et p38<sup>MAPK</sup>, est impliquée dans l'induction de la sénescence dans les fibroblastes pulmonaires (revue dans Muller M, 2009). Il a été montré dans des fibroblastes humains que le promoteur INK4a contient des sites de fixation des facteurs de transcription directement phosphorylés par ERK1/2, Ets1/2 (revue dans Chien WW, 2006). Ce promoteur contient également des sites de fixation pour AP-1, régulée par ERK1/2 (Gil J, 2006). ATF3, qui entre également dans la composition d'hétérodimères AP-1, peut aussi participer à la régulation de l'expression de p16<sup>INK4a</sup> (Hamdi F, 2007, Li J, 2011). L'expression plus importante de ATF3 dans les Th17 exposés au CFC est cohérente avec une régulation de l'expression de p16<sup>INK4a</sup> par AP-1, et pourrait expliquer sa plus importante expression dans les Th17 exposés au CFC. Par ailleurs, les MAPKs ERK1/2 et JNK ont été impliquées dans la réponse cellulaire à l'exposition au CFC dans d'autres cellules (Nguyen T, 2004, Umemura K, 2008, Goven D, 2008). Nos résultats indiquent néanmoins une contribution majeure de la voie ERK1/2 dans la régulation de l'expression de p16<sup>INK4a</sup> dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> exposés au CFC.

Le UO126 et le PD98059 sont tous deux des inhibiteurs de MEK1. Le UO126 est également un inhibiteur de MEK2. Ces deux inhibiteurs diffèrent dans leur mode d'action sur MEK1/2. Le UO126 est capable d'inhiber l'activité catalytique de MEK1/2 et donc d'inhiber des formes déjà activées par phosphorylation. Le PD98059 se lie aux formes inactives et prévient la phosphorylation/activation de MEK1. La moindre efficacité du prétraitement par le PD98059 à prévenir l'augmentation de l'expression de p16<sup>INK4a</sup> dans les Th17 et « non Th17 », en comparaison du prétraitement par le UO126, suggère que dans ces deux sous-populations

MEK1 est déjà partiellement activée. Cet état préactivé pourrait conférer à ces cellules une sensibilité plus importante de ERK1/2 et un seuil d'activation de l'expression de p16<sup>INK4a</sup> plus bas en réponse à une exposition au CFC. Le rôle de la voie ERK1/2 dans l'augmentation de l'expression de p16<sup>INK4a</sup> plus importante dans les lymphocytes Th17 comparés aux autres lymphocytes T CD4<sup>+</sup> exposés au CFC est confirmé par nos résultats montrant que l'exposition à une dose de 5% de CFC n'induit une augmentation du pourcentage de cellules présentant un marquage positif pour phospho-ERK1/2 cytoplasmique que dans les Th17, alors que l'exposition à une dose de 10% de CFC induit une augmentation du nombre de cellules présentant un marquage phospho-ERK1/2 cytoplasmique dans les trois sous-populations étudiées. De plus, la translocation nucléaire des formes phosphorylées de ERK1/2 est obtenue par l'exposition au CFC, quel que soit la dose, dans les lymphocytes Th17, et dans les « non Th17 » exposés à 10% de CFC. Ce résultat indique que l'exposition au CFC induit une activation de la voie ERK1/2 et que celle-ci est plus sensible et présente un seuil d'activation plus bas dans les Th17. De plus, cette localisation particulière des formes phosphorylées de ERK1/2 dans les Th17 pourrait avoir un effet sur l'amplitude et/ou la durée du signal, et contribuer à un programme transcriptionnel particulier de ces cellules en réponse à une exposition au CFC. Cette susceptibilité particulière de la voie ERK1/2 a déjà été rapportée par d'autres études dont la nôtre (Kerbrat S, 2015), et dans l'arthrite rhumatoïde où elle était associée à des anomalies de la signalisation en amont de ERK1/2 (Singh K, 2009, 2012), et dans la différenciation des Th17 (Lu L, 2010, Tan AH, 2010, Chang CF, 2012, Goplen, N, 2012, Liu H, 2013).

## 2. Rôle des ERO et place dans la cascade d'activation de ERK1/2.

Dans ce travail, différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> provenant de PBMCs de donneurs sains ont été exposées au CFC, c'est-à-dire un milieu de culture contenant des oxydants stables et des particules solubles de la fumée de cigarette. Nos résultats montrent qu'en absence de stimulation du TCR, l'activation de la voie ERK1/2 lors de l'exposition au CFC dans des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> quiescents de sujets sains, est partiellement dépendante de la présence d'ERO ; en effet, le prétraitement par la NAC, utilisée ici comme un piègeur des ERO contenues dans le CFC ou produites en réponse à l'exposition au CFC, permet d'inhiber partiellement la phosphorylation et la translocation de ERK1/2 induites par l'exposition au CFC. En revanche, le prétraitement des cellules T CD4<sup>+</sup> par l'inhibiteur des MAPKK, le UO126

n'a pas d'effet sur la production basale d'ERO mesurée à l'aide de la sonde DCFDA, ni sur l'augmentation des taux intracellulaires d'ERO induite par l'exposition au CFC des différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Ces résultats montrent que la phosphorylation de ERK1/2 en réponse à une exposition au CFC est dépendante de la présence d'ERO ; étant donné que l'inhibition de la voie ERK1/2 n'a pas d'effet sur l'augmentation des niveaux d'ERO, l'activation de la voie ERK1/2 se situe donc « en aval » de la production d'ERO.

De nombreuses études ont montré que les ERO peuvent induire ou réguler l'activation des voies de signalisation des MAPKs y compris dans les lymphocytes T (revue dans McCubrey JA, 2006). De plus l'exposition directe des cellules à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> conduit à l'activation des MAPKs (cellules acinaires pancréatiques : Dabrowski A, 2000, neuroblastes : Ruffels J, 2004). Dans les lymphocytes T tumoraux de la lignée Jurkat, il a été montré que les ERO induisent une activation de ERK1/2 comparable à celle initiée par une stimulation antigénique du TCR (Griffith CE, 1998). De fait, il a été montré que lors d'une stimulation du TCR, la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est nécessaire pour activer ERK1/2 (Devadas S, 2002).

Un mécanisme potentiel d'activation des MAPKs par les ERO, est l'inactivation et la dégradation des phosphatases des MAPKs (MKPs) qui régulent l'activation des MAPKs et maintiennent ces voies de signalisation dans un état inactif ou participent au rétrocontrôle négatif en réponse à un stimulus (Kwon J, 2003, revue dans Yong Son, 2010). Notre analyse de l'expression de la phosphorylation de ERK1/2 dans les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> dans lesquelles le pré-traitement par la NAC serait susceptible d'inhiber les MKPs, en absence d'exposition au CFC, montre une tendance à l'augmentation de la phosphorylation de ERK1/2 ; cette augmentation est comparable dans les trois sous-populations analysées suggérant que la phosphorylation de ERK1/2 est régulée par les MKPs de la même manière dans les différentes sous-populations, ce qui ne permet pas d'expliquer la phosphorylation et la translocation de ERK1/2 plus importantes dans les Th17 par une plus grande inhibition des MKPs dans ces cellules.

La phosphorylation de ERK1/2 en réponse à l'exposition des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> au CFC pourrait enfin être contrôlée par sa localisation subcellulaire, modifiant ainsi sa régulation par les kinases ou les MKPs. Dans un travail précédent sur l'activation de ERK1/2 dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> murins, nous avons analysé le rôle de PEA-15, une protéine adaptatrice comportant une séquence d'export nucléaire (NES) et capable de se lier à ERK1/2, favorisant ainsi l'export nucléaire de ERK1/2 dans le cytosol (Formstecher, E, 2001). Dans un modèle murin déficient pour PEA-15, nous avons montré que l'absence de PEA-15 favorisait la localisation nucléaire de ERK1/2 dans les lymphocytes T, et leur différenciation vers un

phénotype Th17 (Kerbrat S, 2015). Dans le présent travail, nous avons analysé l'expression de PEA-15 dans les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> exposés ou non au CFC. Les résultats obtenus ne montrent pas de défaut de l'expression de PEA-15 dans les Th17 permettant d'expliquer les différences d'activation ou de localisation de ERK1/2 observées dans ces cellules en réponse à l'exposition au CFC. Néanmoins, les fonctions de la protéine PEA-15 sont régulées par sa phosphorylation par la Protéine kinase C (PKC, Ser<sup>104</sup>) et par la CamKII ou la kinase Akt (Ser<sup>116</sup>) (Araujo H, 1993). PEA-15 pourrait donc subir des modifications post-traductionnelles lors de l'exposition au CFC qui inhiberaient sa faculté à réguler la localisation d'ERK1/2 et nous n'avons pas analysé ce paramètre. Enfin d'autres molécules pourraient moduler la localisation de ERK1/2. En effet, en conditions normales, l'export nucléaire de ERK1/2 est inhibé par MEK (Fukuda M, 1997), par son association au réseau de microtubules (Reszka AA, 1995) ou par les phosphatases qui régulent sa déphosphorylation comme MKP3 (Karlsson M, 2004).

A ce stade, nos résultats ne permettent pas d'expliquer pourquoi l'activation de ERK1/2 est plus importante dans les Th17 en réponse à une exposition au CFC, et inductrice d'un phénotype sénescence dans ces cellules.

## **B. Origine des ERO dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> exposés au CFC.**

Les résultats obtenus jusqu'ici montrent clairement une participation des ERO dans l'induction de la phosphorylation de ERK1/2 et sa translocation nucléaire dans les Th17, et dans l'expression de p16<sup>INK4a</sup> en réponse à une exposition au CFC. Des niveaux d'ERO plus importants dans les Th17 pourraient expliquer la plus grande susceptibilité de ces lymphocytes à la sénescence induite par l'exposition à la fumée de cigarette. Cependant, l'inhibition de l'activation de ERK1/2 et de l'expression de p16<sup>INK4a</sup> par un prétraitement par la NAC n'est que partielle ce qui suggère que les ERO présents dans la cellule lors de l'exposition au CFC, ne sont pas seuls responsables de ces 2 phénomènes. Nous avons donc analysé les niveaux d'ERO des différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> avant et après exposition au CFC, et testé l'effet de différents inhibiteurs pharmacologiques de la production d'ERO sur leurs taux.

Cette analyse a été réalisée sur une fraction enrichie en lymphocytes T CD4<sup>+</sup> totaux obtenus par une procédure de tri immunomagnétique. Nous avons fait ce choix méthodologique car il a été montré que les cellules d'origine myéloïde, issues de PBMC totaux, produisent des quantités

d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nettement supérieures à celles produites par les populations lymphocytaires (Thoren FB, 2007). L'analyse des taux d'ERO faite sur des PBMC totaux se rapprocherait plus des conditions physiologiques, mais il serait alors impossible de déduire l'effet direct de la fumée de cigarette sur les sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. En effet, le CFC peut agir directement sur la production d'ERO, de cytokines et de chimiokines par les cellules monocytaires, ce qui pourrait majorer ou diminuer les effets du CFC sur les lymphocytes T.

Nous avons tout d'abord analysé le niveau basal (en absence d'exposition au CFC) d'ERO dans les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> quiescents à l'aide de trois sondes, DHE et MitoSox, et DCFDA. Les sondes DHE et MitoSox sont communément utilisées pour détecter la production d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> respectivement intracellulaire et mitochondriale. Cependant, le DHE et le MitoSox réagissent tous deux avec les ERO pour former deux composés fluorescents. Un de ces composés, le 2-hydroxyethidium (2-OH-E<sup>+</sup>) se forme spécifiquement en présence d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Un autre composé, l'éthidium (E<sup>+</sup>) se forme en présence d'autres oxydants tels que ONOO<sup>-</sup>, HO<sup>•</sup> et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. De plus, le DHE peut être directement hydroxylé par le cytochrome P450, ou d'autres protéines ayant une activité enzymatique proche comme le cytochrome C, pour former le 2-OH-E<sup>+</sup>. Les fluorescences produites par ces deux produits, 2-OH-E<sup>+</sup> et E<sup>+</sup> peuvent se superposer et nécessitent le recours à des technologies telles que l'HPLC pour une distinction optimale. De plus, dans le cas où la présence de cellules apoptotiques est avérée, l'activité du cytochrome C peut être excessive et produire une hydroxylation non spécifique du DHE (revue dans Hua Cai, 2007). Dans les résultats présentés ici, la forte mortalité des Tregs pourrait donc produire une hydroxylation non spécifique et masquer les réelles différences de production intracellulaire globale d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> entre Tregs et lymphocytes T CD4<sup>+</sup> conventionnels totaux. Les mesures en cytométrie en flux à l'aide de la sonde DHE donnent donc plus une indication semi-quantitative de la production d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> intracellulaire, et doivent donc être interprétée avec prudence. L'utilisation du MitoSox permet de minimiser l'interférence de la fluorescence produite par le E<sup>+</sup>, par le changement de la longueur d'onde d'excitation du MitoSox de 480 nm à 405 nm. Ceci a pour effet de réduire significativement l'intensité d'émission du E<sup>+</sup> par rapport à celle du 2-OH-E<sup>+</sup> (revue dans Kalyanaraman B, 2011 & Griendl KK, 2016). Les résultats obtenus ici à l'aide de la sonde MitoSox confirment les résultats obtenus avec la sonde DHE qui montrent une production d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> en condition basale comparable dans les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. De plus, les résultats obtenus ici à l'aide de la sonde MitoSox suggèrent l'origine mitochondriale de cette production d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. L'exposition au CFC tend à augmenter cette production d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> mitochondrial, en accord

avec les résultats de Devadas qui teste l'effet d'une stimulation par un anticorps anti-CD3 (Devadas S, 2002) ; les productions des différentes sous-populations restent comparables. En condition basale comme en réponse à une exposition au CFC, la production mitochondriale d' $O_2^{\bullet}$  ne permet pas d'expliquer les différences d'effet de l'exposition au CFC observées dans les différentes sous-populations de lymphocytes T  $CD4^+$ .

En revanche, les résultats obtenus avec la sonde DCFDA montrent qu'en condition basale, l'oxydation de la sonde DCFDA est plus importante dans les Th17. Cette différence de taux d'oxydation de la sonde DCFDA plus importante dans les Th17 est maintenue lors de l'augmentation du marquage de la sonde après exposition au CFC et dépendante de la dose de CFC. La sonde DCFDA est communément utilisée pour détecter la production intracellulaire d' $H_2O_2$ , un stress oxydant cellulaire, ou étudier la signalisation redox médiée par le fer. Néanmoins, cette sonde ne réagit pas directement avec l' $H_2O_2$ . Le DCFH réagit avec les radicaux hydroxyles ( $HO^{\bullet}$ ), les composés formés par l'interaction entre les peroxydases avec  $H_2O_2$ ,  $NO_2^{\bullet}$ , l'acide hypochloreux ( $HOCl$ ) et les espèces réactives résultant de la décomposition du radical peroxynitrite ( $ONOO^-/ONOOH$ ). Le cytochrome C relargué par les mitochondries dans les cellules apoptotiques peut également oxyder cette sonde. Enfin, les métaux comme le  $Fe^{++}$  en présence d' $O_2$  ou d' $H_2O_2$  peuvent conduire à une oxydation du DCFH. Les résultats obtenus doivent donc être interprétés prudemment. Compte tenu de ces limitations, la sonde DCFDA mesure donc la génération d'oxydants et de radicaux peroxynitrites cellulaires (revue dans Kalyanaraman B, 2011 & Griending KK, 2016). Enfin, des travaux ont montré en analysant la fluorescence du DCF en microscopie que celui-ci se répartit dans le cytoplasme et dans l'espace intermembranaire mitochondrial. Dans le cytoplasme le DCF génère une fluorescence faible en comparaison de la fluorescence provenant de la mitochondrie. Cette différence, résulte de la production basale normale d' $H_2O_2$  par la mitochondrie (Karlsson M, 2010). En effet, dans la chaîne respiratoire, la réduction partielle de l'oxygène aboutit à la formation d' $O_2^{\bullet}$  convertis en  $H_2O_2$  par la superoxyde dismutase mitochondriale (Han D, 2003, Muller FL, 2004, Murphy MP, 2009). Dans notre modèle nous pouvons donc supposer que l' $H_2O_2$  d'origine mitochondriale contribue à l'oxydation de la sonde DCFDA.

Pour préciser la contribution de l' $H_2O_2$  d'origine mitochondriale à l'oxydation de la sonde DCFDA, nous avons analysé la production d'ERO dans les différentes sous-populations de lymphocytes T  $CD4^+$  en condition basale et en réponse à une exposition au CFC, en présence de différents traitements antioxydants. L'effet limité du prétraitement par la NAC, utilisé ici comme un piègeur de  $HO^{\bullet}$  et  $H_2O_2$ , suggèrent que les ERO contenues dans le CFC ou déjà

présentes dans la cellule ne sont que partiellement responsables de l'augmentation des taux d'ERO dans les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> exposés au CFC, et que l'augmentation de la production d'ERO observée lors d'une exposition au CFC est liée à une production endogène d'ERO.

La chaîne respiratoire mitochondriale est une source significative d'ERO dans les lymphocytes T (Sena LA, 2013). De plus, dans d'autres modèles cellulaires (cardiomyocytes), en réponse à une exposition aux ERO, la mitochondrie peut réagir en produisant à son tour des ERO (Zorov DB, 2000). La diminution (et non pas l'augmentation attendue en cas de rôle du complexe III) de la production basale d'ERO ou stimulée par l'exposition au CFC, en présence d'un inhibiteur du complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale (antimycine), ou de la combinaison de l'antimycine avec un inhibiteur du complexe I (roténone), suggère que la production d'ERO au niveau du complexe III ne contribue que partiellement à l'oxydation de la sonde DCFDA (pour revue Turrens JF, 1997) dans des cellules T quiescentes, contrairement à ce qui a été montré par Sena LA et coll. (Sena LA, 2013) en réponse à une stimulation du TCR/CD3 mimant une activation spécifique d'antigène. De plus, le prétraitement par ces inhibiteurs mitochondriaux, antimycine +/- roténone, ne modifie pas les différences d'oxydation de la sonde DCFDA observées à l'état basal entre les différentes sous-populations cellulaires. L'effet inhibiteur de l'agent découplant FCCP sur l'oxydation de la sonde DCFDA confirme cependant la contribution d'ERO mitochondriales à l'oxydation de la sonde DCFDA. De plus, le fait que ce prétraitement supprime la différence de taux basal d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entre Th17 et « non-Th17 » suggère que les Th17 ont une activité mitochondriale plus importante que les « non-Th17 ». Ce résultat contraste avec l'absence de différence d'oxydation de la sonde MitoSOX entre les sous-populations à l'état basal et en présence de CFC. La présence d'une autre enzyme productrice d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, externe à la chaîne respiratoire, NOX 4, a été décrite dans les mitochondries de cardiomyocytes à proximité de l'ATP synthase (Kuroda J, 2010) et produit de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et non pas de l'anion superoxyde (Graham KA, 2010). La présence et l'expression plus importante de cette enzyme dans la mitochondrie des lymphocytes Th17 n'est à notre connaissance pas décrite mais permettrait d'expliquer la différence observée entre la production d'origine mitochondriale d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> évaluée par MitoSox, et d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> évaluée par DCFDA. Il a déjà été montré que l'exposition au CFC à des doses comparables à celles utilisées dans notre étude induit une augmentation de la production d'ERO dans les lymphocytes T totaux (Hernandez CP, 2013). Nos résultats confirment cette observation, et montrent de plus, que, la mitochondrie contribue à la production d'ERO de façon plus importante dans les Th17 que dans les autres sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>.

Ces niveaux d'ERO plus importants dans les Th17 ne peuvent pas être expliqués par un défaut de la réponse antioxydante dans les Th17. Nous avons en effet analysé, en parallèle de ce travail, en RT-qPCR l'expression des différents composants du système antioxydant Nrf2 et de différents gènes antioxydants cibles du système Nrf2 (*cf* annexe Fig A.2 & A.3). Les résultats obtenus ne mettent pas en évidence de défaut d'expression ou de modulation particulière des différents composants du système Nrf2 dans les Th17 en comparaison des autres sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> en absence de stimulation ou en réponse à une exposition au CFC. Au contraire, nous observons une induction significative de NQO1, une enzyme antioxydante dont la transcription est dépendante de l'activité de Nrf2 (Li N, 2004), dans les Th17, suggérant une réponse antioxydante proficiente, et adaptée au taux d'ERO plus important dans ces cellules.

Par ailleurs, des résultats obtenus parallèlement à ce travail (*cf* annexe Fig A.4) confirment l'expression plus importante dans les Th17 de l'IL4I1, une L-amino -oxydase dont l'activité génère de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par dégradation de l'acide aminé L-phénylalanine, (Boulland ML, 2007, Carbonnelle-Puscian, 2009, Cousin C, 2015). Il a été décrit que l'IL4I1 exprimée dans les Th17 serait à l'origine de leur incapacité à proliférer en réponse à une stimulation du TCR (Santarlaschi V, 2012). Nos résultats ne mettent pas en évidence une augmentation de l'expression de cet enzyme en réponse à une exposition au CFC ce qui suggère que la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par cette enzyme ne peut pas expliquer les niveaux d'ERO plus importants dans les Th17 après exposition au CFC. En revanche, cette production plus importante d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les Th17 en condition basale pourrait contribuer à induire un état de « préactivation » de ERK1/2 (ou à abaisser le seuil d'activation de ERK1/2) dans ces cellules, ce qui expliquerait les résultats de Santarlaschi V et coll. montrant que les Th17 stimulés par un anticorps CD28 seul, en l'absence de stimulation de TCR/CD3, produisent de l'IL-17 ainsi que de l'IL-8 (Santarlaschi V, 2012). Dans ces cellules, la stimulation de ERK1/2 dépendante de CD28 seul (Janardhan SV, 2001) serait suffisante ainsi pour induire la production des deux cytokines.

Enfin, il récemment été montré que la fumée de cigarette altère l'homéostasie du fer et provoque son accumulation dans les cellules, dont les macrophages. Une augmentation de la concentration en Fe<sup>++</sup> mitochondriale peut provoquer une augmentation de la production de radicaux hydroxyles à l'origine d'une inflammation et d'un stress oxydant contribuant à la pathogénèse de la BPCO. Cette augmentation implique la protéine IRP2 (iron-responsive element-binding protein 2) (Cloonan SM, 2015). Les modèles murins déficients pour cette protéine sont protégés contre la BPCO induite par l'exposition à la fumée de cigarette. IRP2 est à l'origine d'une augmentation de la charge en Fe<sup>++</sup> mitochondriale et des niveaux de

cytochrome C oxydase. Le  $\text{Fe}^{++}$  en présence d' $\text{O}_2$  ou d' $\text{H}_2\text{O}_2$  peut conduire à une oxydation du DCFH. Nous pourrions donc supposer que l'oxydation de la sonde DCFH plus importante dans les Th17 est liée à une accumulation de  $\text{Fe}^{++}$  plus importante en raison d'une expression plus importante de IRP2 dans ces cellules.

### **C. Effet des traitements antioxydants sur l'expression de $\text{p16}^{\text{INK4a}}$**

Comme nous l'avons dit précédemment, nous avons donc choisi comme critère d'évaluation de la sénescence l'analyse de l'expression de  $\text{p16}^{\text{INK4a}}$  en immunocytofluorescence. Les résultats obtenus montrant un effet inhibiteur modéré du prétraitement par la NAC sur l'augmentation de l'expression de  $\text{p16}^{\text{INK4a}}$  induite par l'exposition au CFC sont en accord avec l'effet de la NAC sur l'oxydation de la sonde DCFDA dans les mêmes conditions, et confirment la contribution partielle des ERO à l'expression plus élevée de  $\text{p16}^{\text{INK4a}}$ , et par extension à l'induction de la sénescence des Th17. En revanche, nos résultats montrent que le prétraitement par l'antimycine ou le FCCP permet de prévenir totalement la sur-expression de  $\text{p16}^{\text{INK4a}}$  induite par l'exposition au CFC dans les lymphocytes Th17 quiescents. Ces résultats contrastent avec l'absence d'effet stimulant attendu de l'antimycine sur l'oxydation de la sonde DCFDA, et suggèrent que l'activité mitochondriale qui est inhibée de façon similaire par l'antimycine et par le FCCP, à savoir la production d'ATP, contribue à cette augmentation de l'expression de  $\text{p16}^{\text{INK4a}}$ .

### **D. Rôle des ERO mitochondriales dans l'activation de la voie ERK1/2.**

Récemment il a été montré que les ERO d'origines mitochondriales jouent un rôle important dans l'activation de différentes voies de signalisation sensibles aux ERO (NFAT et NF- $\kappa$ B) (Kaminski MM, 2012, Sena LA 2013). Nous avons émis l'hypothèse que les ERO mitochondriales pourraient également être impliquées dans l'activation de ERK1/2.

Nous montrons à l'aide d'un prétraitement par le FCCP que l'activité mitochondriale, indépendamment de la production d'ERO contribue à la phosphorylation de ERK1/2 et de sa translocation nucléaire plus importantes dans les lymphocytes Th17 quiescents. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus par Sena LA et coll sur des lymphocytes T  $\text{CD4}^+$  totaux qui montraient que l'absence d'ERO mitochondriales produites par le complexe III en réponse à une stimulation par des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 était sans effet sur l'activation de

ERK1/2 et n'affectait pas la viabilité cellulaire (Sena LA, 2013). De plus, l'inhibition de la phosphorylation de ERK1/2 dans les 3 sous-populations lymphocytaires par le prétraitement par le FCCP suggère que l'activation de la voie ERK1/2 dépend du métabolisme mitochondrial *via* la production d'ATP, et que l'exposition au CFC stimule ce métabolisme comme déjà montré dans les cellules épithéliales alvéolaires (Ballweg K, 2014). Les niveaux d'ERO générés par un métabolisme mitochondrial basal plus actif ou de façon extramitochondriale, dans les Th17 quiescents pourraient contribuer à un état de « pré-activation » de ERK1/2 permettant ensuite l'expression de p16<sup>INK4a</sup> plus importante dans ces cellules après exposition au CFC.

#### IV. Conclusion générale et perspectives.

Dans ce travail nous montrons pour la première fois que les lymphocytes CD4<sup>+</sup> CCR6<sup>+</sup> Th17 quiescents de donneurs volontaires sains présentent une susceptibilité particulière à la sénescence induite par une exposition unique au CFC, et une production plus importante de la cytokine pro-inflammatoire IL-8.

Cette plus grande susceptibilité à la sénescence est liée à un niveau basal d'ERO plus important dans les Th17 CCR6<sup>+</sup> en comparaison des lymphocytes CD4<sup>+</sup> CCR6<sup>-</sup> « non Th17 » et des Tregs. L'expression plus importante de l'IL4I1 dans les Th17 et/ou des niveaux d'ERO liés à un métabolisme mitochondrial basal plus important ou à la présence d'autres enzymes productrices d'ERO dans la mitochondrie, pourraient expliquer le niveau d'ERO plus important observé dans les Th17.

La plus grande susceptibilité à la sénescence des Th17 semble également liée à une mobilisation particulière de la voie de signalisation ERK1/2 et à un métabolisme mitochondrial plus important. Nos résultats montrent clairement qu'en réponse à une exposition au CFC, ERK1/2 est phosphorylée dans toutes les sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, mais ne présente une translocation nucléaire que dans les Th17, ce qui pourrait être à l'origine d'un programme transcriptionnel particulier dans ces cellules. Nous montrons ainsi que cette voie de signalisation contribue à l'expression de p16<sup>INK4a</sup> plus importante dans les lymphocytes Th17. De plus, nous montrons pour la première fois que le découplage modéré de la chaîne respiratoire et de la production mitochondriale d'ATP pourrait être une stratégie thérapeutique anti-inflammatoire dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques impliquant les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Th17.

Dans les lymphocytes T, la régulation du métabolisme de la glutamine a été associée à la voie des MAPKs ERK1/2 (Carr EL, 2010). Par ailleurs, la protéine UCP2 de couplage de la respiration mitochondriale et de la production mitochondriale d'ATP a été associée à la régulation du catabolisme de la glutamine dans les macrophages (Nübel T, 2008). Compte-tenu de l'effet inhibiteur de l'agent découplant FCCP sur la surexpression de p16<sup>INK4a</sup>, des expériences destinées à mesurer le profil métabolique et la production d'ERO, à l'aide de la technologie SeaHorse, permettront d'évaluer les différences de métabolisme dans les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> en réponse à une exposition au CFC. Il serait également intéressant d'analyser l'effet d'inhibiteurs du métabolisme de la glutamine (Nübel T, 2008) sur l'induction de l'expression de p16<sup>INK4a</sup> en réponse à l'exposition au CFC, pour déterminer si les Th17 quiescents ont un métabolisme basal plus actif de la glutamine en

comparaison des autres sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. De plus, le rôle des différences de métabolisme mitochondrial entre les Th17 et les autres sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, pourra être évalué par l'utilisation d'un autre agent découplant de la chaîne respiratoire mitochondriale, le DNP. Le DNP a déjà été utilisé chez l'homme dans des régimes à visée amaigrissante car il est connu pour augmenter le catabolisme du glucose et des acides gras (Khayat ZA, 1998).

L'apport d'un modèle murin déficient pour l'IL4I1, disponible sur le site de l'IMRB, permettra de préciser, d'une part si cet enzyme est bien responsable de la plus importante production d'ERO dans les Th17 en condition basale et/ou en réponse à une exposition au CFC ; et, d'autre part, le rôle potentiel des ERO produites par cet enzyme sur le seuil d'activation de la voie ERK1/2 plus bas dans les Th17 en réponse à une exposition à la fumée de cigarette.

La fumée de cigarette contient de la nicotine. Les lymphocytes T expriment à leur surface des récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine (nAChRs), qui sont des canaux cationiques principalement au sodium. Ces récepteurs peuvent également être présents à la surface des mitochondries (Gergalova G, 2012), mais il n'existe pas de données sur une expression différentielle de ces récepteurs sur les mitochondries des différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. L'afflux de sodium provoqué par la liaison de la nicotine sur ces récepteurs pourrait contribuer à l'induction d'un phénotype pro-inflammatoire des Th17 *via* la stimulation de la kinase sensible au sodium SGK1 (serum/glucocorticoïd-regulated kinase1) dont l'activation a été récemment associée à l'augmentation du sodium intracellulaire et à l'induction de Th17 pathogènes (Kleinewietfeld M, 2013, Wu C, 2013). L'effet d'inhibiteurs ou d'agonistes des récepteurs nicotiniques sur l'induction du phénotype sénescence des Th17 par l'exposition au CFC pourra être exploré.

A moyen terme, la pertinence des résultats obtenus pourrait être évaluée chez des patients atteints de BPCO en comparaison de sujets fumeurs asymptomatiques et non-fumeurs. En effet, les paramètres analysés dans ce travail pourraient être majorés chez les patients atteints de BPCO en comparaison des sujets sains fumeurs et non-fumeurs. Sur des coupes de poumons de patients fumeurs ou non-fumeurs, avec ou sans BPCO, la co-expression de p16<sup>INK4a</sup>, IL-8, IL-17 & CD3 sera analysée. Dans des prélèvements sanguins de fumeurs avec et sans BPCO, nous analyserons le pourcentage de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> CCR6<sup>+</sup> IL-8<sup>+</sup>, exprimant fortement p16<sup>INK4a</sup>, par rapport aux autres sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, en comparaison avec les résultats obtenus chez des donneurs volontaires sains.

## Références bibliographiques

- Abraham, L., & Fackler, O. T. (2012). HIV-1 Nef: a multifaceted modulator of T cell receptor signaling. *Cell Commun Signal*, 10(1), 39. <http://doi.org/10.1186/1478-811x-10-39>
- Abrams, J. A., Lee, P. C., Port, J. L., Altorki, N. K., & Neugut, A. I. (2008). Cigarette smoking and risk of lung metastasis from esophageal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 17(10), 2707–13. <http://doi.org/10.1158/1055-9965.epi-08-0232>
- Acosta, J. C., O’Loughlen, A., Banito, A., Raguz, S., & Gil, J. (2008). Control of senescence by CXCR2 and its ligands. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 7(19), 2956–2959. <http://doi.org/10.4161/cc.7.19.6780>
- Acosta-Rodriguez, E. V., 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. *Nature Immunology*, 8(9), 942–949. <http://doi.org/10.1038/ni1496>
- Acosta-Rodriguez, E. V., Rivino, L., Geginat, J., Jarrossay, D., Gattorno, M., Lanzavecchia, A., ... Napolitani, G. (2007). Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nature Immunology*, 8(6), 639–646. <http://doi.org/10.1038/ni1467>
- Adamson, J., Azzopardi, D., Errington, G., Dickens, C., McAughey, J., & Gaca, M. D. (2011). Assessment of an in vitro whole cigarette smoke exposure system: The Borgwaldt RM20S 8-syringe smoking machine. *Chem Cent J*, 5, 50. <http://doi.org/10.1186/1752-153x-5-50>
- Adenuga, D., & Rahman, I. (2010). Protein kinase CK2-mediated phosphorylation of HDAC2 regulates co-repressor formation, deacetylase activity and acetylation of HDAC2 by cigarette smoke and aldehydes. *Arch Biochem Biophys*, 498(1), 62–73. <http://doi.org/10.1016/j.abb.2010.04.002>
- Afkarian, M., Sedy, J. R., Yang, J., Jacobson, N. G., Cereb, N., Yang, S. Y., ... Murphy, K. M. (2002). T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells. *Nat Immunol*, 3(6), 549–57. <http://doi.org/10.1038/ni794>
- Afshari, C. A., Vojta, P. J., Annab, L. A., Futreal, P. A., Willard, T. B., & Barrett, J. C. (1993). Investigation of the role of G1/S cell cycle mediators in cellular senescence. *Exp Cell Res*, 209(2), 231–7. <http://doi.org/10.1006/excr.1993.1306>
- Agarwal, S., & Rao, A. (1998). Modulation of chromatin structure regulates cytokine gene expression during T cell differentiation. *Immunity*, 9(6), 765–75.
- Aggarwal, S., Ghilardi, N., Xie, M. H., de Sauvage, F. J., & Gurney, A. L. (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. <http://doi.org/10.1074/jbc.M207577200>
- Alaluf, S., Muir-Howie, H., Hu, H. L., Evans, A., & Green, M. R. (2000). Atmospheric oxygen accelerates the induction of a post-mitotic phenotype in human dermal fibroblasts: the key protective role of glutathione. *Differentiation*, 66(2–3), 147–55. <http://doi.org/10.1046/j.1432-0436.2000.660209.x>
- Alcorta, D. A., Xiong, Y., Phelps, D., Hannon, G., Beach, D., & Barrett, J. C. (1996). Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(24), 13742–13747.
- Al-Ramli, W., Préfontaine, D., Chouiali, F., Martin, J. G., Olivenstein, R., Lemièrre, C., & Hamid, Q. (2009). T(H)17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma. *The Journal of*

- Alwan, A. D., Galea, G., & Stuckler, D. (2011). Development at risk: addressing noncommunicable diseases at the United Nations high-level meeting. *Bulletin of the World Health Organization*, 89(8), 546–546A. <http://doi.org/10.2471/BLT.11.091074>
- Alwan, A., Maclean, D. R., Riley, L. M., d'Espaignet, E. T., Mathers, C. D., Stevens, G. A., & Bettcher, D. (2010). Monitoring and surveillance of chronic non-communicable diseases: progress and capacity in high-burden countries. *Lancet (London, England)*, 376(9755), 1861–1868. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61853-3](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61853-3)
- Ameziane-El-Hassani, R., Morand, S., Boucher, J.-L., Frapart, Y.-M., Apostolou, D., Agnandji, D., ... Dupuy, C. (2005). Dual oxidase-2 has an intrinsic Ca<sup>2+</sup>-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(34), 30046–30054. <http://doi.org/10.1074/jbc.M500516200>
- Amsellem, V., Gary-Bobo, G., Marcos, E., Maitre, B., Chaar, V., Validire, P., ... Adnot, S. (2011a). Telomere dysfunction causes sustained inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 184(12), 1358–1366. <http://doi.org/10.1164/rccm.201105-0802OC>
- Anastasiou, D., Poulogiannis, G., Asara, J. M., Boxer, M. B., Jiang, J., Shen, M., ... Cantley, L. C. (2011a). Inhibition of pyruvate kinase M2 by reactive oxygen species contributes to cellular antioxidant responses. *Science (New York, N.Y.)*, 334(6060), 1278–1283. <http://doi.org/10.1126/science.1211485>
- Anbarasi, K., Vani, G., & Devi, C. S. S. (2005). Protective effect of bacoside A on cigarette smoking-induced brain mitochondrial dysfunction in rats. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology: Official Organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer*, 24(3), 225–234.
- Annacker, O., Pimenta-Araujo, R., Burlen-Defranoux, O., Barbosa, T. C., Cumano, A., & Bandeira, A. (2001). CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 166(5), 3008–3018.
- Annunziato, F., Cosmi, L., Santarlasci, V., Maggi, L., Liotta, F., Mazzinghi, B., ... Romagnani, S. (2007). Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(8), 1849–1861. <http://doi.org/10.1084/jem.20070663>
- Annunziato, F., & Romagnani, S. (2009). Heterogeneity of human effector CD4<sup>+</sup> T cells. *Arthritis Research & Therapy*, 11(6), 257. <http://doi.org/10.1186/ar2843>
- Annunziato, F., Santarlasci, V., Maggi, L., Cosmi, L., Liotta, F., & Romagnani, S. (2013). Reasons for rarity of Th17 cells in inflammatory sites of human disorders. *Seminars in Immunology*, 25(4), 299–304. <http://doi.org/10.1016/j.smim.2013.10.011>
- Antunes, F., & Cadenas, E. (2000). Estimation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gradients across biomembranes. *FEBS Letters*, 475(2), 121–126.
- Aoshiba, K., Nagai, A., & Konno, K. (1994). Nicotine prevents a reduction in neutrophil filterability induced by cigarette smoke exposure. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 150(4), 1101–1107. <http://doi.org/10.1164/ajrccm.150.4.7921443>
- Aoshiba, K., Tamaoki, J., & Nagai, A. (2001). Acute cigarette smoke exposure induces apoptosis of alveolar macrophages. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 281(6), L1392–1401.

- Aoshiba, K., Zhou, F., Tsuji, T., & Nagai, A. (2012). DNA damage as a molecular link in the pathogenesis of COPD in smokers. *The European Respiratory Journal*, 39(6), 1368–1376. <http://doi.org/10.1183/09031936.00050211>
- Appay, V., Nixon, D. F., Donahoe, S. M., Gillespie, G. M., Dong, T., King, A., ... Rowland-Jones, S. L. (2000). HIV-specific CD8(+) T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *The Journal of Experimental Medicine*, 192(1), 63–75.
- Araujo, H., Danziger, N., Cordier, J., Glowinski, J., & Chneiweiss, H. (1993). Characterization of PEA-15, a major substrate for protein kinase C in astrocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(8), 5911–5920.
- Arnér, E. S. J. (2009). Focus on mammalian thioredoxin reductases--important selenoproteins with versatile functions. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1790(6), 495–526. <http://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.01.014>
- Arnson, Y., Shoenfeld, Y., & Amital, H. (2010). Effects of tobacco smoke on immunity, inflammation and autoimmunity. *Journal of Autoimmunity*, 34(3), J258-265. <http://doi.org/10.1016/j.jaut.2009.12.003>
- Arthur, J. R. (2000). The glutathione peroxidases. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 57(13–14), 1825–1835.
- Asao, H., Okuyama, C., Kumaki, S., Ishii, N., Tsuchiya, S., Foster, D., & Sugamura, K. (2001). Cutting edge: the common gamma-chain is an indispensable subunit of the IL-21 receptor complex. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 167(1), 1–5.
- Aujla, S. J., Dubin, P. J., & Kolls, J. K. (2007). Th17 cells and mucosal host defense. *Seminars in Immunology*, 19(6), 377–382. <http://doi.org/10.1016/j.smim.2007.10.009>
- Awasthi, A., Carrier, Y., Peron, J. P. S., Bettelli, E., Kamanaka, M., Flavell, R. A., ... Weiner, H. L. (2007). A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells. *Nature Immunology*, 8(12), 1380–1389. <http://doi.org/10.1038/ni1541>
- Ayyoub, M., Deknuydt, F., Raimbaud, I., Dousset, C., Leveque, L., Bioley, G., & Valmori, D. (2009). Human memory FOXP3+ Tregs secrete IL-17 ex vivo and constitutively express the T(H)17 lineage-specific transcription factor RORgamma t. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(21), 8635–8640. <http://doi.org/10.1073/pnas.0900621106>
- Azuma, T., Takahashi, T., Kunisato, A., Kitamura, T., & Hirai, H. (2003). Human CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress NKT cell functions. *Cancer Research*, 63(15), 4516–4520.
- Baboni, F. B., Barp, D., Izidoro, A. C. S. de A., Samaranayake, L. P., & Rosa, E. A. R. (2009). Enhancement of *Candida albicans* virulence after exposition to cigarette mainstream smoke. *Mycopathologia*, 168(5), 227–235. <http://doi.org/10.1007/s11046-009-9217-5>
- Bacchetta, R., Gambineri, E., & Roncarolo, M.-G. (2007). Role of regulatory T cells and FOXP3 in human diseases. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 120(2), 227-235-237. <http://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.06.023>
- Bäckhed, F., Ley, R. E., Sonnenburg, J. L., Peterson, D. A., & Gordon, J. I. (2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science (New York, N.Y.)*, 307(5717), 1915–1920. <http://doi.org/10.1126/science.1104816>
- Bagaitkar, J., Demuth, D. R., & Scott, D. A. (2008). Tobacco use increases susceptibility to bacterial infection. *Tobacco Induced Diseases*, 4, 12. <http://doi.org/10.1186/1617-9625-4-12>

- Ballweg, K., Mutze, K., Königshoff, M., Eickelberg, O., & Meiners, S. (2014). Cigarette smoke extract affects mitochondrial function in alveolar epithelial cells. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 307(11), L895-907. <http://doi.org/10.1152/ajplung.00180.2014>
- Bánfi, B., Tirone, F., Durussel, I., Knisz, J., Moskwa, P., Molnár, G. Z., ... Cox, J. A. (2004). Mechanism of Ca<sup>2+</sup> activation of the NADPH oxidase 5 (NOX5). *The Journal of Biological Chemistry*, 279(18), 18583–18591. <http://doi.org/10.1074/jbc.M310268200>
- Banin, S., Moyal, L., Shieh, S., Taya, Y., Anderson, C. W., Chessa, L., ... Ziv, Y. (1998). Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science (New York, N.Y.)*, 281(5383), 1674–1677.
- Barbi, J., Pardoll, D., & Pan, F. (2013). Metabolic control of the Treg/Th17 axis. *Immunological Reviews*, 252(1), 52–77. <http://doi.org/10.1111/imr.12029>
- Barceló, B., Pons, J., Ferrer, J. M., Sauleda, J., Fuster, A., & Agustí, A. G. N. (2008). Phenotypic characterisation of T-lymphocytes in COPD: abnormal CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T-lymphocyte response to tobacco smoking. *The European Respiratory Journal*, 31(3), 555–562. <http://doi.org/10.1183/09031936.00010407>
- Barnes, P. J. (2004). Alveolar macrophages as orchestrators of COPD. *COPD*, 1(1), 59–70. <http://doi.org/10.1081/COPD-120028701>
- Barrett, J. C., Hansoul, S., Nicolae, D. L., Cho, J. H., Duerr, R. H., Rioux, J. D., ... Daly, M. J. (2008). Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nature Genetics*, 40(8), 955–962. <http://doi.org/10.1038/ng.175>
- Bartek, J., & Lukas, J. (2003). Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell*, 3(5), 421–429.
- Barthel, A., Okino, S. T., Liao, J., Nakatani, K., Li, J., Whitlock, J. P., & Roth, R. A. (1999). Regulation of GLUT1 gene transcription by the serine/threonine kinase Akt1. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(29), 20281–20286.
- Batten, M., Li, J., Yi, S., Kljavin, N. M., Danilenko, D. M., Lucas, S., ... Ghilardi, N. (2006). Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. *Nature Immunology*, 7(9), 929–936. <http://doi.org/10.1038/ni1375>
- Beaudeux, J.-L., Peynet, J., Bonnefont-Rousselot, D., Therond, P., Delattre, J., & Legrand, A. (2006). [Cellular sources of reactive oxygen and nitrogen species. Roles in signal transcription pathways]. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 64(6), 373–381.
- Beisswenger, C., Platz, J., Seifart, C., Vogelmeier, C., & Bals, R. (2004). Exposure of differentiated airway epithelial cells to volatile smoke in vitro. *Respiration; International Review of Thoracic Diseases*, 71(4), 402–409. <http://doi.org/10.1159/000079647>
- Belikov, A. V., Schraven, B., & Simeoni, L. (2015). T cells and reactive oxygen species. *Journal of Biomedical Science*, 22, 85. <https://doi.org/10.1186/s12929-015-0194-3>
- Bénard, A., Mercié, P., Alioum, A., Bonnet, F., Lazaro, E., Dupon, M., ... Groupe d'Epidémiologie Clinique du Sida en Aquitaine. (2010). Bacterial pneumonia among HIV-infected patients: decreased risk after tobacco smoking cessation. ANRS CO3 Aquitaine Cohort, 2000-2007. *PloS One*, 5(1), e8896. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0008896>

- Ben-Sasson, S. Z., Gerstel, R., Hu-Li, J., & Paul, W. E. (2001). Cell division is not a “clock” measuring acquisition of competence to produce IFN-gamma or IL-4. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 166(1), 112–120.
- Benz, C. C., & Yau, C. (2008). Ageing, oxidative stress and cancer: paradigms in parallax. *Nature Reviews. Cancer*, 8(11), 875–879. <http://doi.org/10.1038/nrc2522>
- Bergendi, L., Benes, L., Duracková, Z., & Ferencik, M. (1999). Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sciences*, 65(18–19), 1865–1874.
- Beriou, G., Bradshaw, E. M., Lozano, E., Costantino, C. M., Hastings, W. D., Orban, T., ... Hafler, D. A. (2010). TGF-beta induces IL-9 production from human Th17 cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 185(1), 46–54. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.1000356>
- Berod, L., Friedrich, C., Nandan, A., Freitag, J., Hagemann, S., Harmrolfs, K., ... Sparwasser, T. (2014). De novo fatty acid synthesis controls the fate between regulatory T and T helper 17 cells. *Nature Medicine*, 20(11), 1327–1333. <http://doi.org/10.1038/nm.3704>
- Berrebi, D., Besnard, M., Fromont-Hankard, G., Paris, R., Mougenot, J. F., De Lagausie, P., ... Peuchmaur, M. (1998). Interleukin-12 expression is focally enhanced in the gastric mucosa of pediatric patients with Crohn’s disease. *The American Journal of Pathology*, 152(3), 667–672.
- Berwick, D. C., Hers, I., Heesom, K. J., Moule, S. K., & Tavaré, J. M. (2002). The identification of ATP-citrate lyase as a protein kinase B (Akt) substrate in primary adipocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(37), 33895–33900. <http://doi.org/10.1074/jbc.M204681200>
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T. B., Oukka, M., ... Kuchroo, V. K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, 441(7090), 235–238. <http://doi.org/10.1038/nature04753>
- Biedermann, T., Röcken, M., & Carballido, J. M. (2004). TH1 and TH2 lymphocyte development and regulation of TH cell-mediated immune responses of the skin. *The Journal of Investigative Dermatology. Symposium Proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc. [and] European Society for Dermatological Research*, 9(1), 5–14. <http://doi.org/10.1111/j.1087-0024.2004.00829.x>
- Bienert, G. P., & Chaumont, F. (2014). Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1840(5), 1596–1604. <http://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.09.017>
- Bird, J. J., Brown, D. R., Mullen, A. C., Moskowitz, N. H., Mahowald, M. A., Sider, J. R., ... Reiner, S. L. (1998). Helper T cell differentiation is controlled by the cell cycle. *Immunity*, 9(2), 229–237.
- Bisset, L. R., & Schmid-Grendelmeier, P. (2005). Chemokines and their receptors in the pathogenesis of allergic asthma: progress and perspective. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 11(1), 35–42.
- Bogoyevitch, M. A. (2000). Signalling via stress-activated mitogen-activated protein kinases in the cardiovascular system. *Cardiovascular Research*, 45(4), 826–842.
- Boniface, K., Bernard, F.-X., Garcia, M., Gurney, A. L., Lecron, J.-C., & Morel, F. (2005). IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 174(6), 3695–3702.
- Boniface, K., Bak-Jensen K.S., Li, Y., Blumenschein, W.M., McGeachy M.J., McClanahan, T.K., McKenzie, B.S., Kastelein, R.A., Cua, D.J., & de Waal Malefyt, R.. « Prostaglandin E2 Regulates Th17 Cell Differentiation and Function through Cyclic AMP and EP2/EP4 Receptor

Signaling ». *The Journal of Experimental Medicine* 206, n° 3 (2009): 535-48. doi:10.1084/jem.20082293.

- Bopp, T., Becker, C., Klein, M., Klein-Hessling, S., Palmethofer, A., Serfling, E., ... Schmitt, E. (2007). Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(6), 1303–1310. <http://doi.org/10.1084/jem.20062129>
- Borsellino, G., Kleinewietfeld, M., Di Mitri, D., Sternjak, A., Diamantini, A., Giometto, R., ... Falk, K. (2007). Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3<sup>+</sup> Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*, 110(4), 1225–1232. <http://doi.org/10.1182/blood-2006-12-064527>
- Bosetti, C., Malvezzi, M., Rosso, T., Bertuccio, P., Gallus, S., Chatenoud, L., ... La Vecchia, C. (2012). Lung cancer mortality in European women: trends and predictions. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 78(3), 171–178. <http://doi.org/10.1016/j.lungcan.2012.08.008>
- Botteri, E., Iodice, S., Bagnardi, V., Raimondi, S., Lowenfels, A. B., & Maisonneuve, P. (2008). Smoking and colorectal cancer: a meta-analysis. *JAMA*, 300(23), 2765–2778. <http://doi.org/10.1001/jama.2008.839>
- Boulland, M.-L., Marquet, J., Molinier-Frenkel, V., Möller, P., Guiter, C., Lasoudris, F., ... Castellano, F. (2007). Human IL4I1 is a secreted L-phenylalanine oxidase expressed by mature dendritic cells that inhibits T-lymphocyte proliferation. *Blood*, 110(1), 220–227. <http://doi.org/10.1182/blood-2006-07-036210>
- Boveris, A., & Chance, B. (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *The Biochemical Journal*, 134(3), 707–716.
- Bracke, K. R., D'hulst, A. I., Maes, T., Moerloose, K. B., Demedts, I. K., Lebecque, S., ... Brusselle, G. G. (2006a). Cigarette smoke-induced pulmonary inflammation and emphysema are attenuated in CCR6-deficient mice. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 177(7), 4350–4359.
- Bracke, K. R., D'hulst, A. I., Maes, T., Moerloose, K. B., Demedts, I. K., Lebecque, S., ... Brusselle, G. G. (2006b). Cigarette smoke-induced pulmonary inflammation and emphysema are attenuated in CCR6-deficient mice. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 177(7), 4350–4359.
- 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), 1152–1167. <http://doi.org/10.1136/gut.2008.163667>
- Bratke, K., Klug, M., Bier, A., Julius, P., Kuepper, M., Virchow, J. C., & Lommatzsch, M. (2008). Function-associated surface molecules on airway dendritic cells in cigarette smokers. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 38(6), 655–660. <http://doi.org/10.1165/rcmb.2007-0400OC>
- Braum, O., Pirzer, H., & Fickenscher, H. (2012). Interleukin-26, a highly cationic T-cell cytokine targeting epithelial cells. *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry*, 11(3), 221–229.
- Brembilla, N. C., Montanari, E., Truchetet, M.-E., Raschi, E., Meroni, P., & Chizzolini, C. (2013). Th17 cells favor inflammatory responses while inhibiting type I collagen deposition by dermal fibroblasts: differential effects in healthy and systemic sclerosis fibroblasts. *Arthritis Research & Therapy*, 15(5), R151. <http://doi.org/10.1186/ar4334>

- Brenchley, J. M., & Douek, D. C. (2008). The mucosal barrier and immune activation in HIV pathogenesis. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 3(3), 356–361. <http://doi.org/10.1097/COH.0b013e3282f9ae9c>
- Brennan, P., Bogillot, O., Cordier, S., Greiser, E., Schill, W., Vineis, P., ... Boffetta, P. (2000). Cigarette smoking and bladder cancer in men: a pooled analysis of 11 case-control studies. *International Journal of Cancer*, 86(2), 289–294.
- Brière, J.-J., Favier, J., El Ghouzzi, V., Djouadi, F., Bénit, P., Gimenez, A.-P., & Rustin, P. (2005). Succinate dehydrogenase deficiency in human. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 62(19–20), 2317–2324. <http://doi.org/10.1007/s00018-005-5237-6>
- Brigelius-Flohé, R., & Maiorino, M. (2013). Glutathione peroxidases. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1830(5), 3289–3303. <http://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.11.020>
- Brookes, S., Rowe, J., Gutierrez Del Arroyo, A., Bond, J., & Peters, G. (2004). Contribution of p16(INK4a) to replicative senescence of human fibroblasts. *Experimental Cell Research*, 298(2), 549–559. <http://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.04.035>
- Brown, J. P., Wei, W., & Sedivy, J. M. (1997). Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. *Science (New York, N.Y.)*, 277(5327), 831–834.
- Brown, S. L., Sekhar, K. R., Rachakonda, G., Sasi, S., & Freeman, M. L. (2008). Activating transcription factor 3 is a novel repressor of the nuclear factor erythroid-derived 2-related factor 2 (Nrf2)-regulated stress pathway. *Cancer Research*, 68(2), 364–368. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2170>
- Brozyna, S., Ahern, J., Hodge, G., Nairn, J., Holmes, M., Reynolds, P. N., & Hodge, S. (2009). Chemotactic mediators of Th1 T-cell trafficking in smokers and COPD patients. *COPD*, 6(1), 4–16. <http://doi.org/10.1080/15412550902724164>
- Bruey, J.-M., Bruey-Sedano, N., Luciano, F., Zhai, D., Balpai, R., Xu, C., ... Reed, J. C. (2007). Bcl-2 and Bcl-XL regulate proinflammatory caspase-1 activation by interaction with NALP1. *Cell*, 129(1), 45–56. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.045>
- Brusselle, G. G. (2009). Matrix metalloproteinase 12, asthma, and COPD. *The New England Journal of Medicine*, 361(27), 2664–2665. <http://doi.org/10.1056/NEJMe0910626>
- Brusselle, G. G., Bracke, K. R., Maes, T., D'hulst, A. I., Moerloose, K. B., Joos, G. F., & Pauwels, R. A. (2006). Murine models of COPD. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 19(3), 155–165. <http://doi.org/10.1016/j.pupt.2005.06.001>
- Brüstle, A., Heink, S., Huber, M., Rosenplänter, C., Stadelmann, C., Yu, P., ... Lohoff, M. (2007). The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. *Nature Immunology*, 8(9), 958–966. <http://doi.org/10.1038/ni1500>
- Buck, M. D., O'Sullivan, D., & Pearce, E. L. (2015). T cell metabolism drives immunity. *The Journal of Experimental Medicine*, 212(9), 1345–1360. <http://doi.org/10.1084/jem.20151159>
- Burgler, S., Ouaked, N., Bassin, C., Basinski, T. M., Mantel, P.-Y., Siegmund, K., ... Schmidt-Weber, C. B. (2009). Differentiation and functional analysis of human T(H)17 cells. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 123(3), 588–595, 595–7. <http://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.12.017>
- Bustamante, M., Nos, P., Hoyos, M., Hinojosa, J., Molés, J. R., García-Herola, A., & Berenguer, J. (1998). Relationship between smoking and colonic involvement in inflammatory bowel

disease. *Revista Española De Enfermedades Digestivas: Organo Oficial De La Sociedad Española De Patología Digestiva*, 90(12), 833–840.

- Cagnol, S., & Chambard, J.-C. (2010). ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death-apoptosis, autophagy and senescence. *The FEBS Journal*, 277(1), 2–21. <http://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07366.x>
- Cai, H., Dikalov, S., Griendling, K. K., & Harrison, D. G. (2007). Detection of reactive oxygen species and nitric oxide in vascular cells and tissues: comparison of sensitivity and specificity. *Methods in Molecular Medicine*, 139, 293–311.
- Cai, H., & Harrison, D. G. (2000). Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circulation Research*, 87(10), 840–844.
- Caligiuri, G. (2004). [Role of the immune response in atherosclerosis and acute coronary syndromes]. *Médecine Sciences: M/S*, 20(2), 175–181. <http://doi.org/10.1051/medsci/2004202175>
- Campisi, J., & d'Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(9), 729–740. <http://doi.org/10.1038/nrm2233>
- Candé, C., Cohen, I., Daugas, E., Ravagnan, L., Larochette, N., Zamzami, N., & Kroemer, G. (2002). Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. *Biochimie*, 84(2–3), 215–222.
- Caramori, G., Adcock, I. M., Casolari, P., Ito, K., Jazrawi, E., Tsaprouni, L., ... Papi, A. (2011). Unbalanced oxidant-induced DNA damage and repair in COPD: a link towards lung cancer. *Thorax*, 66(6), 521–527. <http://doi.org/10.1136/thx.2010.156448>
- Carbonnelle-Puscian, A., Copie-Bergman, C., Baia, M., Martin-Garcia, N., Allory, Y., Haioun, C., ... 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), 952–960. <http://doi.org/10.1038/leu.2008.380>
- Carnevali, S., Petruzzelli, S., Longoni, B., Vanacore, R., Barale, R., Cipollini, M., ... Giuntini, C. (2003). Cigarette smoke extract induces oxidative stress and apoptosis in human lung fibroblasts. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 284(6), L955–963. <http://doi.org/10.1152/ajplung.00466.2001>
- Carr, E. L., Kelman, A., Wu, G. S., Gopaul, R., Senkevitch, E., Aghvanyan, A., ... Frauwirth, K. A. (2010). Glutamine uptake and metabolism are coordinately regulated by ERK/MAPK during T lymphocyte activation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 185(2), 1037–1044. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.0903586>
- Casagrande, S., Bonetto, V., Fratelli, M., Gianazza, E., Eberini, I., Massignan, T., ... Ghezzi, P. (2002). Glutathionylation of human thioredoxin: a possible crosstalk between the glutathione and thioredoxin systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(15), 9745–9749. <http://doi.org/10.1073/pnas.152168599>
- Castro, S. M., Chakraborty, K., & Guerrero-Plata, A. (2011). Cigarette smoke suppresses TLR-7 stimulation in response to virus infection in plasmacytoid dendritic cells. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, 25(5), 1106–1113. <http://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.03.011>
- Chalmin, F., Mignot, G., Bruchard, M., Chevriaux, A., Végran, F., Hichami, A., ... Ghiringhelli, F. (2012). Stat3 and Gfi-1 transcription factors control Th17 cell immunosuppressive activity via the regulation of ectonucleotidase expression. *Immunity*, 36(3), 362–373. <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.12.019>

- Chan, A. T., & Giovannucci, E. L. (2010). Primary prevention of colorectal cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2029–2043.e10. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.01.057>
- Chang, C.-F., D'Souza, W. N., Ch'en, I. L., Pages, G., Pouyssegur, J., & Hedrick, S. M. (2012). Polar opposites: Erk direction of CD4 T cell subsets. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 189(2), 721–731. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.1103015>
- Chang, H., Hanawa, H., Liu, H., Yoshida, T., Hayashi, M., Watanabe, R., ... Aizawa, Y. (2006). Hydrodynamic-based delivery of an interleukin-22-Ig fusion gene ameliorates experimental autoimmune myocarditis in rats. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 177(6), 3635–3643.
- Chang, S. H., & Dong, C. (2007). A novel heterodimeric cytokine consisting of IL-17 and IL-17F regulates inflammatory responses. *Cell Research*, 17(5), 435–440. <http://doi.org/10.1038/cr.2007.35>
- Chao, L. C., Wroblewski, K., Zhang, Z., Pei, L., Vergnes, L., Ilkayeva, O. R., ... Tontonoz, P. (2009). Insulin resistance and altered systemic glucose metabolism in mice lacking Nur77. *Diabetes*, 58(12), 2788–2796. <http://doi.org/10.2337/db09-0763>
- Chen, J., Zhang, Z., & Cai, L. (2014). Diabetic cardiomyopathy and its prevention by nrf2: current status. *Diabetes & Metabolism Journal*, 38(5), 337–345. <http://doi.org/10.4093/dmj.2014.38.5.337>
- Chen, K., Pociask, D. A., McAleer, J. P., Chan, Y. R., Alcorn, J. F., Kreindler, J. L., ... Zheng, M. (2011). IL-17RA is required for CCL2 expression, macrophage recruitment, and emphysema in response to cigarette smoke. *PloS One*, 6(5), e20333. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0020333>
- Chen, Q. M. (2000). Replicative senescence and oxidant-induced premature senescence. Beyond the control of cell cycle checkpoints. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 908, 111–125.
- Chen, Q., Vazquez, E. J., Moghaddas, S., Hoppel, C. L., & Lesnefsky, E. J. (2003). Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(38), 36027–36031. <http://doi.org/10.1074/jbc.M304854200>
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.-J., Li, L., Marinos, N., ... Wahl, S. M. (2003). Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *The Journal of Experimental Medicine*, 198(12), 1875–1886. <http://doi.org/10.1084/jem.20030152>
- Chen, Y., Gorelik, G. J., Strickland, F. M., & Richardson, B. C. (2010). Decreased ERK and JNK signaling contribute to gene overexpression in “senescent” CD4+CD28- T cells through epigenetic mechanisms. *Journal of Leukocyte Biology*, 87(1), 137–145. <http://doi.org/10.1189/jlb.0809562>
- Chen, Z., & O'Shea, J. J. (2008). Regulation of IL-17 production in human lymphocytes. *Cytokine*, 41(2), 71–78. <http://doi.org/10.1016/j.cyto.2007.09.009>
- Chen, Z.-H., Kim, H. P., Sciurba, F. C., Lee, S.-J., Feghali-Bostwick, C., Stolz, D. B., ... Choi, A. M. K. (2008). Egr-1 regulates autophagy in cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease. *PloS One*, 3(10), e3316. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0003316>
- Chi, H. (2012). Regulation and function of mTOR signalling in T cell fate decisions. *Nature Reviews. Immunology*, 12(5), 325–338. <http://doi.org/10.1038/nri3198>
- Chiaretti, S., Li, X., Gentleman, R., Vitale, A., Vignetti, M., Mandelli, F., ... Foa, R. (2004). Gene expression profile of adult T-cell acute lymphocytic leukemia identifies distinct subsets of

- patients with different response to therapy and survival. *Blood*, 103(7), 2771–2778. <http://doi.org/10.1182/blood-2003-09-3243>
- Chien, W. W., & French, M. (2006). [Regulation of p16INK4a, senescence and oncogenesis]. *Médecine Sciences: M/S*, 22(10), 865–871. <http://doi.org/10.1051/medsci/20062210865>
- Cho, K. A., Ryu, S. J., Oh, Y. S., Park, J. H., Lee, J. W., Kim, H.-P., ... Park, S. C. (2004). Morphological adjustment of senescent cells by modulating caveolin-1 status. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(40), 42270–42278. <http://doi.org/10.1074/jbc.M402352200>
- Cho, S. W., Park, J.-S., Heo, H. J., Park, S.-W., Song, S., Kim, I., ... Koh, G. Y. (2014). Dual modulation of the mitochondrial permeability transition pore and redox signaling synergistically promotes cardiomyocyte differentiation from pluripotent stem cells. *Journal of the American Heart Association*, 3(2), e000693. <http://doi.org/10.1161/JAHA.113.000693>
- Cho, S. Y., Seo, D.-B., Kim, W. G., & Lee, S.-J. (2014). Mild mitochondrial uncoupling prevents premature senescence in human dermal fibroblasts. *The Journal of Investigative Dermatology*, 134(2), 540–543. <http://doi.org/10.1038/jid.2013.352>
- Choi, J.-W., Park, S. C., Kang, G. H., Liu, J. O., & Youn, H.-D. (2004). Nur77 activated by hypoxia-inducible factor-1alpha overproduces proopiomelanocortin in von Hippel-Lindau-mutated renal cell carcinoma. *Cancer Research*, 64(1), 35–39.
- Chouchane, S., Wooten, J. B., Tewes, F. J., Wittig, A., Müller, B. P., Veltel, D., & Diekmann, J. (2006). Involvement of semiquinone radicals in the in vitro cytotoxicity of cigarette mainstream smoke. *Chemical Research in Toxicology*, 19(12), 1602–1610. <http://doi.org/10.1021/tx060162u>
- Chu, C. C., & Paul, W. E. (1998). Expressed genes in interleukin-4 treated B cells identified by cDNA representational difference analysis. *Molecular Immunology*, 35(8), 487–502.
- Chung, D. R., Kasper, D. L., Panzo, R. J., Chitnis, T., Grusby, M. J., Sayegh, M. H., ... Chitnis, T. (2003). CD4<sup>+</sup> T cells mediate abscess formation in intra-abdominal sepsis by an IL-17-dependent mechanism. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 170(4), 1958–1963.
- Church, D. F., & Pryor, W. A. (1985). Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environmental Health Perspectives*, 64, 111–126.
- Cimprich, K. A., & Cortez, D. (2008). ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 9(8), 616–627. <http://doi.org/10.1038/nrm2450>
- Ciofani, M., Madar, A., Galan, C., Sellars, M., Mace, K., Pauli, F., ... Littman, D. R. (2012). A validated regulatory network for Th17 cell specification. *Cell*, 151(2), 289–303. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2012.09.016>
- Cirée, A., Michel, L., Camilleri-Bröet, S., Jean Louis, F., Oster, M., Flageul, B., ... Tartour, E. (2004). Expression and activity of IL-17 in cutaneous T-cell lymphomas (mycosis fungoides and Sezary syndrome). *International Journal of Cancer*, 112(1), 113–120. <http://doi.org/10.1002/ijc.20373>
- Cloonan, S. M., Glass, K., Lauchó-Contreras, M. E., Bhashyam, A. R., Cervo, M., Pabón, M. A., ... Choi, A. M. K. (2016). Mitochondrial iron chelation ameliorates cigarette smoke-induced bronchitis and emphysema in mice. *Nature Medicine*, 22(2), 163–174. <http://doi.org/10.1038/nm.4021>
- Clunes, L. A., Bridges, A., Alexis, N., & Tarran, R. (2008). In vivo versus in vitro airway surface liquid nicotine levels following cigarette smoke exposure. *Journal of Analytical Toxicology*, 32(3), 201–207.

- Codogno, P., & Meijer, A. J. (2005). Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death and Differentiation*, 12 Suppl 2, 1509–1518. <http://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401751>
- Collison, L. W., Pillai, M. R., Chaturvedi, V., & Vignali, D. A. A. (2009). Regulatory T cell suppression is potentiated by target T cells in a cell contact, IL-35- and IL-10-dependent manner. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 182(10), 6121–6128. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.0803646>
- Collison, L. W., Workman, C. J., Kuo, T. T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K. M., ... Vignali, D. A. A. (2007). The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*, 450(7169), 566–569. <http://doi.org/10.1038/nature06306>
- Condorelli, G., Vigliotta, G., Cafieri, A., Trencia, A., Andalò, P., Oriente, F., ... Beguinot, F. (1999). PED/PEA-15: an anti-apoptotic molecule that regulates FAS/TNFR1-induced apoptosis. *Oncogene*, 18(31), 4409–4415. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1202831>
- Cook, M. B., Kamangar, F., Whitman, D. C., Freedman, N. D., Gammon, M. D., Bernstein, L., ... Chow, W.-H. (2010). Cigarette smoking and adenocarcinomas of the esophagus and esophagogastric junction: a pooled analysis from the international BEACON consortium. *Journal of the National Cancer Institute*, 102(17), 1344–1353. <http://doi.org/10.1093/jnci/djq289>
- Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A., & Campisi, J. (2010). The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annual Review of Pathology*, 5, 99–118. <http://doi.org/10.1146/annurev-pathol-121808-102144>
- Coquillard, Cristin. (2015). mTOR Signaling in Regulatory T Cell Differentiation and Expansion. *SOJ Immunology*, 3(1). <http://doi.org/10.15226/soji/3/1/00122>
- Cortesini, R., LeMaout, J., Ciubotariu, R., & Cortesini, N. S. (2001). CD8+CD28- T suppressor cells and the induction of antigen-specific, antigen-presenting cell-mediated suppression of Th reactivity. *Immunological Reviews*, 182, 201–206.
- Cosio, M. G., Saetta, M., & Agusti, A. (2009). Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease. *The New England Journal of Medicine*, 360(23), 2445–2454. <http://doi.org/10.1056/NEJMra0804752>
- Cosmi, L., De Palma, R., Santarlasci, V., Maggi, L., Capone, M., Frosali, F., ... Annunziato, F. (2008). Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor. *The Journal of Experimental Medicine*, 205(8), 1903–1916. <http://doi.org/10.1084/jem.20080397>
- Cosnes, J. (2010). Smoking, physical activity, nutrition and lifestyle: environmental factors and their impact on IBD. *Digestive Diseases (Basel, Switzerland)*, 28(3), 411–417. <http://doi.org/10.1159/000320395>
- Cote-Sierra, J., Foucras, G., Guo, L., Chiodetti, L., Young, H. A., Hu-Li, J., ... Paul, W. E. (2004). Interleukin 2 plays a central role in Th2 differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(11), 3880–3885. <http://doi.org/10.1073/pnas.0400339101>
- Counts, M. E., Morton, M. J., Laffoon, S. W., Cox, R. H., & Lipowicz, P. J. (2005). Smoke composition and predicting relationships for international commercial cigarettes smoked with three machine-smoking conditions. *Regulatory Toxicology and Pharmacology: RTP*, 41(3), 185–227. <http://doi.org/10.1016/j.yrtph.2004.12.002>

- Cousin, C., Aubatin, A., Le Gouvello, S., Apetoh, L., Castellano, F., & Molinier-Frenkel, V. (2015). The immunosuppressive enzyme IL4I1 promotes FoxP3(+) regulatory T lymphocyte differentiation. *European Journal of Immunology*, 45(6), 1772–1782. <http://doi.org/10.1002/eji.201445000>
- Cozen, W., Diaz-Sanchez, D., James Gauderman, W., Zadnick, J., Cockburn, M. G., Gill, P. S., ... Mack, T. M. (2004). Th1 and Th2 cytokines and IgE levels in identical twins with varying levels of cigarette consumption. *Journal of Clinical Immunology*, 24(6), 617–622. <http://doi.org/10.1007/s10875-004-6247-0>
- Crome, S. Q., Wang, A. Y., Kang, C. Y., & Levings, M. K. (2009). The role of retinoic acid-related orphan receptor variant 2 and IL-17 in the development and function of human CD4+ T cells. *European Journal of Immunology*, 39(6), 1480–1493. <http://doi.org/10.1002/eji.200838908>
- Cross, A. R., & Segal, A. W. (2004). The NADPH oxidase of professional phagocytes--prototype of the NOX electron transport chain systems. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1657(1), 1–22. <http://doi.org/10.1016/j.bbabo.2004.03.008>
- Crothers, K., Beard, C. B., Turner, J., Groner, G., Fox, M., Morris, A., ... Huang, L. (2005). Severity and outcome of HIV-associated Pneumocystis pneumonia containing Pneumocystis jirovecii dihydropteroate synthase gene mutations. *AIDS (London, England)*, 19(8), 801–805.
- Csiszar, A., Lehoux, S., & Ungvari, Z. (2009). Hemodynamic forces, vascular oxidative stress, and regulation of BMP-2/4 expression. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11(7), 1683–1697. <http://doi.org/10.1089/ars.2008.2401>
- Csiszar, A., Smith, K. E., Koller, A., Kaley, G., Edwards, J. G., & 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), 2364–2372. <http://doi.org/10.1161/01.CIR.0000164201.40634.1D>
- Cua, D. J., Sherlock, J., Chen, Y., Murphy, C. A., Joyce, B., Seymour, B., ... Sedgwick, J. D. (2003). Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*, 421(6924), 744–748. <http://doi.org/10.1038/nature01355>
- Cullinan, S. B., & Diehl, J. A. (2004). PERK-dependent activation of Nrf2 contributes to redox homeostasis and cell survival following endoplasmic reticulum stress. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(19), 20108–20117. <http://doi.org/10.1074/jbc.M314219200>
- 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), 2891–2897.
- Dabrowski, A., Boguslowicz, C., Dabrowska, M., Tribillo, I., & Gabryelewicz, A. (2000). Reactive oxygen species activate mitogen-activated protein kinases in pancreatic acinar cells. *Pancreas*, 21(4), 376–384.
- Dagouassat, M., Gagliolo, J.-M., Chrusciel, S., Bourin, M.-C., Duprez, C., Caramelle, P., ... Boczkowski, J. (2013). The cyclooxygenase-2-prostaglandin E2 pathway maintains senescence of chronic obstructive pulmonary disease fibroblasts. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 187(7), 703–714. <http://doi.org/10.1164/rccm.201208-1361OC>
- Dambacher, J., Beigel, F., Zitzmann, K., De Toni, E. N., Göke, B., Diepolder, H. M., ... Brand, S. (2009). The role of the novel Th17 cytokine IL-26 in intestinal inflammation. *Gut*, 58(9), 1207–1217. <http://doi.org/10.1136/gut.2007.130112>

- Dang, E. V., Barbi, J., Yang, H.-Y., Jinasena, D., Yu, H., Zheng, Y., ... Pan, F. (2011). Control of T(H)17/T(reg) balance by hypoxia-inducible factor 1. *Cell*, 146(5), 772–784. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.033>
- Dasgupta, P., Rizwani, W., Pillai, S., Kinkade, R., Kovacs, M., Rastogi, S., ... Chellappan, S. (2009). Nicotine induces cell proliferation, invasion and epithelial-mesenchymal transition in a variety of human cancer cell lines. *International Journal of Cancer*, 124(1), 36–45. <http://doi.org/10.1002/ijc.23894>
- Deaglio, S., Dwyer, K. M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A., ... Robson, S. C. (2007). Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(6), 1257–1265. <http://doi.org/10.1084/jem.20062512>
- de Heens, G. L. T., van der Velden, U., & Loos, B. G. (2009). Cigarette smoking enhances T cell activation and a Th2 immune response; an aspect of the pathophysiology in periodontal disease. *Cytokine*, 47(3), 157–161. <http://doi.org/10.1016/j.cyto.2009.05.006>
- DeJesus, V., Rios, I., Davis, C., Chen, Y., Calhoun, D., Zakeri, Z., & Hubbard, K. (2002). Induction of apoptosis in human replicative senescent fibroblasts. *Experimental Cell Research*, 274(1), 92–99. <http://doi.org/10.1006/excr.2001.5425>
- Deknuydt, F., Bioley, G., Valmori, D., & Ayyoub, M. (2009). IL-1beta and IL-2 convert human Treg into T(H)17 cells. *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)*, 131(2), 298–307. <http://doi.org/10.1016/j.clim.2008.12.008>
- Del Prete, G. F., De Carli, M., Ricci, M., & Romagnani, S. (1991). Helper activity for immunoglobulin synthesis of T helper type 1 (Th1) and Th2 human T cell clones: the help of Th1 clones is limited by their cytolytic capacity. *The Journal of Experimental Medicine*, 174(4), 809–813.
- DeMarini, D. M. (2004). Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review. *Mutation Research*, 567(2–3), 447–474. <http://doi.org/10.1016/j.mrrev.2004.02.001>
- Demedts, I. K., Bracke, K. R., Van Pottelberge, G., Testelmans, D., Verleden, G. M., Vermassen, F. E., ... Brusselle, G. G. (2007). Accumulation of dendritic cells and increased CCL20 levels in the airways of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 175(10), 998–1005. <http://doi.org/10.1164/rccm.200608-1113OC>
- Demidova, A. R., Aau, M. Y., Zhuang, L., & Yu, Q. (2009). Dual regulation of Cdc25A by Chk1 and p53-ATF3 in DNA replication checkpoint control. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(7), 4132–4139. <http://doi.org/10.1074/jbc.M808118200>
- Demoor, T., Bracke, K. R., Vermaelen, K. Y., Dupont, L., Joos, G. F., & Brusselle, G. G. (2009). CCR7 modulates pulmonary and lymph node inflammatory responses in cigarette smoke-exposed mice. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 183(12), 8186–8194. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.0902015>
- DeSantis, C., Siegel, R., Bandi, P., & Jemal, A. (2011). Breast cancer statistics, 2011. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61(6), 409–418. <http://doi.org/10.3322/caac.20134>
- Devadas, S., Zaritskaya, L., Rhee, S. G., Oberley, L., & Williams, M. S. (2002). Discrete generation of superoxide and hydrogen peroxide by T cell receptor stimulation: selective regulation of mitogen-activated protein kinase activation and fas ligand expression. *The Journal of Experimental Medicine*, 195(1), 59–70.

- Dhakshinamoorthy, S., Jain, A. K., Bloom, D. A., & Jaiswal, A. K. (2005). Bach1 competes with Nrf2 leading to negative regulation of the antioxidant response element (ARE)-mediated NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene expression and induction in response to antioxidants. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(17), 16891–16900. <http://doi.org/10.1074/jbc.M500166200>
- Di Stefano, A., Caramori, G., Gnemmi, I., Contoli, M., Vicari, C., Capelli, A., ... Balbi, B. (2009). T helper type 17-related cytokine expression is increased in the bronchial mucosa of stable chronic obstructive pulmonary disease patients. *Clinical and Experimental Immunology*, 157(2), 316–324. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2009.03965.x>
- Didon, L., Barton, J. L., Roos, A. B., Gaschler, G. J., Bauer, C. M. T., Berg, T., ... Nord, M. (2011). Lung epithelial CCAAT/enhancer-binding protein- $\beta$  is necessary for the integrity of inflammatory responses to cigarette smoke. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 184(2), 233–242. <http://doi.org/10.1164/rccm.201007-1113OC>
- Doe, C., Bafadhel, M., Siddiqui, S., Desai, D., Mistry, V., Rugman, P., ... Brightling, C. E. (2010). Expression of the T helper 17-associated cytokines IL-17A and IL-17F in asthma and COPD. *Chest*, 138(5), 1140–1147. <http://doi.org/10.1378/chest.09-3058>
- Dong, C. (2008). IL-23/IL-17 biology and therapeutic considerations. *Journal of Immunotoxicology*, 5(1), 43–46. <http://doi.org/10.1080/15476910801897953>
- Doz, E., Noulin, N., Boichot, E., Guénon, I., Fick, L., Le Bert, M., ... Couillin, I. (2008). Cigarette smoke-induced pulmonary inflammation is TLR4/MyD88 and IL-1R1/MyD88 signaling dependent. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 180(2), 1169–1178.
- Drannik, A. G., Pouladi, M. A., Robbins, C. S., Goncharova, S. I., Kianpour, S., & Stämpfli, M. R. (2004). Impact of cigarette smoke on clearance and inflammation after *Pseudomonas aeruginosa* infection. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 170(11), 1164–1171. <http://doi.org/10.1164/rccm.200311-1521OC>
- Droemann, D., Goldmann, T., Tiedje, T., Zabel, P., Dalhoff, K., & Schaaf, B. (2005). Toll-like receptor 2 expression is decreased on alveolar macrophages in cigarette smokers and COPD patients. *Respiratory Research*, 6, 68. <http://doi.org/10.1186/1465-9921-6-68>
- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82(1), 47–95. <http://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>
- Duan, J., Duan, J., Zhang, Z., & Tong, T. (2005). Irreversible cellular senescence induced by prolonged exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> involves DNA-damage-and-repair genes and telomere shortening. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37(7), 1407–1420. <http://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.01.010>
- Duerr, R. H., Taylor, K. D., Brant, S. R., Rioux, J. D., Silverberg, M. S., Daly, M. J., ... Cho, J. H. (2006). A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science (New York, N.Y.)*, 314(5804), 1461–1463. <http://doi.org/10.1126/science.1135245>
- Duhen, T., Geiger, R., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A., & Sallusto, F. (2009). Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nature Immunology*, 10(8), 857–863. <http://doi.org/10.1038/ni.1767>
- Duprez, L., Wirawan, E., Vanden Berghe, T., & Vandenabeele, P. (2009). Major cell death pathways at a glance. *Microbes and Infection / Institut Pasteur*, 11(13), 1050–1062. <http://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.08.013>

- Durant, L., Watford, W. T., Ramos, H. L., Laurence, A., Vahedi, G., Wei, L., ... O'Shea, J. J. (2010). Diverse targets of the transcription factor STAT3 contribute to T cell pathogenicity and homeostasis. *Immunity*, 32(5), 605–615. <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.05.003>
- Dyer, M. A., & Cepko, C. L. (2001). Regulating proliferation during retinal development. *Nature Reviews. Neuroscience*, 2(5), 333–342. <http://doi.org/10.1038/35072555>
- Ebisuya, M., Kondoh, K., & Nishida, E. (2005). The duration, magnitude and compartmentalization of ERK MAP kinase activity: mechanisms for providing signaling specificity. *Journal of Cell Science*, 118(Pt 14), 2997–3002. <http://doi.org/10.1242/jcs.02505>
- Eddleston, J., Lee, R. U., Doerner, A. M., Herschbach, J., & Zuraw, B. L. (2011). Cigarette smoke decreases innate responses of epithelial cells to rhinovirus infection. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 44(1), 118–126. <http://doi.org/10.1165/rcmb.2009-0266OC>
- Edinger, A. L., & Thompson, C. B. (2004). Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Current Opinion in Cell Biology*, 16(6), 663–669. <http://doi.org/10.1016/j.ceb.2004.09.011>
- Effros, R. B., Dagarag, M., Spaulding, C., & Man, J. (2005). The role of CD8<sup>+</sup> T-cell replicative senescence in human aging. *Immunological Reviews*, 205, 147–157. <http://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2005.00259.x>
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516. <http://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Erb-Downward, J. R., Thompson, D. L., Han, M. K., Freeman, C. M., McCloskey, L., Schmidt, L. A., ... Huffnagle, G. B. (2011). Analysis of the lung microbiome in the “healthy” smoker and in COPD. *PloS One*, 6(2), e16384. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0016384>
- Eruslanov, E., & Kusmartsev, S. (2010). Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 594, 57–72. [http://doi.org/10.1007/978-1-60761-411-1\\_4](http://doi.org/10.1007/978-1-60761-411-1_4)
- Esplugues, E., Huber, S., Gagliani, N., Hauser, A. E., Town, T., Wan, Y. Y., ... Flavell, R. A. (2011). Control of TH17 cells occurs in the small intestine. *Nature*, 475(7357), 514–518. <http://doi.org/10.1038/nature10228>
- Evans, M. D., Dizdaroglu, M., & Cooke, M. S. (2004). Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutation Research*, 567(1), 1–61. <http://doi.org/10.1016/j.mrrev.2003.11.001>
- Eyerich, S., Eyerich, K., Pennino, D., Carbone, T., Nasorri, F., Pallotta, S., ... Cavani, A. (2009). Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(12), 3573–3585. <http://doi.org/10.1172/JCI40202>
- Ezzati, M., Henley, S. J., Thun, M. J., & Lopez, A. D. (2005). Role of smoking in global and regional cardiovascular mortality. *Circulation*, 112(4), 489–497. <http://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.104.521708>
- Ezzati, M., & Lopez, A. D. (2004). Regional, disease specific patterns of smoking-attributable mortality in 2000. *Tobacco Control*, 13(4), 388–395. <http://doi.org/10.1136/tc.2003.005215>
- Fan, F., Jin, S., Amundson, S. A., Tong, T., Fan, W., Zhao, H., ... Zhan, Q. (2002). ATF3 induction following DNA damage is regulated by distinct signaling pathways and over-expression of ATF3 protein suppresses cells growth. *Oncogene*, 21(49), 7488–7496. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1205896>

- Fantini, M. C., Rizzo, A., Fina, D., Caruso, R., Becker, C., Neurath, M. F., ... Monteleone, G. (2007). IL-21 regulates experimental colitis by modulating the balance between Treg and Th17 cells. *European Journal of Immunology*, 37(11), 3155–3163. <http://doi.org/10.1002/eji.200737766>
- Fassbender, M., Gerlitzki, B., Ullrich, N., Lupp, C., Klein, M., Radsak, M. P., ... Schild, H. (2010). Cyclic adenosine monophosphate and IL-10 coordinately contribute to nTreg cell-mediated suppression of dendritic cell activation. *Cellular Immunology*, 265(2), 91–96. <http://doi.org/10.1016/j.cellimm.2010.07.007>
- Fassett, M. S., Jiang, W., D'Alise, A. M., Mathis, D., & Benoist, C. (2012). Nuclear receptor Nr4a1 modulates both regulatory T-cell (Treg) differentiation and clonal deletion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(10), 3891–3896. <http://doi.org/10.1073/pnas.1200090109>
- Feldman, J. G., Minkoff, H., Schneider, M. F., Gange, S. J., Cohen, M., Watts, D. H., ... Anastos, K. (2006). Association of cigarette smoking with HIV prognosis among women in the HAART era: a report from the women's interagency HIV study. *American Journal of Public Health*, 96(6), 1060–1065. <http://doi.org/10.2105/AJPH.2005.062745>
- Ferretti, S., Bonneau, O., Dubois, G. R., Jones, C. E., & Trifilieff, A. (2003). IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 170(4), 2106–2112.
- Ferson, M., Edwards, A., Lind, A., Milton, G. W., & Hersey, P. (1979). Low natural killer-cell activity and immunoglobulin levels associated with smoking in human subjects. *International Journal of Cancer*, 23(5), 603–609.
- Feugate, J. E., Li, Q., Wong, L., & Martins-Green, M. (2002). The cxc chemokine cCAF stimulates differentiation of fibroblasts into myofibroblasts and accelerates wound closure. *The Journal of Cell Biology*, 156(1), 161–172. <http://doi.org/10.1083/jcb.200103062>
- Finkel, T. (1998). Oxygen radicals and signaling. *Current Opinion in Cell Biology*, 10(2), 248–253.
- Fiory, F., Formisano, P., Perruolo, G., & Beguinot, F. (2009). Frontiers: PED/PEA-15, a multifunctional protein controlling cell survival and glucose metabolism. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 297(3), E592–601. <http://doi.org/10.1152/ajpendo.00228.2009>
- Formstecher, E., Ramos, J. W., Fauquet, M., Calderwood, D. A., Hsieh, J. C., Canton, B., ... Chneiweiss, H. (2001). PEA-15 mediates cytoplasmic sequestration of ERK MAP kinase. *Developmental Cell*, 1(2), 239–250.
- Fox, C. J., Hammerman, P. S., & Thompson, C. B. (2005). Fuel feeds function: energy metabolism and the T-cell response. *Nature Reviews. Immunology*, 5(11), 844–852. <http://doi.org/10.1038/nri1710>
- Franchi-Gazzola, R., Visigalli, R., Bussolati, O., Dall'Asta, V., & Gazzola, G. C. (1999). Adaptive increase of amino acid transport system A requires ERK1/2 activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(41), 28922–28928.
- Francisco, L. M., Sage, P. T., & Sharpe, A. H. (2010). The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunological Reviews*, 236, 219–242. <http://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00923.x>
- Frauwirth, K. A., Riley, J. L., Harris, M. H., Parry, R. V., Rathmell, J. C., Plas, D. R., ... Thompson, C. B. (2002). The CD28 signaling pathway regulates glucose metabolism. *Immunity*, 16(6), 769–777.

- Frejaville, C., Karoui, H., Tuccio, B., Le Moigne, F., Culcasi, M., Pietri, S., ... 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. *Journal of Medicinal Chemistry*, 38(2), 258–265.
- Freund, A., Laberge, R.-M., Demaria, M., & Campisi, J. (2012). Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker. *Molecular Biology of the Cell*, 23(11), 2066–2075. <http://doi.org/10.1091/mbc.E11-10-0884>
- Frossi, B., De Carli, M., Piemonte, M., & Pucillo, C. (2008). Oxidative microenvironment exerts an opposite regulatory effect on cytokine production by Th1 and Th2 cells. *Molecular Immunology*, 45(1), 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2007.05.008>
- Fu, X., Shi, H., Qi, Y., Zhang, W., & Dong, P. (2015). M2 polarized macrophages induced by CSE promote proliferation, migration, and invasion of alveolar basal epithelial cells. *International Immunopharmacology*, 28(1), 666–674. <http://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.07.033>
- Fukuda, M., Gotoh, Y., & Nishida, E. (1997). Interaction of MAP kinase with MAP kinase kinase: its possible role in the control of nucleocytoplasmic transport of MAP kinase. *The EMBO Journal*, 16(8), 1901–1908. <http://doi.org/10.1093/emboj/16.8.1901>
- Gaboriau-Routhiau, V., Rakotobe, S., Lécuyer, E., Mulder, I., Lan, A., Bridonneau, C., ... Cerf-Bensussan, N. (2009). The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. *Immunity*, 31(4), 677–689. <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.08.020>
- Gambineri, E., Torgerson, T. R., & Ochs, H. D. (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. *Current Opinion in Rheumatology*, 15(4), 430–435.
- Game, D. S., Rogers, N. J., & Lechler, R. I. (2005). Acquisition of HLA-DR and costimulatory molecules by T cells from allogeneic antigen presenting cells. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 5(7), 1614–1625. <http://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2005.00916.x>
- Gandini, S., Botteri, E., Iodice, S., Boniol, M., Lowenfels, A. B., Maisonneuve, P., & Boyle, P. (2008). Tobacco smoking and cancer: a meta-analysis. *International Journal of Cancer*, 122(1), 155–164. <http://doi.org/10.1002/ijc.23033>
- Gasch, M., Goroll, T., Bauer, M., Hinz, D., Schütze, N., Polte, T., ... Herberth, G. (2014). Generation of IL-8 and IL-9 producing CD4<sup>+</sup> T cells is affected by Th17 polarizing conditions and AHR ligands. *Mediators of Inflammation*, 2014, 182549. <http://doi.org/10.1155/2014/182549>
- Gaublomme, J. T., Yosef, N., Lee, Y., Gertner, R. S., Yang, L. V., Wu, C., ... Regev, A. (2015). Single-Cell Genomics Unveils Critical Regulators of Th17 Cell Pathogenicity. *Cell*, 163(6), 1400–1412. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2015.11.009>
- Gaumont-Leclerc, M.-F., Mukhopadhyay, U. K., Goumard, S., & Ferbeyre, G. (2004). PEA-15 is inhibited by adenovirus E1A and plays a role in ERK nuclear export and Ras-induced senescence. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(45), 46802–46809. <http://doi.org/10.1074/jbc.M403893200>
- Gaweska, H., & Fitzpatrick, P. F. (2011). Structures and Mechanism of the Monoamine Oxidase Family. *Biomolecular Concepts*, 2(5), 365–377. <http://doi.org/10.1515/BMC.2011.030>

- Geng, Y., Savage, S. M., Razani-Boroujerdi, S., & Sopori, M. L. (1996). Effects of nicotine on the immune response. II. Chronic nicotine treatment induces T cell anergy. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 156(7), 2384–2390.
- Gergalova, G., Lykhmus, O., Kalashnyk, O., Koval, L., Chernyshov, V., Kryukova, E., ... Skok, M. (2012). Mitochondria express  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors to regulate  $\text{Ca}^{2+}$  accumulation and cytochrome c release: study on isolated mitochondria. *PloS One*, 7(2), e31361. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0031361>
- Gerriets, V. A., Kishton, R. J., Nichols, A. G., Macintyre, A. N., Inoue, M., Ilkayeva, O., ... Rathmell, J. C. (2015). Metabolic programming and PDHK1 control  $\text{CD4}^{+}$  T cell subsets and inflammation. *The Journal of Clinical Investigation*, 125(1), 194–207. <http://doi.org/10.1172/JCI76012>
- Gett, A. V., & Hodgkin, P. D. (1998). Cell division regulates the T cell cytokine repertoire, revealing a mechanism underlying immune class regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(16), 9488–9493.
- Ghoreschi, K., Laurence, A., Yang, X.-P., Tato, C. M., McGeachy, M. J., Konkel, J. E., ... O'Shea, J. J. (2010). Generation of pathogenic  $\text{T(H)}17$  cells in the absence of  $\text{TGF-}\beta$  signalling. *Nature*, 467(7318), 967–971. <http://doi.org/10.1038/nature09447>
- Ghosh, S., Basu, M., & Roy, S. S. (2012). ETS-1 protein regulates vascular endothelial growth factor-induced matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-13 expression in human ovarian carcinoma cell line SKOV-3. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(18), 15001–15015. <http://doi.org/10.1074/jbc.M111.284034>
- Gibbons, D., Fleming, P., Virasami, A., Michel, M.-L., Sebire, N. J., Costeloe, K., ... Hayday, A. (2014). Interleukin-8 (CXCL8) production is a signatory T cell effector function of human newborn infants. *Nature Medicine*, 20(10), 1206–1210. <http://doi.org/10.1038/nm.3670>
- Gil, J., & Peters, G. (2006). Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 7(9), 667–677. <http://doi.org/10.1038/nrm1987>
- Glader, P., Möller, S., Lilja, J., Wieslander, E., Löfdahl, C.-G., & von Wachenfeldt, K. (2006). Cigarette smoke extract modulates respiratory defence mechanisms through effects on T-cells and airway epithelial cells. *Respiratory Medicine*, 100(5), 818–827. <http://doi.org/10.1016/j.rmed.2005.09.008>
- Godfrey, W. R., Ge, Y. G., Spoden, D. J., Levine, B. L., June, C. H., Blazar, B. R., & Porter, S. B. (2004). In vitro-expanded human  $\text{CD4}^{+}\text{CD25}^{+}$  T-regulatory cells can markedly inhibit allogeneic dendritic cell-stimulated MLR cultures. *Blood*, 104(2), 453–461. <http://doi.org/10.1182/blood-2004-01-0151>
- Gomes, A., Fernandes, E., & Lima, J. L. F. C. (2005). Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 65(2–3), 45–80. <http://doi.org/10.1016/j.jbbm.2005.10.003>
- Gomez-Rodriguez, J., Wohlfert, E. A., Handon, R., Meylan, F., Wu, J. Z., Anderson, S. M., ... Schwartzberg, P. L. (2014). Itk-mediated integration of T cell receptor and cytokine signaling regulates the balance between  $\text{Th}17$  and regulatory T cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 211(3), 529–543. <http://doi.org/10.1084/jem.20131459>
- Gondek, D. C., Lu, L.-F., Quezada, S. A., Sakaguchi, S., & Noelle, R. J. (2005). Cutting edge: contact-mediated suppression by  $\text{CD4}^{+}\text{CD25}^{+}$  regulatory cells involves a granzyme B-

- dependent, perforin-independent mechanism. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 174(4), 1783–1786.
- Goplen, N., Karim, Z., Guo, L., Zhuang, Y., Huang, H., Gorska, M. M., ... Alam, R. (2012). ERK1 is important for Th2 differentiation and development of experimental asthma. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 26(5), 1934–1945. <http://doi.org/10.1096/fj.11-196477>
- Gordin, F. M., Roediger, M. P., Girard, P.-M., Lundgren, J. D., Miro, J. M., Palfreeman, A., ... Slater, L. N. (2008). Pneumonia in HIV-infected persons: increased risk with cigarette smoking and treatment interruption. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 178(6), 630–636. <http://doi.org/10.1164/rccm.200804-617OC>
- Goronzy, J. J., Li, G., Yu, M., & Weyand, C. M. (2012). Signaling pathways in aged T cells - a reflection of T cell differentiation, cell senescence and host environment. *Seminars in Immunology*, 24(5), 365–372. <http://doi.org/10.1016/j.smim.2012.04.003>
- Goven, D., Boutten, A., Leçon-Malas, V., Marchal-Sommé, J., Amara, N., Crestani, B., ... Bonay, M. (2008). Altered Nrf2/Keap1-Bach1 equilibrium in pulmonary emphysema. *Thorax*, 63(10), 916–924. <http://doi.org/10.1136/thx.2007.091181>
- Graham, K. A., Kulawiec, M., Owens, K. M., Li, X., Desouki, M. M., Chandra, D., & Singh, K. K. (2010). NADPH oxidase 4 is an oncoprotein localized to mitochondria. *Cancer Biology & Therapy*, 10(3), 223–231. <http://doi.org/10.4161/cbt.10.3.12207>
- Griendling, K. K., Sorescu, D., & Ushio-Fukai, M. (2000). NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circulation Research*, 86(5), 494–501.
- Griendling, K. K., Touyz, R. M., Zweier, J. L., Dikalov, S., Chilian, W., Chen, Y.-R., ... American Heart Association Council on Basic Cardiovascular Sciences. (2016). Measurement of Reactive Oxygen Species, Reactive Nitrogen Species, and Redox-Dependent Signaling in the Cardiovascular System: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation Research*, 119(5), e39-75. <http://doi.org/10.1161/RES.0000000000000110>
- Griffin, J. D., Spertini, O., Ernst, T. J., Belvin, M. P., Levine, H. B., Kanakura, Y., & Tedder, T. F. (1990). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other cytokines regulate surface expression of the leukocyte adhesion molecule-1 on human neutrophils, monocytes, and their precursors. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 145(2), 576–584.
- Griffith, C. E., Zhang, W., & Wange, R. L. (1998). ZAP-70-dependent and -independent activation of Erk in Jurkat T cells. Differences in signaling induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Cd3 cross-linking. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(17), 10771–10776.
- Griffiths, H. R., Dunston, C. R., Bennett, S. J., Grant, M. M., Phillips, D. C., & Kitas, G. D. (2011). Free radicals and redox signalling in T-cells during chronic inflammation and ageing. *Biochemical Society Transactions*, 39(5), 1273–1278. <http://doi.org/10.1042/BST0391273>
- Grigg, J., Walters, H., Sohal, S. S., Wood-Baker, R., Reid, D. W., Xu, C.-B., ... Mushtaq, N. (2012). Cigarette smoke and platelet-activating factor receptor dependent adhesion of *Streptococcus pneumoniae* to lower airway cells. *Thorax*, 67(10), 908–913. <http://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2011-200835>
- Groemping, Y., & Rittinger, K. (2005). Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *The Biochemical Journal*, 386(Pt 3), 401–416. <http://doi.org/10.1042/BJ20041835>
- Grossman, W. J., Verbsky, J. W., Barchet, W., Colonna, M., Atkinson, J. P., & Ley, T. J. (2004). Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity*, 21(4), 589–601. <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.09.002>

- Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J. E., & Roncarolo, M. G. (1997). A CD4<sup>+</sup> T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*, 389(6652), 737–742. <http://doi.org/10.1038/39614>
- Gudmundsdottir, H., Wells, A. D., & Turka, L. A. (1999). Dynamics and requirements of T cell clonal expansion in vivo at the single-cell level: effector function is linked to proliferative capacity. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 162(9), 5212–5223.
- Guicciardi, M. E., Leist, M., & Gores, G. J. (2004). Lysosomes in cell death. *Oncogene*, 23(16), 2881–2890. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1207512>
- Guichard, C., Moreau, R., Pessayre, D., Epperson, T. K., & Krause, K.-H. (2008). NOX family NADPH oxidases in liver and in pancreatic islets: a role in the metabolic syndrome and diabetes? *Biochemical Society Transactions*, 36(Pt 5), 920–929. <http://doi.org/10.1042/BST0360920>
- Guillot-Delost, M., Le Gouvello, S., Mesel-Lemoine, M., Cheraï, M., Baillou, C., Simon, A., ... Lemoine, F. M. (2012). Human CD90 identifies Th17/Tc17 T cell subsets that are depleted in HIV-infected patients. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 188(3), 981–991. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.1101592>
- Gustafsson, A., Asman, B., & Bergström, K. (2000). Cigarette smoking as an aggravating factor in inflammatory tissue-destructive diseases. Increase in tumor necrosis Factor-alpha priming of peripheral neutrophils measured as generation of oxygen radicals. *International Journal of Clinical & Laboratory Research*, 30(4), 187–190.
- Gutteridge, J. M. (1994). Hydroxyl radicals, iron, oxidative stress, and neurodegeneration. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 738, 201–213.
- Guyton, K. Z., Liu, Y., Gorospe, M., Xu, Q., & Holbrook, N. J. (1996). Activation of mitogen-activated protein kinase by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Role in cell survival following oxidant injury. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(8), 4138–4142.
- Habib, T., Senadheera, S., Weinberg, K., & Kaushansky, K. (2002). The common gamma chain (gamma c) is a required signaling component of the IL-21 receptor and supports IL-21-induced cell proliferation via JAK3. *Biochemistry*, 41(27), 8725–8731.
- Hagiwara, E., Takahashi, K. I., Okubo, T., Ohno, S., Ueda, A., Aoki, A., ... Ishigatsubo, Y. (2001). Cigarette smoking depletes cells spontaneously secreting Th(1) cytokines in the human airway. *Cytokine*, 14(2), 121–126. <http://doi.org/10.1006/cyto.2001.0860>
- Halliwell, B., Zhao, K., & Whiteman, M. (1999). Nitric oxide and peroxynitrite. The ugly, the uglier and the not so good: a personal view of recent controversies. *Free Radical Research*, 31(6), 651–669.
- Hamdi, M., Popeijus, H. E., Carlotti, F., Janssen, J. M., van der Burgt, C., Cornelissen-Steijger, P., ... van Dam, H. (2008). ATF3 and Fra1 have opposite functions in JNK- and ERK-dependent DNA damage responses. *DNA Repair*, 7(3), 487–496. <http://doi.org/10.1016/j.dnarep.2007.12.004>
- Han, D., Canali, R., Rettori, D., & Kaplowitz, N. (2003). Effect of glutathione depletion on sites and topology of superoxide and hydrogen peroxide production in mitochondria. *Molecular Pharmacology*, 64(5), 1136–1144. <http://doi.org/10.1124/mol.64.5.1136>
- Han, J., Tsukada, Y., Hara, E., Kitamura, N., & Tanaka, T. (2005). Hepatocyte growth factor induces redistribution of p21(CIP1) and p27(KIP1) through ERK-dependent p16(INK4a) up-regulation, leading to cell cycle arrest at G1 in HepG2 hepatoma cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(36), 31548–31556. <http://doi.org/10.1074/jbc.M503431200>

- Hang, B. (2010). Formation and repair of tobacco carcinogen-derived bulky DNA adducts. *Journal of Nucleic Acids*, 2010, 709521. <http://doi.org/10.4061/2010/709521>
- Hansen, E. R., Vejlsgaard, G. L., Lisby, S., Heidenheim, M., & Baadsgaard, O. (1991). Epidermal interleukin 1 alpha functional activity and interleukin 8 immunoreactivity are increased in patients with cutaneous T-cell lymphoma. *The Journal of Investigative Dermatology*, 97(5), 818–823.
- Hansford, R. G., Hogue, B. A., & Mildaziene, V. (1997). Dependence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 29(1), 89–95.
- Happel, K. I., Dubin, P. J., Zheng, M., Ghilardi, N., Lockhart, C., Quinton, L. J., ... Kolls, J. K. (2005). Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against *Klebsiella pneumoniae*. *The Journal of Experimental Medicine*, 202(6), 761–769. <http://doi.org/10.1084/jem.20050193>
- Hara, H., Araya, J., Ito, S., Kobayashi, K., Takasaka, N., Yoshii, Y., ... Kuwano, K. (2013). Mitochondrial fragmentation in cigarette smoke-induced bronchial epithelial cell senescence. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 305(10), L737–746. <http://doi.org/10.1152/ajplung.00146.2013>
- Harju, T., Kaarteenaho-Wiik, R., Sirviö, R., Pääkkö, P., Crapo, J. D., Oury, T. D., ... Kinnula, V. L. (2004). Manganese superoxide dismutase is increased in the airways of smokers' lungs. *The European Respiratory Journal*, 24(5), 765–771. <http://doi.org/10.1183/09031936.04.00121203>
- Harrington, L. E., Hatton, R. D., Mangan, P. R., Turner, H., Murphy, T. L., Murphy, K. M., & Weaver, C. T. (2005). Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature Immunology*, 6(11), 1123–1132. <http://doi.org/10.1038/ni1254>
- Harrison, O. J., Foley, J., Bolognese, B. J., Long, E., Podolin, P. L., & Walsh, P. T. (2008). Airway infiltration of CD4<sup>+</sup> CCR6<sup>+</sup> Th17 type cells associated with chronic cigarette smoke induced airspace enlargement. *Immunology Letters*, 121(1), 13–21. <http://doi.org/10.1016/j.imlet.2008.07.011>
- Harrison, R. (2002). Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radical Biology & Medicine*, 33(6), 774–797.
- Hasnis, E., Bar-Shai, M., Burbea, Z., & Reznick, A. Z. (2007). Mechanisms underlying cigarette smoke-induced NF-kappaB activation in human lymphocytes: the role of reactive nitrogen species. *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society*, 58 Suppl 5(Pt 1), 275–287.
- He, S., Fei, M., Wu, Y., Zheng, D., Wan, D., Wang, L., & Li, D. (2011). Distribution and clinical significance of Th17 cells in the tumor microenvironment and peripheral blood of pancreatic cancer patients. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(11), 7424–7437. <http://doi.org/10.3390/ijms12117424>
- Hecht, S. S. (2003). Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 3(10), 733–744. <http://doi.org/10.1038/nrc1190>
- Hellermann, G. R., Nagy, S. B., Kong, X., Lockey, R. F., & Mohapatra, S. S. (2002). Mechanism of cigarette smoke condensate-induced acute inflammatory response in human bronchial epithelial cells. *Respiratory Research*, 3, 22.
- Henson, S. M., Lanna, A., Riddell, N. E., Franzese, O., Macaulay, R., Griffiths, S. J., ... Akbar, A. N. (2014). p38 signaling inhibits mTORC1-independent autophagy in senescent human CD8<sup>+</sup>

- T cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 124(9), 4004–4016. <http://doi.org/10.1172/JCI75051>
- Hernán, M. A., Jick, S. S., Logroscino, G., Olek, M. J., Ascherio, A., & Jick, H. (2005). Cigarette smoking and the progression of multiple sclerosis. *Brain: A Journal of Neurology*, 128(Pt 6), 1461–1465. <http://doi.org/10.1093/brain/awh471>
- Hernandez, C. P., Morrow, K., Velasco, C., Wyczechowska, D. D., Naura, A. S., & Rodriguez, P. C. (2013). Effects of cigarette smoke extract on primary activated T cells. *Cellular Immunology*, 282(1), 38–43. <http://doi.org/10.1016/j.cellimm.2013.04.005>
- Hilty, M., Burke, C., Pedro, H., Cardenas, P., Bush, A., Bossley, C., ... Cookson, W. O. C. (2010). Disordered microbial communities in asthmatic airways. *PloS One*, 5(1), e8578. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0008578>
- Himmel, M. E., Crome, S. Q., Ivison, S., Piccirillo, C., Steiner, T. S., & Levings, M. K. (2011). Human CD4<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells produce CXCL8 and recruit neutrophils. *European Journal of Immunology*, 41(2), 306–312. <http://doi.org/10.1002/eji.201040459>
- Hirahara, K., Ghoreschi, K., Laurence, A., Yang, X.-P., Kanno, Y., & O'Shea, J. J. (2010). Signal transduction pathways and transcriptional regulation in Th17 cell differentiation. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 21(6), 425–434. <http://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2010.10.006>
- Hirota, K., Yoshitomi, H., Hashimoto, M., Maeda, S., Teradaira, S., Sugimoto, N., ... Sakaguchi, S. (2007). Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(12), 2803–2812. <http://doi.org/10.1084/jem.20071397>
- Ho, I.-C., Tai, T.-S., & Pai, S.-Y. (2009). GATA3 and the T-cell lineage: essential functions before and after T-helper-2-cell differentiation. *Nature Reviews. Immunology*, 9(2), 125–135. <http://doi.org/10.1038/nri2476>
- Hodge, G., Mukaro, V., Reynolds, P. N., & Hodge, S. (2011). Role of increased CD8/CD28(null) T cells and alternative co-stimulatory molecules in chronic obstructive pulmonary disease. *Clinical and Experimental Immunology*, 166(1), 94–102. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2011.04455.x>
- Hodge, S., Hodge, G., Holmes, M., & Reynolds, P. N. (2005). Increased airway epithelial and T-cell apoptosis in COPD remains despite smoking cessation. *The European Respiratory Journal*, 25(3), 447–454. <http://doi.org/10.1183/09031936.05.00077604>
- Hoffmann, D., Djordjevic, M. V., & Hoffmann, I. (1997). The changing cigarette. *Preventive Medicine*, 26(4), 427–434. <http://doi.org/10.1006/pmed.1997.0183>
- Hogg, J. C. (2004). Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet (London, England)*, 364(9435), 709–721. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16900-6](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16900-6)
- Holbrook, N. J., & Ikeyama, S. (2002). Age-related decline in cellular response to oxidative stress: links to growth factor signaling pathways with common defects. *Biochemical Pharmacology*, 64(5–6), 999–1005.
- Holt, P. G., & Keast, D. (1977). Environmentally induced changes in immunological function: acute and chronic effects of inhalation of tobacco smoke and other atmospheric contaminants in man and experimental animals. *Bacteriological Reviews*, 41(1), 205–216.
- Holz, O., Zühlke, I., Jaksztat, E., Müller, K. C., Welker, L., Nakashima, M., ... Jörres, R. A. (2004). Lung fibroblasts from patients with emphysema show a reduced proliferation rate in culture.

- Hool, L. C. (2006). Reactive oxygen species in cardiac signalling: from mitochondria to plasma membrane ion channels. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 33(1–2), 146–151. <http://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2006.04341.x>
- Hör, S., Pirzer, H., Dumoutier, L., Bauer, F., Wittmann, S., Sticht, H., ... Fickenscher, H. (2004). The T-cell lymphokine interleukin-26 targets epithelial cells through the interleukin-20 receptor 1 and interleukin-10 receptor 2 chains. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(32), 33343–33351. <http://doi.org/10.1074/jbc.M405000200>
- Horejsí, V., Zhang, W., & Schraven, B. (2004). Transmembrane adaptor proteins: organizers of immunoreceptor signalling. *Nature Reviews. Immunology*, 4(8), 603–616. <http://doi.org/10.1038/nri1414>
- Hori, S., Takahashi, T., & Sakaguchi, S. (2003). Control of autoimmunity by naturally arising regulatory CD4<sup>+</sup> T cells. *Advances in Immunology*, 81, 331–371.
- Hörig, H., Spagnoli, G. C., Filgueira, L., Babst, R., Gallati, H., Harder, F., ... Heberer, M. (1993). Exogenous glutamine requirement is confined to late events of T cell activation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 53(4), 343–351. <http://doi.org/10.1002/jcb.240530412>
- Horiuchi, T., Mitoma, H., Harashima, S., Tsukamoto, H., & Shimoda, T. (2010). Transmembrane TNF- $\alpha$ : structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology (Oxford, England)*, 49(7), 1215–1228. <http://doi.org/10.1093/rheumatology/keq031>
- Hoshino, Y., Mio, T., Nagai, S., Miki, H., Ito, I., & Izumi, T. (2001). Cytotoxic effects of cigarette smoke extract on an alveolar type II cell-derived cell line. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 281(2), L509–516.
- Hosokawa, H., Kato, M., Tohyama, H., Tamaki, Y., Endo, Y., Kimura, M. Y., ... Nakayama, T. (2015). Methylation of Gata3 protein at Arg-261 regulates transactivation of the Il5 gene in T helper 2 cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(21), 13095–13103. <http://doi.org/10.1074/jbc.M114.621524>
- Houben, J. M. J., Mercken, E. M., Ketelslegers, H. B., Bast, A., Wouters, E. F., Hageman, G. J., & Schols, A. M. W. J. (2009). Telomere shortening in chronic obstructive pulmonary disease. *Respiratory Medicine*, 103(2), 230–236. <http://doi.org/10.1016/j.rmed.2008.09.003>
- Huang, C.-T., Workman, C. J., Flies, D., Pan, X., Marson, A. L., Zhou, G., ... Vignali, D. A. A. (2004). Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity*, 21(4), 503–513. <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.08.010>
- Huang, H. C., Nguyen, T., & Pickett, C. B. (2000). Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(23), 12475–12480. <http://doi.org/10.1073/pnas.220418997>
- Hudy, M. H., Traves, S. L., Wiehler, S., & Proud, D. (2010). Cigarette smoke modulates rhinovirus-induced airway epithelial cell chemokine production. *The European Respiratory Journal*, 35(6), 1256–1263. <http://doi.org/10.1183/09031936.00128809>
- Infante-Duarte, C., Horton, H. F., Byrne, M. C., & Kamradt, T. (2000). Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 165(11), 6107–6115.

- 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. *The European Respiratory Journal*, 33(1), 61–67. <http://doi.org/10.1183/09031936.00145307>
- Ishizu, T., Osoegawa, M., Mei, F.-J., Kikuchi, H., Tanaka, M., Takakura, Y., ... Kira, J. (2005). Intrathecal activation of the IL-17/IL-8 axis in optico-spinal multiple sclerosis. *Brain: A Journal of Neurology*, 128(Pt 5), 988–1002. <http://doi.org/10.1093/brain/awh453>
- Ivanov, I. I., Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E. L., Shima, T., Karaoz, U., ... Littman, D. R. (2009). Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell*, 139(3), 485–498. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.033>
- Ivanov, I. I., & Manel, N. (2010). [Induction of gut mucosal Th17 cells by segmented filamentous bacteria]. *Médecine Sciences: M/S*, 26(4), 352–355. <http://doi.org/10.1051/medsci/2010264352>
- Ivanov, I. I., McKenzie, B. S., Zhou, L., Tadokoro, C. E., Lepelley, A., Lafaille, J. J., ... Littman, D. R. (2006). The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17<sup>+</sup> T helper cells. *Cell*, 126(6), 1121–1133. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.035>
- Iwamoto, N., D'Alessandro, L. A., Depner, S., Hahn, B., Kramer, B. A., Lucarelli, P., ... Schilling, M. (2016). Context-specific flow through the MEK/ERK module produces cell- and ligand-specific patterns of ERK single and double phosphorylation. *Science Signaling*, 9(413), ra13. <http://doi.org/10.1126/scisignal.aab1967>
- Iwasaki, A., & Kelsall, B. L. (2000). Localization of distinct Peyer's patch dendritic cell subsets and their recruitment by chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-3 $\alpha$ , MIP-3 $\beta$ , and secondary lymphoid organ chemokine. *The Journal of Experimental Medicine*, 191(8), 1381–1394.
- Jackson, S. H., Devadas, S., Kwon, J., Pinto, L. A., & Williams, M. S. (2004). T cells express a phagocyte-type NADPH oxidase that is activated after T cell receptor stimulation. *Nature Immunology*, 5(8), 818–827. <http://doi.org/10.1038/ni1096>
- Jacques, D., Jean-Louis, B., & Dominique, B.-R. (2007). *Radicaux libres et stress oxydant: Aspects biologiques et pathologiques (broché)*. Lavoisier.
- Jaimes, E. A., DeMaster, E. G., Tian, R.-X., & Raij, L. (2004). Stable compounds of cigarette smoke induce endothelial superoxide anion production via NADPH oxidase activation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 24(6), 1031–1036. <http://doi.org/10.1161/01.ATV.0000127083.88549.58>
- Jain, A. K., & Jaiswal, A. K. (2007). GSK-3 $\beta$  acts upstream of Fyn kinase in regulation of nuclear export and degradation of NF-E2 related factor 2. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(22), 16502–16510. <http://doi.org/10.1074/jbc.M611336200>
- Janardhan, S. V., Praveen, K., Marks, R., & Gajewski, T. F. (2011). Evidence implicating the Ras pathway in multiple CD28 costimulatory functions in CD4<sup>+</sup> T cells. *PloS One*, 6(9), e24931. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0024931>
- Jemal, A., Thun, M. J., Ries, L. A. G., Howe, H. L., Weir, H. K., Center, M. M., ... Edwards, B. K. (2008). Annual report to the nation on the status of cancer, 1975–2005, featuring trends in lung cancer, tobacco use, and tobacco control. *Journal of the National Cancer Institute*, 100(23), 1672–1694. <http://doi.org/10.1093/jnci/djn389>
- Jia, L., Liu, Z., Sun, L., Miller, S. S., Ames, B. N., Cotman, C. W., & Liu, J. (2007). Acrolein, a toxicant in cigarette smoke, causes oxidative damage and mitochondrial dysfunction in RPE

cells: protection by (R)-alpha-lipoic acid. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 48(1), 339–348. <http://doi.org/10.1167/iovs.06-0248>

- Jianjun Yang, null, Zhang, R., Lu, G., Shen, Y., Peng, L., Zhu, C., ... Xiong, H. (2013). T cell–derived inducible nitric oxide synthase switches off Th17 cell differentiation. *The Journal of Experimental Medicine*, 210(7), 1447–1462. <http://doi.org/10.1084/jem.20122494>
- Jorritsma, P. J., Brogdon, J. L., & Bottomly, K. (2003). Role of TCR-induced extracellular signal-regulated kinase activation in the regulation of early IL-4 expression in naive CD4<sup>+</sup> T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 170(5), 2427–2434.
- Joshi, N. S., Cui, W., Chandele, A., Lee, H. K., Urso, D. R., Hagman, J., ... Kaech, S. M. (2007). Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8(+) T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor. *Immunity*, 27(2), 281–295. <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.07.010>
- 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 Radical Biology & Medicine*, 25(1), 104–112.
- Kalinski, P. « Regulation of Immune Responses by Prostaglandin E2 ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 188, n° 1 (2012): 21-28. doi:10.4049/jimmunol.1101029.
- Kalra, R., Singh, S. P., Pena-Philippides, J. C., Langley, R. J., Razani-Boroujerdi, S., & Sopori, M. L. (2004). Immunosuppressive and anti-inflammatory effects of nicotine administered by patch in an animal model. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 11(3), 563–568. <http://doi.org/10.1128/CDLI.11.3.563-568.2004>
- Kalra, R., Singh, S. P., Savage, S. M., Finch, G. L., & Sopori, M. L. (2000). Effects of cigarette smoke on immune response: chronic exposure to cigarette smoke impairs antigen-mediated signaling in T cells and depletes IP3-sensitive Ca(2+) stores. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 293(1), 166–171.
- Kalyanaraman, B., Darley-USmar, V., Davies, K. J. A., Dennerly, P. A., Forman, H. J., Grisham, M. B., ... Ischiropoulos, H. (2012). Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radical Biology & Medicine*, 52(1), 1–6. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.030>
- Kamal-Eldin, A., & Appelqvist, L. A. (1996). The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, 31(7), 671–701.
- Kaminski, M., Kiessling, M., Süß, D., Krammer, P. H., & Gülow, K. (2007). Novel role for mitochondria: protein kinase C-theta-dependent oxidative signaling organelles in activation-induced T-cell death. *Molecular and Cellular Biology*, 27(10), 3625–3639. <http://doi.org/10.1128/MCB.02295-06>
- Kaminski, M. M., Sauer, S. W., Klemke, C.-D., Süß, D., Okun, J. G., Krammer, P. H., & Gülow, K. (2010). Mitochondrial reactive oxygen species control T cell activation by regulating IL-2 and IL-4 expression: mechanism of ciprofloxacin-mediated immunosuppression. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 184(9), 4827–4841. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901662>
- Kamiński, M. M., Sauer, S. W., Kamiński, M., Opp, S., Ruppert, T., Grigaravičius, P., ... Gülow, K. (2012). T cell activation is driven by an ADP-dependent glucokinase linking enhanced glycolysis with mitochondrial reactive oxygen species generation. *Cell Reports*, 2(5), 1300–1315. <http://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.10.009>

- Kang, S. W., Rhee, S. G., Chang, T.-S., Jeong, W., & Choi, M. H. (2005). 2-Cys peroxiredoxin function in intracellular signal transduction: therapeutic implications. *Trends in Molecular Medicine*, 11(12), 571–578. <http://doi.org/10.1016/j.molmed.2005.10.006>
- Kaplon, J., Zheng, L., Meissl, K., Chaneton, B., Selivanov, V. A., Mackay, G., ... Peeper, D. S. (2013). A key role for mitochondrial gatekeeper pyruvate dehydrogenase in oncogene-induced senescence. *Nature*, 498(7452), 109–112. <http://doi.org/10.1038/nature12154>
- Karlsson, M., Mathers, J., Dickinson, R. J., Mandl, M., & Keyse, S. M. (2004). Both nuclear-cytoplasmic shuttling of the dual specificity phosphatase MKP-3 and its ability to anchor MAP kinase in the cytoplasm are mediated by a conserved nuclear export signal. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(40), 41882–41891. <http://doi.org/10.1074/jbc.M406720200>
- Karlsson, M., Kurz, T., Brunk, U. T., Nilsson, S. E., & Frennesson, C. I. (2010). What does the commonly used DCF test for oxidative stress really show? *The Biochemical Journal*, 428(2), 183–190. <http://doi.org/10.1042/BJ20100208>
- Kastelein, R. A., Hunter, C. A., & Cua, D. J. (2007). Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation. *Annual Review of Immunology*, 25, 221–242. <http://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104758>
- Kawachi, I., Colditz, G. A., Speizer, F. E., Manson, J. E., Stampfer, M. J., Willett, W. C., & Hennekens, C. H. (1997). A prospective study of passive smoking and coronary heart disease. *Circulation*, 95(10), 2374–2379.
- Kawachi, I., Colditz, G. A., Stampfer, M. J., Willett, W. C., Manson, J. E., Rosner, B., ... Hennekens, C. H. (1994). Smoking cessation and time course of decreased risks of coronary heart disease in middle-aged women. *Archives of Internal Medicine*, 154(2), 169–175.
- Kerbrat, S., Vingert, B., Junier, M.-P., Castellano, F., Renault-Mihara, F., Dos Reis Tavares, S., ... Le Gouvello, S. (2015). Absence of the Adaptor Protein PEA-15 Is Associated with Altered Pattern of Th Cytokines Production by Activated CD4<sup>+</sup> T Lymphocytes In Vitro, and Defective Red Blood Cell Alloimmune Response In Vivo. *PloS One*, 10(8), e0136885. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0136885>
- Kesarwani, P., Murali, A. K., Al-Khami, A. A., & Mehrotra, S. (2013). Redox Regulation of T-Cell Function: From Molecular Mechanisms to Significance in Human Health and Disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(12), 1497. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4073>
- Kesselring, R., Thiel, A., Pries, R., Trenkle, T., & Wollenberg, B. (2010). Human Th17 cells can be induced through head and neck cancer and have a functional impact on HNSCC development. *British Journal of Cancer*, 103(8), 1245–1254. <http://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605891>
- Khader, S. A., Bell, G. K., Pearl, J. E., Fountain, J. J., Rangel-Moreno, J., Cilley, G. E., ... Cooper, A. M. (2007). IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4<sup>+</sup> T cell responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis challenge. *Nature Immunology*, 8(4), 369–377. <http://doi.org/10.1038/ni1449>
- Khayat, Z. A., Tsakiridis, T., Ueyama, A., Somwar, R., Ebina, Y., & Klip, A. (1998). Rapid stimulation of glucose transport by mitochondrial uncoupling depends in part on cytosolic Ca<sup>2+</sup> and cPKC. *The American Journal of Physiology*, 275(6 Pt 1), C1487-1497.
- Kikly, K., Liu, L., Na, S., & Sedgwick, J. D. (2006). The IL-23/Th(17) axis: therapeutic targets for autoimmune inflammation. *Current Opinion in Immunology*, 18(6), 670–675. <http://doi.org/10.1016/j.coi.2006.09.008>
- Kim, C., Kim, J.-Y., & Kim, J.-H. (2008). Cytosolic phospholipase A(2), lipoxygenase metabolites, and reactive oxygen species. *BMB Reports*, 41(8), 555–559.

- Kim, H. P., Wang, X., Chen, Z.-H., Lee, S.-J., Huang, M.-H., Wang, Y., ... Choi, A. M. K. (2008). Autophagic proteins regulate cigarette smoke-induced apoptosis: protective role of heme oxygenase-1. *Autophagy*, 4(7), 887–895.
- Kim, H. S., Kang, S. W., Rhee, S. G., & Clerch, L. B. (2001). Rat lung peroxiredoxins I and II are differentially regulated during development and by hyperoxia. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 280(6), L1212–L1217.
- Kim, H.-J., & Nel, A. E. (2005). The role of phase II antioxidant enzymes in protecting memory T cells from spontaneous apoptosis in young and old mice. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 175(5), 2948–2959.
- Kim, J. S., Sklarz, T., Banks, L. B., Gohil, M., Waickman, A. T., Skuli, N., ... Koretzky, G. A. (2013). Natural and inducible TH17 cells are regulated differently by Akt and mTOR pathways. *Nature Immunology*, 14(6), 611–618. <http://doi.org/10.1038/ni.2607>
- King, T. E., Savici, D., & Campbell, P. A. (1988). Phagocytosis and killing of *Listeria monocytogenes* by alveolar macrophages: smokers versus nonsmokers. *The Journal of Infectious Diseases*, 158(6), 1309–1316.
- Kingsley, C. I., Karim, M., Bushell, A. R., & Wood, K. J. (2002). CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 168(3), 1080–1086.
- Kirk, G. D., Merlo, C., O' Driscoll, P., Mehta, S. H., Galai, N., Vlahov, D., ... Engels, E. A. (2007). HIV infection is associated with an increased risk for lung cancer, independent of smoking. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 45(1), 103–110. <http://doi.org/10.1086/518606>
- Kirkham, B. W., Lassere, M. N., Edmonds, J. P., Juhasz, K. M., Bird, P. A., Lee, C. S., ... Portek, I. J. (2006). Synovial membrane cytokine expression is predictive of joint damage progression in rheumatoid arthritis: a two-year prospective study (the DAMAGE study cohort). *Arthritis and Rheumatism*, 54(4), 1122–1131. <http://doi.org/10.1002/art.21749>
- Klein, M., Vaeth, M., Scheel, T., Grabbe, S., Baumgrass, R., Berberich-Siebelt, F., ... Becker, C. (2012). Repression of cyclic adenosine monophosphate upregulation disarms and expands human regulatory T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 188(3), 1091–1097. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.1102045>
- Kleinewietfeld, M., Manzel, A., Titze, J., Kvakana, H., Yosef, N., Linker, R.A., Muller, D.N., & Hafler, D.A. (2013) « Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells ». *Nature* 496, n° 7446 : 518–22. doi:10.1038/nature11868.
- Kleinewietfeld, M., Puentes, F., Borsellino, G., Battistini, L., Röttschke, O., & Falk, K. (2005). CCR6 expression defines regulatory effector/memory-like cells within the CD25(+)CD4+ T-cell subset. *Blood*, 105(7), 2877–2886. <http://doi.org/10.1182/blood-2004-07-2505>
- Kleinschek, M. A., Boniface, K., Sadekova, S., Grein, J., Murphy, E. E., Turner, S. P., ... Kastelein, R. A. (2009). Circulating and gut-resident human Th17 cells express CD161 and promote intestinal inflammation. *The Journal of Experimental Medicine*, 206(3), 525–534. <http://doi.org/10.1084/jem.20081712>
- Kode, A., Yang, S.-R., & Rahman, I. (2006). Differential effects of cigarette smoke on oxidative stress and proinflammatory cytokine release in primary human airway epithelial cells and in a variety of transformed alveolar epithelial cells. *Respiratory Research*, 7, 132. <http://doi.org/10.1186/1465-9921-7-132>

- Koike, T., Yamagishi, H., Hatanaka, Y., Fukushima, A., Chang, J., Xia, Y., ... Iwashima, M. (2003). A novel ERK-dependent signaling process that regulates interleukin-2 expression in a late phase of T cell activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(18), 15685–15692. <http://doi.org/10.1074/jbc.M210829200>
- Kolls, J. K., & Lindén, A. (2004). Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity*, 21(4), 467–476. <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.08.018>
- Komiyama, Y., Nakae, S., Matsuki, T., Nambu, A., Ishigame, H., Kakuta, S., ... Iwakura, Y. (2006). IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 177(1), 566–573.
- Korn, T., Bettelli, E., Gao, W., Awasthi, A., Jäger, A., Strom, T. B., ... Kuchroo, V. K. (2007). IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature*, 448(7152), 484–487. <http://doi.org/10.1038/nature05970>
- Kotenko, S. V., Izotova, L. S., Mirochnitchenko, O. V., Esterova, E., Dickensheets, H., Donnelly, R. P., & Pestka, S. (2001). Identification of the functional interleukin-22 (IL-22) receptor complex: the IL-10R2 chain (IL-10Rbeta) is a common chain of both the IL-10 and IL-22 (IL-10-related T cell-derived inducible factor, IL-TIF) receptor complexes. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(4), 2725–2732. <http://doi.org/10.1074/jbc.M007837200>
- Kowaltowski, A. J., de Souza-Pinto, N. C., Castilho, R. F., & Vercesi, A. E. (2009). Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radical Biology & Medicine*, 47(4), 333–343. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.004>
- Krueger, J., Chou, F.-L., Glading, A., Schaefer, E., & Ginsberg, M. H. (2005). Phosphorylation of phosphoprotein enriched in astrocytes (PEA-15) regulates extracellular signal-regulated kinase-dependent transcription and cell proliferation. *Molecular Biology of the Cell*, 16(8), 3552–3561. <http://doi.org/10.1091/mbc.E04-11-1007>
- Kryczek, I., Banerjee, M., Cheng, P., Vatan, L., Szeliga, W., Wei, S., ... Zou, W. (2009). Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood*, 114(6), 1141–1149. <http://doi.org/10.1182/blood-2009-03-208249>
- Kryczek, I., Zhao, E., Liu, Y., Wang, Y., Vatan, L., Szeliga, W., ... Zou, W. (2011). Human TH17 cells are long-lived effector memory cells. *Science Translational Medicine*, 3(104), 104ra100. <http://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002949>
- Kuang, D.-M., Peng, C., Zhao, Q., Wu, Y., Zhu, L.-Y., Wang, J., ... Zheng, L. (2010). Tumor-activated monocytes promote expansion of IL-17-producing CD8<sup>+</sup> T cells in hepatocellular carcinoma patients. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 185(3), 1544–1549. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.0904094>
- Kučera, O., Endlicher, R., Roušar, T., Lotková, H., Garnol, T., Drahota, Z., & Cervinková, Z. (2014). The effect of tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress on lean and steatotic rat hepatocytes in vitro. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 752506. <http://doi.org/10.1155/2014/752506>
- Kucharska, A., Rushworth, L. K., Staples, C., Morrice, N. A., & Keyse, S. M. (2009). Regulation of the inducible nuclear dual-specificity phosphatase DUSP5 by ERK MAPK. *Cellular Signalling*, 21(12), 1794–1805. <http://doi.org/10.1016/j.cellsig.2009.07.015>
- Kudin, A. P., Bimpong-Buta, N. Y.-B., Vielhaber, S., Elger, C. E., & Kunz, W. S. (2004). Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(6), 4127–4135. <http://doi.org/10.1074/jbc.M310341200>

- Kuehl, F. A., & Egan, R. W. (1980). Prostaglandins, arachidonic acid, and inflammation. *Science (New York, N.Y.)*, 210(4473), 978–984.
- Kulkarni, R., Antala, S., Wang, A., Amaral, F. E., Rampersaud, R., Larussa, S. J., ... Ratner, A. J. (2012). Cigarette smoke increases *Staphylococcus aureus* biofilm formation via oxidative stress. *Infection and Immunity*, 80(11), 3804–3811. <http://doi.org/10.1128/IAI.00689-12>
- Kullberg, M. C., Jankovic, D., Feng, C. G., Hue, S., Gorelick, P. L., McKenzie, B. S., ... Sher, A. (2006). IL-23 plays a key role in *Helicobacter hepaticus*-induced T cell-dependent colitis. *The Journal of Experimental Medicine*, 203(11), 2485–2494. <http://doi.org/10.1084/jem.20061082>
- Kumagai, A., & Dunphy, W. G. (2006). How cells activate ATR. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 5(12), 1265–1268. <http://doi.org/10.4161/cc.5.12.2834>
- Kuroda, J., Ago, T., Matsushima, S., Zhai, P., Schneider, M. D., & Sadoshima, J. (2010). NADPH oxidase 4 (Nox4) is a major source of oxidative stress in the failing heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(35), 15565–15570. <http://doi.org/10.1073/pnas.1002178107>
- Kwon, J., Devadas, S., & Williams, M. S. (2003). T cell receptor-stimulated generation of hydrogen peroxide inhibits MEK-ERK activation and Ick serine phosphorylation. *Free Radical Biology & Medicine*, 35(4), 406–417.
- Kwon, J., Shatynski, K. E., Chen, H., Morand, S., de Deken, X., Miot, F., ... Williams, M. S. (2010). The nonphagocytic NADPH oxidase Duox1 mediates a positive feedback loop during T cell receptor signaling. *Science Signaling*, 3(133), ra59. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000976>
- Laan, M., Cui, Z. H., Hoshino, H., Lötvall, J., Sjöstrand, M., Gruenert, D. C., ... Lindén, A. (1999). Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 162(4), 2347–2352.
- Lahdenpohja, N., & Hurme, M. (1996). Naive (CD45RA+) T lymphocytes are more sensitive to oxidative stress-induced signals than memory (CD45RO+) cells. *Cellular Immunology*, 173(2), 282–286. <http://doi.org/10.1006/cimm.1996.0279>
- Laloo, U. G., Pillay, S., Mngqibisa, R., Abdool-Gaffar, S., & Ambaram, A. (2016). HIV and COPD: a conspiracy of risk factors. *Respirology (Carlton, Vic.)*, 21(7), 1166–1172. <http://doi.org/10.1111/resp.12806>
- Langrish, C. L., Chen, Y., Blumenschein, W. M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J. D., ... Cua, D. J. (2005). IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *The Journal of Experimental Medicine*, 201(2), 233–240. <http://doi.org/10.1084/jem.20041257>
- Laouar, Y., & Crispe, I. N. (2000). Functional flexibility in T cells: independent regulation of CD4+ T cell proliferation and effector function in vivo. *Immunity*, 13(3), 291–301.
- Lapouge, K., Smith, S. J. M., 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. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(12), 10121–10128. <http://doi.org/10.1074/jbc.M112065200>
- Laugesen, M., & Fowles, J. (2005). Scope for regulation of cigarette smoke toxicity according to brand differences in published toxicant emissions. *The New Zealand Medical Journal*, 118(1213), U1401.

- Laurence, A., Tato, C. M., Davidson, T. S., Kanno, Y., Chen, Z., Yao, Z., ... O'shea, J. J. (2007). Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity*, 26(3), 371–381. <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.02.009>
- Le Bras, M., Clément, M.-V., Pervaiz, S., & Brenner, C. (2005). Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death. *Histology and Histopathology*, 20(1), 205–219.
- LeBel, C. P., Ischiropoulos, H., & Bondy, S. C. (1992). Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chemical Research in Toxicology*, 5(2), 227–231.
- Lee, B. Y., Han, J. A., Im, J. S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E. C., ... Hwang, E. S. (2006). Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell*, 5(2), 187–195. <http://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2006.00199.x>
- Le Gallic, L., Virgilio, L., Cohen, P., Biteau, B., & Mavrothalassitis, G. (2004b). ERF nuclear shuttling, a continuous monitor of Erk activity that links it to cell cycle progression. *Molecular and Cellular Biology*, 24(3), 1206–1218.
- Lee, K., & Esselman, W. J. (2002). Inhibition of PTPs by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> regulates the activation of distinct MAPK pathways. *Free Radical Biology & Medicine*, 33(8), 1121–1132.
- Lee, S. Y., Hur, G. Y., Jung, K. H., Jung, H. C., Lee, S. Y., Kim, J. H., ... Yoo, S. H. (2006). PPAR- $\gamma$  agonist increase gefitinib's antitumor activity through PTEN expression. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 51(3), 297–301. <http://doi.org/10.1016/j.lungcan.2005.10.010>
- Lee, W.-W., Kang, S. W., Choi, J., Lee, S.-H., Shah, K., Eynon, E. E., ... Kang, I. (2010). Regulating human Th17 cells via differential expression of IL-1 receptor. *Blood*, 115(3), 530–540. <http://doi.org/10.1182/blood-2009-08-236521>
- Lee, Y. K., Turner, H., Maynard, C. L., Oliver, J. R., Chen, D., Elson, C. O., & Weaver, C. T. (2009). Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage. *Immunity*, 30(1), 92–107. <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.11.005>
- Levine, B., & Klionsky, D. J. (2004). Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Developmental Cell*, 6(4), 463–477.
- Lewis, R. S. (2003). Calcium oscillations in T-cells: mechanisms and consequences for gene expression. *Biochemical Society Transactions*, 31(Pt 5), 925–929. <http://doi.org/10.1042/>
- Li, F.-F., Shen, J., Shen, H.-J., Zhang, X., Cao, R., Zhang, Y., ... Ke, Y. (2012). Shp2 plays an important role in acute cigarette smoke-mediated lung inflammation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 189(6), 3159–3167. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.1200197>
- Li, J., Poi, M. J., & Tsai, M.-D. (2011). Regulatory mechanisms of tumor suppressor P16(INK4A) and their relevance to cancer. *Biochemistry*, 50(25), 5566–5582. <http://doi.org/10.1021/bi200642e>
- Li, N., Alam, J., Venkatesan, M. I., Eiguren-Fernandez, A., Schmitz, D., Di Stefano, E., ... Nel, A. E. (2004). Nrf2 is a key transcription factor that regulates antioxidant defense in macrophages and epithelial cells: protecting against the proinflammatory and oxidizing effects of diesel exhaust chemicals. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 173(5), 3467–3481.
- Li, Q., Wang, Y., Li, H., Shen, G., & Hu, S. (2014). Ox-LDL influences peripheral Th17/Treg balance by modulating Treg apoptosis and Th17 proliferation in atherosclerotic cerebral infarction. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 33(6), 1849–1862. <http://doi.org/10.1159/000362963>

- Li, W., Xu, Y.-J., & Shen, H.-H. (2007). Effect of cigarette smoke extract on lipopolysaccharide-activated mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway in cultured cells. *Chinese Medical Journal*, 120(12), 1075–1081.
- Li, X., Fang, P., Mai, J., Choi, E. T., Wang, H., & Yang, X. (2013). Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *Journal of Hematology & Oncology*, 6, 19. <http://doi.org/10.1186/1756-8722-6-19>
- Liang, B., Workman, C., Lee, J., Chew, C., Dale, B. M., Colonna, L., ... Clynes, R. (2008). Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 180(9), 5916–5926.
- Liang, P. S., Chen, T.-Y., & Giovannucci, E. (2009). Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: systematic review and meta-analysis. *International Journal of Cancer*, 124(10), 2406–2415. <http://doi.org/10.1002/ijc.24191>
- Lighvani, A. A., Frucht, D. M., Jankovic, D., Yamane, H., Aliberti, J., Hissong, B. D., ... O'Shea, J. J. (2001). T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(26), 15137–15142. <http://doi.org/10.1073/pnas.261570598>
- Lim, H. W., Hillsamer, P., Banham, A. H., & Kim, C. H. (2005). Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 175(7), 4180–4183.
- Lin, X., Chen, M., Liu, Y., Guo, Z., He, X., Brand, D., & Zheng, S. G. (2013). Advances in distinguishing natural from induced Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 6(2), 116–123.
- Lindén, A. (2001). Role of interleukin-17 and the neutrophil in asthma. *International Archives of Allergy and Immunology*, 126(3), 179–184.
- Littman, D. R., & Rudensky, A. Y. (2010). Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell*, 140(6), 845–858. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.021>
- Liu, C., DeGrandpré, Y., Porter, A., Griffiths, A., McAdam, K., Voisine, R., ... Proctor, C. (2011). The use of a novel tobacco treatment process to reduce toxicant yields in cigarette smoke. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 49(9), 1904–1917. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2011.02.015>
- Liu, H., Yao, S., Dann, S. M., Qin, H., Elson, C. O., & Cong, Y. (2013). ERK differentially regulates Th17- and Treg-cell development and contributes to the pathogenesis of colitis. *European Journal of Immunology*, 43(7), 1716–1726. <http://doi.org/10.1002/eji.201242889>
- Liu, W., Putnam, A. L., Xu-Yu, Z., Szot, G. L., Lee, M. R., Zhu, S., ... Bluestone, J. A. (2006). CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4<sup>+</sup> T reg cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 203(7), 1701–1711. <http://doi.org/10.1084/jem.20060772>
- Liu, X., Conner, H., Kobayashi, T., Kim, H., Wen, F., Abe, S., ... Rennard, S. I. (2005). Cigarette smoke extract induces DNA damage but not apoptosis in human bronchial epithelial cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 33(2), 121–129. <http://doi.org/10.1165/rcmb.2003-0341OC>
- Liu, Y., Johnson, S. M., Fedoriw, Y., Rogers, A. B., Yuan, H., Krishnamurthy, J., & Sharpless, N. E. (2011). Expression of p16(INK4a) prevents cancer and promotes aging in lymphocytes. *Blood*, 117(12), 3257–3267. <http://doi.org/10.1182/blood-2010-09-304402>

- Liu, Y., Sanoff, H. K., Cho, H., Burd, C. E., Torrice, C., Ibrahim, J. G., ... Sharpless, N. E. (2009). Expression of p16(INK4a) in peripheral blood T-cells is a biomarker of human aging. *Aging Cell*, 8(4), 439–448. <http://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2009.00489.x>
- Lochner, M., Peduto, L., Cherrier, M., Sawa, S., Langa, F., Varona, R., ... Eberl, G. (2008). In vivo equilibrium of proinflammatory IL-17+ and regulatory IL-10+ Foxp3+ RORgamma t+ T cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 205(6), 1381–1393. <http://doi.org/10.1084/jem.20080034>
- Loft, S., Møller, P., Cooke, M. S., Rozalski, R., & Olinski, R. (2008). Antioxidant vitamins and cancer risk: is oxidative damage to DNA a relevant biomarker? *European Journal of Nutrition*, 47 Suppl 2, 19–28. <http://doi.org/10.1007/s00394-008-2004-0>
- López-Fontanals, M., Rodríguez-Mulero, S., Casado, F. J., Dérjard, B., & Pastor-Anglada, M. (2003). The osmoregulatory and the amino acid-regulated responses of system A are mediated by different signal transduction pathways. *The Journal of General Physiology*, 122(1), 5–16. <http://doi.org/10.1085/jgp.200308800>
- Louhelainen, N., Stark, H., Mazur, W., Rytälä, P., Djukanovic, R., & Kinnula, V. L. (2010). Elevation of sputum matrix metalloproteinase-9 persists up to 6 months after smoking cessation: a research study. *BMC Pulmonary Medicine*, 10, 13. <http://doi.org/10.1186/1471-2466-10-13>
- Lu, D., Wolfgang, C. D., & Hai, T. (2006). Activating transcription factor 3, a stress-inducible gene, suppresses Ras-stimulated tumorigenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(15), 10473–10481. <http://doi.org/10.1074/jbc.M509278200>
- Lu, L., Wang, J., Zhang, F., Chai, Y., Brand, D., Wang, X., ... Zheng, S. G. (2010). Role of SMAD and non-SMAD signals in the development of Th17 and regulatory T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 184(8), 4295–4306. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.0903418>
- Lu, L.-M., Zavitz, C. C. J., Chen, B., Kianpour, S., Wan, Y., & Stämpfli, M. R. (2007). Cigarette smoke impairs NK cell-dependent tumor immune surveillance. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 178(2), 936–943.
- Lu, S. C. (2013). Glutathione synthesis. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1830(5), 3143–3153. <http://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.09.008>
- Lubberts, E., Koenders, M. I., & van den Berg, W. B. (2005). The role of T-cell interleukin-17 in conducting destructive arthritis: lessons from animal models. *Arthritis Research & Therapy*, 7(1), 29–37. <http://doi.org/10.1186/ar1478>
- Luo, X., Zhang, Q., Liu, V., Xia, Z., Pothoven, K. L., & Lee, C. (2008). Cutting edge: TGF-beta-induced expression of Foxp3 in T cells is mediated through inactivation of ERK. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 180(5), 2757–2761.
- Ma, C. S., Chew, G. Y. J., Simpson, N., Priyadarshi, A., Wong, M., Grimbacher, B., ... Cook, M. C. (2008). Deficiency of Th17 cells in hyper IgE syndrome due to mutations in STAT3. *The Journal of Experimental Medicine*, 205(7), 1551–1557. <http://doi.org/10.1084/jem.20080218>
- Mace, P. D., Wallez, Y., Egger, M. F., Dobaczewska, M. K., Robinson, H., Pasquale, E. B., & Riedl, S. J. (2013). Structure of ERK2 bound to PEA-15 reveals a mechanism for rapid release of activated MAPK. *Nature Communications*, 4, 1681. <http://doi.org/10.1038/ncomms2687>
- Macintyre, A. N., & Rathmell, J. C. (2013). Activated lymphocytes as a metabolic model for carcinogenesis. *Cancer & Metabolism*, 1(1), 5. <http://doi.org/10.1186/2049-3002-1-5>

- MacIver, N. J., Michalek, R. D., & Rathmell, J. C. (2013). Metabolic regulation of T lymphocytes. *Annual Review of Immunology*, 31, 259–283. <http://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095956>
- MacLeod, A. K., McMahon, M., Plummer, S. M., Higgins, L. G., Penning, T. M., Igarashi, K., & Hayes, J. D. (2009). Characterization of the cancer chemopreventive NRF2-dependent gene battery in human keratinocytes: demonstration that the KEAP1-NRF2 pathway, and not the BACH1-NRF2 pathway, controls cytoprotection against electrophiles as well as redox-cycling compounds. *Carcinogenesis*, 30(9), 1571–1580. <http://doi.org/10.1093/carcin/bgp176>
- Maestrelli, P., Páska, C., Saetta, M., Turato, G., Nowicki, Y., Monti, S., ... Fabbri, L. M. (2003). Decreased haem oxygenase-1 and increased inducible nitric oxide synthase in the lung of severe COPD patients. *The European Respiratory Journal*, 21(6), 971–976.
- Maggi, L., Santarasci, V., Capone, M., Peired, A., Frosali, F., Crome, S. Q., ... Annunziato, F. (2010). CD161 is a marker of all human IL-17-producing T-cell subsets and is induced by RORC. *European Journal of Immunology*, 40(8), 2174–2181. <http://doi.org/10.1002/eji.200940257>
- Majo, J., Ghezzi, H., & Cosio, M. G. (2001). Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema. *The European Respiratory Journal*, 17(5), 946–953.
- Makino, N., Sasaki, K., Hashida, K., & Sakakura, Y. (2004). A metabolic model describing the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> elimination by mammalian cells including H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> permeation through cytoplasmic and peroxisomal membranes: comparison with experimental data. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1673(3), 149–159. <http://doi.org/10.1016/j.bbagen.2004.04.011>
- Malek, T. R., Yu, A., Vincek, V., Scibelli, P., & Kong, L. (2002). CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2R $\beta$ -deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2. *Immunity*, 17(2), 167–178.
- Malumbres, M., Pérez De Castro, I., Hernández, M. I., Jiménez, M., Corral, T., & Pellicer, A. (2000). Cellular response to oncogenic ras involves induction of the Cdk4 and Cdk6 inhibitor p15(INK4b). *Molecular and Cellular Biology*, 20(8), 2915–2925.
- Manel, N., Unutmaz, D., & Littman, D. R. (2008). The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor- $\beta$  and induction of the nuclear receptor ROR $\gamma$ . *Nature Immunology*, 9(6), 641–649. <http://doi.org/10.1038/ni.1610>
- Manzel, L. J., Shi, L., O'Shaughnessy, P. T., Thorne, P. S., & Look, D. C. (2011). Inhibition by cigarette smoke of nuclear factor- $\kappa$ B-dependent response to bacteria in the airway. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 44(2), 155–165. <http://doi.org/10.1165/rcmb.2009-0454OC>
- Marcotte, R., Lacelle, C., & Wang, E. (2004). Senescent fibroblasts resist apoptosis by downregulating caspase-3. *Mechanisms of Ageing and Development*, 125(10–11), 777–783. <http://doi.org/10.1016/j.mad.2004.07.007>
- Markegard, E., Trager, E., Yang, C. O., Zhang, W., Weiss, A., & Roose, J. P. (2011). Basal LAT-diacylglycerol-RasGRP1 signals in T cells maintain TCR $\alpha$  gene expression. *PloS One*, 6(9), e25540. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0025540>
- Marko, A. J., Miller, R. A., Kelman, A., & Frauwirth, K. A. (2010). Induction of glucose metabolism in stimulated T lymphocytes is regulated by mitogen-activated protein kinase signaling. *PloS One*, 5(11), e15425. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0015425>
- Marks, B. R., Nowyhed, H. N., Choi, J.-Y., Poholek, A. C., Odegard, J. M., Flavell, R. A., & Craft, J. (2009). Thymic self-reactivity selects natural interleukin 17-producing T cells that can

- regulate peripheral inflammation. *Nature Immunology*, 10(10), 1125–1132. <http://doi.org/10.1038/ni.1783>
- Marques-Vidal, P., Cambou, J. P., Ferrières, J., Thomas, D., Grenier, O., Cantet, C., ... Etude Prevenir. (2001). [Distribution and treatment of cardiovascular risk factors in coronary patients: the Prevenir Study]. *Archives Des Maladies Du Coeur Et Des Vaisseaux*, 94(7), 673–680.
- Marquet, J., Lasoudris, F., Cousin, C., Puiffe, M.-L., Martin-Garcia, N., Baud, V., ... Castellano, F. (2010). Dichotomy between factors inducing the immunosuppressive enzyme IL-4-induced gene 1 (IL4I1) in B lymphocytes and mononuclear phagocytes. *European Journal of Immunology*, 40(9), 2557–2568. <http://doi.org/10.1002/eji.201040428>
- Marshall, C. J. (1995). Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*, 80(2), 179–185.
- Marshall, H. D., Chande, A., Jung, Y. W., Meng, H., Poholek, A. C., Parish, I. A., ... Kaeck, S. M. (2011). Differential expression of Ly6C and T-bet distinguish effector and memory Th1 CD4(+) cell properties during viral infection. *Immunity*, 35(4), 633–646. <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.08.016>
- Martin, B., Bécourt, C., Bienvenu, B., & Lucas, B. (2006). Self-recognition is crucial for maintaining the peripheral CD4+ T-cell pool in a nonlymphopenic environment. *Blood*, 108(1), 270–277. <http://doi.org/10.1182/blood-2006-01-0017>
- Martin-Orozco, N., Muranski, P., Chung, Y., Yang, X. O., Yamazaki, T., Lu, S., ... Dong, C. (2009). T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity. *Immunity*, 31(5), 787–798. <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.09.014>
- Maseda, D, Crofford L, & Johnson, E. « Regulatory T Cell Differentiation and Th17 T Cell Function Are Regulated by mPGES-1-Dependent PGE2 (IRC11P.424) ». *The Journal of Immunology* 194, n° 1 Supplement (2015): 197.6-197.6.
- Mathur, A. N., Chang, H.-C., Zisoulis, D. G., Stritesky, G. L., Yu, Q., O'Malley, J. T., ... Kaplan, M. H. (2007). Stat3 and Stat4 direct development of IL-17-secreting Th cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 178(8), 4901–4907.
- Matsue, H., Edelbaum, D., Shalhevet, D., Mizumoto, N., Yang, C., Mummert, M. E., ... Takashima, A. (2003). Generation and function of reactive oxygen species in dendritic cells during antigen presentation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 171(6), 3010–3018.
- Matsuzaki, G., & Umemura, M. (2007). Interleukin-17 as an effector molecule of innate and acquired immunity against infections. *Microbiology and Immunology*, 51(12), 1139–1147.
- Maunders, H., Patwardhan, S., Phillips, J., Clack, A., & Richter, A. (2007). Human bronchial epithelial cell transcriptome: gene expression changes following acute exposure to whole cigarette smoke in vitro. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 292(5), L1248-1256. <http://doi.org/10.1152/ajplung.00290.2006>
- Maurice, M. M., Nakamura, H., van der Voort, E. A., van Vliet, A. I., Staal, F. J., Tak, P. P., ... Verweij, C. L. (1997). Evidence for the role of an altered redox state in hyporesponsiveness of synovial T cells in rheumatoid arthritis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 158(3), 1458–1465.
- Mazzoni, A., Santarlasci, V., Maggi, L., Capone, M., Rossi, M. C., Querci, V., ... Annunziato, F. (2015). Demethylation of the RORC2 and IL17A in human CD4+ T lymphocytes defines Th17 origin of nonclassic Th1 cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 194(7), 3116–3126. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.1401303>

- McAllister, F., Henry, A., Kreindler, J. L., Dubin, P. J., Ulrich, L., Steele, C., ... Kolls, J. K. (2005). Role of IL-17A, IL-17F, and the IL-17 receptor in regulating growth-related oncogene- $\alpha$  and granulocyte colony-stimulating factor in bronchial epithelium: implications for airway inflammation in cystic fibrosis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 175(1), 404–412.
- McBride, S. M., Ali, N. N., Margalit, D. N., & Chan, A. W. (2012). Active tobacco smoking and distant metastasis in patients with oropharyngeal cancer. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 84(1), 183–188. <http://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2011.11.044>
- McCrea, K. A., Ensor, J. E., Nall, K., Bleecker, E. R., & Hasday, J. D. (1994). Altered cytokine regulation in the lungs of cigarette smokers. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 150(3), 696–703. <http://doi.org/10.1164/ajrccm.150.3.8087340>
- McCubrey, J. A., Lahair, M. M., & Franklin, R. A. (2006). Reactive oxygen species-induced activation of the MAP kinase signaling pathways. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8(9–10), 1775–1789. <http://doi.org/10.1089/ars.2006.8.1775>
- McEachern, E. K., Hwang, J. H., Sladewski, K. M., Nicatia, S., Dewitz, C., Mathew, D. P., ... Crotty Alexander, L. E. (2015). Analysis of the effects of cigarette smoke on staphylococcal virulence phenotypes. *Infection and Immunity*, 83(6), 2443–2452. <http://doi.org/10.1128/IAI.00303-15>
- McKinstry, K. K., Strutt, T. M., & Swain, S. L. (2010). Regulation of CD4<sup>+</sup> T-cell contraction during pathogen challenge. *Immunological Reviews*, 236, 110–124. <http://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00921.x>
- Mehta, H., Nazzal, K., & Sadikot, R. T. (2008a). Cigarette smoking and innate immunity. *Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society ... [et Al.]*, 57(11), 497–503. <http://doi.org/10.1007/s00011-008-8078-6>
- Meister, A. (1995). Glutathione metabolism. *Methods in Enzymology*, 251, 3–7.
- Meloche, S., & Pouyssegur, J. (2007). The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene*, 26(22), 3227–3239. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1210414>
- Mercer, B. A., Kolesnikova, N., Sonett, J., & D'Armiento, J. (2004). Extracellular regulated kinase/mitogen activated protein kinase is up-regulated in pulmonary emphysema and mediates matrix metalloproteinase-1 induction by cigarette smoke. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(17), 17690–17696. <http://doi.org/10.1074/jbc.M313842200>
- Messi, M., Giacchetto, I., Nagata, K., Lanzavecchia, A., Natoli, G., & Sallusto, F. (2003). Memory and flexibility of cytokine gene expression as separable properties of human T(H)1 and T(H)2 lymphocytes. *Nature Immunology*, 4(1), 78–86. <http://doi.org/10.1038/ni872>
- Messner, B., Frotschnig, S., Steinacher-Nigisch, A., Winter, B., Eichmair, E., Gebetsberger, J., ... Bernhard, D. (2012). Apoptosis and necrosis: two different outcomes of cigarette smoke condensate-induced endothelial cell death. *Cell Death & Disease*, 3, e424. <http://doi.org/10.1038/cddis.2012.162>
- Meuronen, A., Majuri, M.-L., Alenius, H., Mäntylä, T., Wolff, H., Piirilä, P., & Laitinen, A. (2008). Decreased cytokine and chemokine mRNA expression in bronchoalveolar lavage in asymptomatic smoking subjects. *Respiration; International Review of Thoracic Diseases*, 75(4), 450–458. <http://doi.org/10.1159/000114855>
- Michalek, R. D., Gerriets, V. A., Jacobs, S. R., Macintyre, A. N., MacIver, N. J., Mason, E. F., ... Rathmell, J. C. (2011). Cutting edge: distinct glycolytic and lipid oxidative metabolic programs

- are essential for effector and regulatory CD4<sup>+</sup> T cell subsets. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 186(6), 3299–3303. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.1003613>
- Michiels, C., Toussaint, O., & Remacle, J. (1990). Comparative study of oxygen toxicity in human fibroblasts and endothelial cells. *Journal of Cellular Physiology*, 144(2), 295–302. <http://doi.org/10.1002/jcp.1041440216>
- Miguez-Burbano, M. J., Shor-Posner, G., & Hadrigan, S. (2005). Non-tuberculous mycobacteria in HIV-infected patients: geographic, behavioural, and immunological factors. *The Lancet. Infectious Diseases*, 5(7), 394–395; author reply 396. [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(05\)70146-8](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(05)70146-8)
- Milner, J. D., Brenchley, J. M., Laurence, A., Freeman, A. F., Hill, B. J., Elias, K. M., ... Douek, D. C. (2008). Impaired T(H)17 cell differentiation in subjects with autosomal dominant hyper-IgE syndrome. *Nature*, 452(7188), 773–776. <http://doi.org/10.1038/nature06764>
- Min, B., Prout, M., Hu-Li, J., Zhu, J., Jankovic, D., Morgan, E. S., ... Paul, W. E. (2004). Basophils produce IL-4 and accumulate in tissues after infection with a Th2-inducing parasite. *The Journal of Experimental Medicine*, 200(4), 507–517. <http://doi.org/10.1084/jem.20040590>
- Mio, T., Romberger, D. J., Thompson, A. B., Robbins, R. A., Heires, A., & Rennard, S. I. (1997). Cigarette smoke induces interleukin-8 release from human bronchial epithelial cells. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 155(5), 1770–1776. <http://doi.org/10.1164/ajrccm.155.5.9154890>
- Miossec, P. (2009). IL-17 and Th17 cells in human inflammatory diseases. *Microbes and Infection / Institut Pasteur*, 11(5), 625–630. <http://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.04.003>
- Misra, N., Bayry, J., Lacroix-Desmazes, S., Kazatchkine, M. D., & Kaveri, S. V. (2004). Cutting edge: human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 172(8), 4676–4680.
- Mitchell, P. (1975). Proton translocation mechanisms and energy transduction by adenosine triphosphatases: an answer to criticisms. *FEBS Letters*, 50(2), 95–97.
- Miyahara, E., Nishie, M., Takumi, S., Miyanochara, H., Nishi, J., Yoshiie, K., ... Takeuchi, T. (2011). Environmental mutagens may be implicated in the emergence of drug-resistant microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 317(2), 109–116. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02215.x>
- Miyara, M., Yoshioka, Y., Kitoh, A., Shima, T., Wing, K., Niwa, A., ... Sakaguchi, S. (2009). Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4<sup>+</sup> T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity*, 30(6), 899–911. <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.03.019>
- Molet, S., Hamid, Q., Davoine, F., Nutku, E., Taha, R., Pagé, N., ... Chakir, J. (2001). IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 108(3), 430–438. <http://doi.org/10.1067/mai.2001.117929>
- Mondovì, B., Befani, O., & Sabatini, S. (1984). Recent results on the active site of amine oxidases. *Agents and Actions*, 14(3–4), 356–357.
- Montes, C. L., Chapoval, A. I., Nelson, J., Orhue, V., Zhang, X., Schulze, D. H., ... Gastman, B. R. (2008). Tumor-induced senescent T cells with suppressor function: a potential form of tumor immune evasion. *Cancer Research*, 68(3), 870–879. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2282>

- Moodie, F. M., Marwick, J. A., Anderson, C. S., Szulakowski, P., Biswas, S. K., Bauter, M. R., ... Rahman, I. (2004). Oxidative stress and cigarette smoke alter chromatin remodeling but differentially regulate NF-kappaB activation and proinflammatory cytokine release in alveolar epithelial cells. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18(15), 1897–1899. <http://doi.org/10.1096/fj.04-1506fje>
- Mor, A., Keren, G., Kloog, Y., & George, J. (2008). N-Ras or K-Ras inhibition increases the number and enhances the function of Foxp3 regulatory T cells. *European Journal of Immunology*, 38(6), 1493–1502. <http://doi.org/10.1002/eji.200838292>
- Morand, S., Ueyama, T., Tsujibe, S., Saito, N., Korzeniowska, A., & Leto, T. L. (2009). Duox maturation factors form cell surface complexes with Duox affecting the specificity of reactive oxygen species generation. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 23(4), 1205–1218. <http://doi.org/10.1096/fj.08-120006>
- Moreira, D. M., Aronson, W. J., Terris, M. K., Kane, C. J., Amling, C. L., Cooperberg, M. R., ... Freedland, S. J. (2014). Cigarette smoking is associated with an increased risk of biochemical disease recurrence, metastasis, castration-resistant prostate cancer, and mortality after radical prostatectomy: results from the SEARCH database. *Cancer*, 120(2), 197–204. <http://doi.org/10.1002/cncr.28423>
- Morlá, M., Busquets, X., Pons, J., Sauleda, J., MacNee, W., & Agustí, A. G. N. (2006). Telomere shortening in smokers with and without COPD. *The European Respiratory Journal*, 27(3), 525–528. <http://doi.org/10.1183/09031936.06.00087005>
- Morrison, D., Rahman, I., Lannan, S., & MacNee, W. (1999). Epithelial permeability, inflammation, and oxidant stress in the air spaces of smokers. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 159(2), 473–479. <http://doi.org/10.1164/ajrccm.159.2.9804080>
- Mortaz, E., Adcock, I. M., Ito, K., Kraneveld, A. D., Nijkamp, F. P., & Folkerts, G. (2010). Cigarette smoke induces CXCL8 production by human neutrophils via activation of TLR9 receptor. *The European Respiratory Journal*, 36(5), 1143–1154. <http://doi.org/10.1183/09031936.00062209>
- Mosmann, T. R., & Sad, S. (1996). The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunology Today*, 17(3), 138–146.
- Motz, G. T., Eppert, B. L., Sun, G., Wesselkamper, S. C., Linke, M. J., Deka, R., & Borchers, M. T. (2008). Persistence of lung CD8 T cell oligoclonal expansions upon smoking cessation in a mouse model of cigarette smoke-induced emphysema. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 181(11), 8036–8043.
- Mougiakakos, D., Johansson, C. C., 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), 857–861. <http://doi.org/10.1182/blood-2010-09-307041>
- Mougiakakos, D., Johansson, C. C., & Kiessling, R. (2009). Naturally occurring regulatory T cells show reduced sensitivity toward oxidative stress-induced cell death. *Blood*, 113(15), 3542–3545. <http://doi.org/10.1182/blood-2008-09-181040>
- Moustaki, M., & Fretzayas, A. (2010). How much asthma is due to atopy? *Allergology International: Official Journal of the Japanese Society of Allergology*, 59(2), 229. <http://doi.org/10.2332/allergolint.09-LE-0134>
- Muller, F. L., Liu, Y., & Van Remmen, H. (2004). Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(47), 49064–49073. <http://doi.org/10.1074/jbc.M407715200>

- Muller, M. (2009). Cellular senescence: molecular mechanisms, in vivo significance, and redox considerations. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11(1), 59–98. <http://doi.org/10.1089/ars.2008.2104>
- 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), 797–801.
- Muller, T., Haussmann, H. J., & Schepers, G. (1997). Evidence for peroxynitrite as an oxidative stress-inducing compound of aqueous cigarette smoke fractions. *Carcinogenesis*, 18(2), 295–301.
- Murakami-Satsutani, N., Ito, T., Nakanishi, T., Inagaki, N., Tanaka, A., Vien, P. T. X., ... Nomura, S. (2014). IL-33 promotes the induction and maintenance of Th2 immune responses by enhancing the function of OX40 ligand. *Allergology International: Official Journal of the Japanese Society of Allergology*, 63(3), 443–455. <http://doi.org/10.2332/allergolint.13-OA-0672>
- Muranski, P., Borman, Z. A., Kerkar, S. P., Klebanoff, C. A., Ji, Y., Sanchez-Perez, L., ... Restifo, N. P. (2011). Th17 cells are long lived and retain a stem cell-like molecular signature. *Immunity*, 35(6), 972–985. <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.09.019>
- Murin, S., & Inciardi, J. (2001). Cigarette smoking and the risk of pulmonary metastasis from breast cancer. *Chest*, 119(6), 1635–1640.
- Murphy, C. A., Langrish, C. L., Chen, Y., Blumenschein, W., McClanahan, T., Kastelein, R. A., ... Cua, D. J. (2003). Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *The Journal of Experimental Medicine*, 198(12), 1951–1957. <http://doi.org/10.1084/jem.20030896>
- Murphy, L. O., Smith, S., Chen, R.-H., Fingar, D. C., & Blenis, J. (2002). Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products. *Nature Cell Biology*, 4(8), 556–564. <http://doi.org/10.1038/ncb822>
- Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *The Biochemical Journal*, 417(1), 1–13. <http://doi.org/10.1042/BJ20081386>
- Muscat, J. E., Kleinman, W., Colosimo, S., Muir, A., Lazarus, P., Park, J., & Richie, J. P. (2004). Enhanced protein glutathiolation and oxidative stress in cigarette smokers. *Free Radical Biology & Medicine*, 36(4), 464–470. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2003.11.018>
- Mustelin, T., Rahmouni, S., Bottini, N., & Alonso, A. (2003). Role of protein tyrosine phosphatases in T cell activation. *Immunological Reviews*, 191, 139–147.
- Nakae, S., Nambu, A., Sudo, K., & Iwakura, Y. (2003). Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 171(11), 6173–6177.
- Nakamura, Y., Miyata, M., Ohba, T., Ando, T., Hatsushika, K., Suenaga, F., ... Nakao, A. (2008). Cigarette smoke extract induces thymic stromal lymphopoietin expression, leading to T(H)2-type immune responses and airway inflammation. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 122(6), 1208–1214. <http://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.09.022>
- Nakashima, T., Jinnin, M., Yamane, K., Honda, N., Kajihara, I., Makino, T., ... Ihn, H. (2012). Impaired IL-17 signaling pathway contributes to the increased collagen expression in

- scleroderma fibroblasts. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 188(8), 3573–3583. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.1100591>
- Narita, M., Nunez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A. W., Hearn, S. A., ... Lowe, S. W. (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell*, 113(6), 703–716.
- Nauseef, W. M. (2014). Detection of superoxide anion and hydrogen peroxide production by cellular NADPH oxidases. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1840(2), 757–767. <http://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.04.040>
- Ndhlovu, L. C., Sinclair, E., Epling, L., Tan, Q. X., Ho, T., Jha, A. R., ... Barbour, J. D. (2010). IL-2 immunotherapy to recently HIV-1 infected adults maintains the numbers of IL-17 expressing CD4<sup>+</sup> T (T(H)17) cells in the periphery. *Journal of Clinical Immunology*, 30(5), 681–692. <http://doi.org/10.1007/s10875-010-9432-3>
- Nelms, K., Keegan, A. D., Zamorano, J., Ryan, J. J., & Paul, W. E. (1999). The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annual Review of Immunology*, 17, 701–738. <http://doi.org/10.1146/annurev.immunol.17.1.701>
- Nelson, J. A. E., Krishnamurthy, J., Menezes, P., Liu, Y., Hudgens, M. G., Sharpless, N. E., & Eron, J. J. (2012). Expression of p16(INK4a) as a biomarker of T-cell aging in HIV-infected patients prior to and during antiretroviral therapy. *Aging Cell*, 11(5), 916–918. <http://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2012.00856.x>
- Nguyen, T., Yang, C. S., & Pickett, C. B. (2004). The pathways and molecular mechanisms regulating Nrf2 activation in response to chemical stress. *Free Radical Biology & Medicine*, 37(4), 433–441. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.04.033>
- Niida, H., & Nakanishi, M. (2006). DNA damage checkpoints in mammals. *Mutagenesis*, 21(1), 3–9. <http://doi.org/10.1093/mutage/gei063>
- Nishio, K., Inoue, A., Qiao, S., Kondo, H., & Mimura, A. (2001). Senescence and cytoskeleton: overproduction of vimentin induces senescent-like morphology in human fibroblasts. *Histochemistry and Cell Biology*, 116(4), 321–327. <http://doi.org/10.1007/s004180100325>
- Noack, M., & Miossec, P. (2014). Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmunity Reviews*, 13(6), 668–677. <http://doi.org/10.1016/j.autrev.2013.12.004>
- Noctor, G., & Foyer, C. H. (1998). ASCORBATE AND GLUTATHIONE: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49, 249–279. <http://doi.org/10.1146/annurev.arplant.49.1.249>
- Nübel, T., Emre, Y., Rabier, D., Chadefaux, B., Ricquier, D., & Bouillaud, F. (2008). Modified glutamine catabolism in macrophages of Ucp2 knock-out mice. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1777(1), 48–54. <http://doi.org/10.1016/j.bbabi.2007.11.002>
- Numasaki, M., Fukushi, J., Ono, M., Narula, S. K., Zavodny, P. J., Kudo, T., ... Lotze, M. T. (2003). Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. *Blood*, 101(7), 2620–2627. <http://doi.org/10.1182/blood-2002-05-1461>
- Nyunoya, T., Monick, M. M., Klingelutz, A., Yarovsky, T. O., Cagley, J. R., & Hunninghake, G. W. (2006). Cigarette smoke induces cellular senescence. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 35(6), 681–688. <http://doi.org/10.1165/rcmb.2006-0169OC>
- Obaya, A. J., & Sedivy, J. M. (2002). Regulation of cyclin-Cdk activity in mammalian cells. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 59(1), 126–142.

- Oberle, N., Eberhardt, N., Falk, C. S., Krammer, P. H., & 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. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 179(6), 3578–3587.
- Ohkura, N., & Sakaguchi, S. (2010). Foxo1 and Foxo3 help Foxp3. *Immunity*, 33(6), 835–837. <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.12.004>
- Oppmann, B., Lesley, R., Blom, B., Timans, J. C., Xu, Y., Hunte, B., ... Kastelein, R. A. (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), 715–725.
- Orosz, Z., Csiszar, A., Labinskyy, N., Smith, K., Kaminski, P. M., Ferdinandy, P., ... Ungvari, Z. (2007). Cigarette smoke-induced proinflammatory alterations in the endothelial phenotype: role of NAD(P)H oxidase activation. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 292(1), H130-139. <http://doi.org/10.1152/ajpheart.00599.2006>
- Ouyang, W., Löhning, M., Gao, Z., Assenmacher, M., Ranganath, S., Radbruch, A., & Murphy, K. M. (2000). Stat6-independent GATA-3 autoactivation directs IL-4-independent Th2 development and commitment. *Immunity*, 12(1), 27–37.
- Ovrevik, J., Låg, M., Holme, J. A., Schwarze, P. E., & Refsnes, M. (2009). Cytokine and chemokine expression patterns in lung epithelial cells exposed to components characteristic of particulate air pollution. *Toxicology*, 259(1–2), 46–53. <http://doi.org/10.1016/j.tox.2009.01.028>
- Pace, E., Ferraro, M., Siena, L., Melis, M., Montalbano, A. M., Johnson, M., ... Gjomarkaj, M. (2008). Cigarette smoke increases Toll-like receptor 4 and modifies lipopolysaccharide-mediated responses in airway epithelial cells. *Immunology*, 124(3), 401–411. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02788.x>
- Pacher, P., Beckman, J. S., & Liaudet, L. (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological Reviews*, 87(1), 315–424. <http://doi.org/10.1152/physrev.00029.2006>
- Pai, S.-Y., Truitt, M. L., & Ho, I.-C. (2004). GATA-3 deficiency abrogates the development and maintenance of T helper type 2 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(7), 1993–1998. <http://doi.org/10.1073/pnas.0308697100>
- Palacios, E. H., & Weiss, A. (2007). Distinct roles for Syk and ZAP-70 during early thymocyte development. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(7), 1703–1715. <http://doi.org/10.1084/jem.20070405>
- Palena, C., Hamilton, D. H., & Fernando, R. I. (2012). Influence of IL-8 on the epithelial-mesenchymal transition and the tumor microenvironment. *Future Oncology (London, England)*, 8(6), 713–722. <http://doi.org/10.2217/fon.12.59>
- Pandiyan, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J., & Lenardo, M. J. (2007). CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nature Immunology*, 8(12), 1353–1362. <http://doi.org/10.1038/ni1536>
- Pang, W. W. (2006). The role of mitochondria in regulating MAPK signalling pathways during oxidative stress. *The University of Western Australia*, [uwa.edu.au](http://uwa.edu.au)
- Park, H., Li, Z., Yang, X. O., Chang, S. H., Nurieva, R., Wang, Y.-H., ... Dong, C. (2005). A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nature Immunology*, 6(11), 1133–1141. <http://doi.org/10.1038/ni1261>

- Parrish-Novak, J., Dillon, S. R., Nelson, A., Hammond, A., Sprecher, C., Gross, J. A., ... Foster, D. (2000). Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature*, 408(6808), 57–63. <http://doi.org/10.1038/35040504>
- Parronchi, P., Romagnani, P., Annunziato, F., Sampognaro, S., Becchio, A., Giannarini, L., ... Romagnani, S. (1997). Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *The American Journal of Pathology*, 150(3), 823–832.
- Passarelli, M. N., Newcomb, P. A., Hampton, J. M., Trentham-Dietz, A., Titus, L. J., Egan, K. M., ... Willett, W. C. (2016). Cigarette Smoking Before and After Breast Cancer Diagnosis: Mortality From Breast Cancer and Smoking-Related Diseases. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 34(12), 1315–1322. <http://doi.org/10.1200/JCO.2015.63.9328>
- Pastorino, S., Renganathan, H., Caliva, M. J., Filbert, E. L., Opoku-Ansah, J., Sulzmaier, F. J., ... Ramos, J. W. (2010). The death effector domain protein PEA-15 negatively regulates T-cell receptor signaling. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 24(8), 2818–2828. <http://doi.org/10.1096/fj.09-144295>
- Paul-Clark, M. J., McMaster, S. K., Sorrentino, R., Sriskandan, S., Bailey, L. K., Moreno, L., ... Mitchell, J. A. (2009). Toll-like receptor 2 is essential for the sensing of oxidants during inflammation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 179(4), 299–306. <http://doi.org/10.1164/rccm.200707-1019OC>
- Pearce, E. L., Poffenberger, M. C., Chang, C.-H., & Jones, R. G. (2013). Fueling immunity: insights into metabolism and lymphocyte function. *Science (New York, N.Y.)*, 342(6155), 1242454. <http://doi.org/10.1126/science.1242454>
- Pearce, N., Pekkanen, J., & Beasley, R. (1999). How much asthma is really attributable to atopy? *Thorax*, 54(3), 268–272.
- Peat, J. K., Keena, V., Harakeh, Z., & Marks, G. (2001). Parental smoking and respiratory tract infections in children. *Paediatric Respiratory Reviews*, 2(3), 207–213. <http://doi.org/10.1053/prrv.2001.0142>
- Peck, A., & Mellins, E. D. (2010). Precarious balance: Th17 cells in host defense. *Infection and Immunity*, 78(1), 32–38. <http://doi.org/10.1128/IAI.00929-09>
- Pelletier, M., Maggi, L., Micheletti, A., Lazzeri, E., Tamassia, N., Costantini, C., ... Cassatella, M. A. (2010). Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood*, 115(2), 335–343. <http://doi.org/10.1182/blood-2009-04-216085>
- Pène, J., Chevalier, S., Preisser, L., Vénéreau, E., Guilleux, M.-H., Ghannam, S., ... Gascan, H. (2008). Chronically inflamed human tissues are infiltrated by highly differentiated Th17 lymphocytes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 180(11), 7423–7430.
- Petrache, I., Diab, K., Knox, K. S., Twigg, H. L., Stephens, R. S., Flores, S., & Tudor, R. M. (2008). HIV associated pulmonary emphysema: a review of the literature and inquiry into its mechanism. *Thorax*, 63(5), 463–469. <http://doi.org/10.1136/thx.2007.079111>
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), e45.
- Piccirillo, C. A., Letterio, J. J., Thornton, A. M., McHugh, R. S., Mamura, M., Mizuhara, H., & Shevach, E. M. (2002). CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness. *The Journal of Experimental Medicine*, 196(2), 237–246.

- Polansky, J. K., Kretschmer, K., Freyer, J., Floess, S., Garbe, A., Baron, U., ... Huehn, J. (2008). DNA methylation controls Foxp3 gene expression. *European Journal of Immunology*, 38(6), 1654–1663. <http://doi.org/10.1002/eji.200838105>
- Polgár, E., Campbell, A. D., MacIntyre, L. M., Watanabe, M., & Todd, A. J. (2007). Phosphorylation of ERK in neurokinin 1 receptor-expressing neurons in laminae III and IV of the rat spinal dorsal horn following noxious stimulation. *Molecular Pain*, 3, 4. <http://doi.org/10.1186/1744-8069-3-4>
- Pragman, A. A., Kim, H. B., Reilly, C. S., Wendt, C., & Isaacson, R. E. (2012). The lung microbiome in moderate and severe chronic obstructive pulmonary disease. *PloS One*, 7(10), e47305. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0047305>
- Pryor, W. A., & Castle, L. (1984). Chemical methods for the detection of lipid hydroperoxides. *Methods in Enzymology*, 105, 293–299.
- Pryor, W. A., Hales, B. J., Premovic, P. I., & Church, D. F. (1983). The radicals in cigarette tar: their nature and suggested physiological implications. *Science (New York, N.Y.)*, 220(4595), 425–427.
- Pryor, W. A., & Stone, K. (1993). Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxyxynitrate, and peroxyxynitrite. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 686, 12–27–28.
- Puiffe, M.-L., Lachaise, I., Molinier-Frenkel, V., & Castellano, F. (2013). Antibacterial properties of the mammalian L-amino acid oxidase IL4I1. *PloS One*, 8(1), e54589. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0054589>
- Puren, A. J., Fantuzzi, G., Gu, Y., Su, M. S., & Dinarello, C. A. (1998). Interleukin-18 (IFN $\gamma$ -inducing factor) induces IL-8 and IL-1 $\beta$  via TNF $\alpha$  production from non-CD14 $^{+}$  human blood mononuclear cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 101(3), 711–721. <http://doi.org/10.1172/JCI1379>
- Qazi, B. S., Tang, K., & Qazi, A. (2011). Recent advances in underlying pathologies provide insight into interleukin-8 expression-mediated inflammation and angiogenesis. *International Journal of Inflammation*, 2011, 908468. <http://doi.org/10.4061/2011/908468>
- Quintana, F. J., Basso, A. S., Iglesias, A. H., Korn, T., Farez, M. F., Bettelli, E., ... Weiner, H. L. (2008). Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature*, 453(7191), 65–71. <http://doi.org/10.1038/nature06880>
- Qureshi, O. S., Zheng, Y., Nakamura, K., Attridge, K., Manzotti, C., Schmidt, E. M., ... Sansom, D. M. (2011). Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science (New York, N.Y.)*, 332(6029), 600–603. <http://doi.org/10.1126/science.1202947>
- Rahman, I., Li, X. Y., Donaldson, K., Harrison, D. J., & MacNee, W. (1995). Glutathione homeostasis in alveolar epithelial cells in vitro and lung in vivo under oxidative stress. *The American Journal of Physiology*, 269(3 Pt 1), L285–292.
- Rahman, I., & MacNee, W. (2000). Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *The European Respiratory Journal*, 16(3), 534–554.
- Rahman, I., Smith, C. A., Lawson, M. F., Harrison, D. J., & MacNee, W. (1996). Induction of gamma-glutamylcysteine synthetase by cigarette smoke is associated with AP-1 in human alveolar epithelial cells. *FEBS Letters*, 396(1), 21–25.
- Rangasamy, T., Cho, C. Y., Thimmulappa, R. K., Zhen, L., Srisuma, S. S., Kensler, T. W., ... Biswal, S. (2004). Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced

- emphysema in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 114(9), 1248–1259. <http://doi.org/10.1172/JCI21146>
- Rao, P. E., Petrone, A. L., & Ponath, P. D. (2005). Differentiation and expansion of T cells with regulatory function from human peripheral lymphocytes by stimulation in the presence of TGF- $\beta$ . *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 174(3), 1446–1455.
- Rathmell, J. C., Vander Heiden, M. G., Harris, M. H., Frauwirth, K. A., & Thompson, C. B. (2000). In the absence of extrinsic signals, nutrient utilization by lymphocytes is insufficient to maintain either cell size or viability. *Molecular Cell*, 6(3), 683–692.
- Ravanat, J. L., Di Mascio, P., Martinez, G. R., Medeiros, M. H., & Cadet, J. (2000a). Singlet oxygen induces oxidation of cellular DNA. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(51), 40601–40604. <http://doi.org/10.1074/jbc.M006681200>
- Ravanat, J. L., Di Mascio, P., Martinez, G. R., Medeiros, M. H., & Cadet, J. (2000b). Singlet oxygen induces oxidation of cellular DNA. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(51), 40601–40604. <http://doi.org/10.1074/jbc.M006681200>
- Reboldi, A., Coisne, C., Baumjohann, D., Benvenuto, F., Bottinelli, D., Lira, S., ... Sallusto, F. (2009). C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nature Immunology*, 10(5), 514–523. <http://doi.org/10.1038/ni.1716>
- Ren, X., Ye, F., Jiang, Z., Chu, Y., Xiong, S., & Wang, Y. (2007). Involvement of cellular death in TRAIL/DR5-dependent suppression induced by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Cell Death and Differentiation*, 14(12), 2076–2084. <http://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402220>
- Renganathan, H., Vaidyanathan, H., Knapinska, A., & Ramos, J. W. (2005). Phosphorylation of PEA-15 switches its binding specificity from ERK/MAPK to FADD. *The Biochemical Journal*, 390(Pt 3), 729–735. <http://doi.org/10.1042/BJ20050378>
- Rennard, S. I. (2004). Cigarette smoke in research. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 31(5), 479–480. <http://doi.org/10.1165/rcmb.F284>
- Reynolds, H. Y. (1987). Lung inflammation: normal host defense or a complication of some diseases? *Annual Review of Medicine*, 38, 295–323. <http://doi.org/10.1146/annurev.me.38.020187.001455>
- Reynolds, P. (2013). Smoking and breast cancer. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 18(1), 15–23. <http://doi.org/10.1007/s10911-012-9269-x>
- Rhee, S. G., Chae, H. Z., & Kim, K. (2005). Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radical Biology & Medicine*, 38(12), 1543–1552. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.02.026>
- Richter, A., Löhning, M., & Radbruch, A. (1999). Instruction for cytokine expression in T helper lymphocytes in relation to proliferation and cell cycle progression. *The Journal of Experimental Medicine*, 190(10), 1439–1450.
- Riise, T., Nortvedt, M. W., & Ascherio, A. (2003). Smoking is a risk factor for multiple sclerosis. *Neurology*, 61(8), 1122–1124.
- Rom, O., Kaisari, S., Aizenbud, D., & Reznick, A. Z. (2012). Sarcopenia and smoking: a possible cellular model of cigarette smoke effects on muscle protein breakdown. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1259, 47–53. <http://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06532.x>
- Romagnani, S. (1997). The Th1/Th2 paradigm. *Immunology Today*, 18(6), 263–266.

- Ron-Harel, N., Sharpe, A. H., & Haigis, M. C. (2015). Mitochondrial metabolism in T cell activation and senescence: a mini-review. *Gerontology*, 61(2), 131–138. <http://doi.org/10.1159/000362502>
- Rooney, J. W., Hoey, T., & Glimcher, L. H. (1995). Coordinate and cooperative roles for NF-AT and AP-1 in the regulation of the murine IL-4 gene. *Immunity*, 2(5), 473–483.
- Roose, J. P., Diehn, M., Tomlinson, M. G., Lin, J., Alizadeh, A. A., Botstein, D., ... Weiss, A. (2003). T cell receptor-independent basal signaling via Erk and Abl kinases suppresses RAG gene expression. *PLoS Biology*, 1(2), E53. <http://doi.org/10.1371/journal.pbio.0000053>
- Roos-Engstrand, E., Ekstrand-Hammarström, B., Pourazar, J., Behndig, A. F., Bucht, A., & Blomberg, A. (2009). Influence of smoking cessation on airway T lymphocyte subsets in COPD. *COPD*, 6(2), 112–120. <http://doi.org/10.1080/15412550902755358>
- Roseman, C., Truedsson, L., & Kapetanovic, M. C. (2012). The effect of smoking and alcohol consumption on markers of systemic inflammation, immunoglobulin levels and immune response following pneumococcal vaccination in patients with arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 14(4), R170. <http://doi.org/10.1186/ar3923>
- Roskoski, R. (2012a). ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacological Research*, 66(2), 105–143. <http://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.04.005>
- Roskoski, R. (2012b). MEK1/2 dual-specificity protein kinases: structure and regulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 417(1), 5–10. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.11.145>
- Ross, D., & Siegel, D. (2004). NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1, DT-diaphorase), functions and pharmacogenetics. *Methods in Enzymology*, 382, 115–144. [http://doi.org/10.1016/S0076-6879\(04\)82008-1](http://doi.org/10.1016/S0076-6879(04)82008-1)
- Rothe, G., & Valet, G. (1990). Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescein. *Journal of Leukocyte Biology*, 47(5), 440–448.
- Roussel, L., Houle, F., Chan, C., Yao, Y., Bérubé, J., Olivenstein, R., ... Rousseau, S. (2010). IL-17 promotes p38 MAPK-dependent endothelial activation enhancing neutrophil recruitment to sites of inflammation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 184(8), 4531–4537. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.0903162>
- Roux, P. P., & Blenis, J. (2004). ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(2), 320–344. <http://doi.org/10.1128/MMBR.68.2.320-344.2004>
- Ruffels, J., Griffin, M., & Dickenson, J. M. (2004). Activation of ERK1/2, JNK and PKB by hydrogen peroxide in human SH-SY5Y neuroblastoma cells: role of ERK1/2 in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death. *European Journal of Pharmacology*, 483(2–3), 163–173.
- Ruprecht, C. R., Gattorno, M., Ferlito, F., Gregorio, A., Martini, A., Lanzavecchia, A., & Sallusto, F. (2005). Coexpression of CD25 and CD27 identifies FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells in inflamed synovia. *The Journal of Experimental Medicine*, 201(11), 1793–1803. <http://doi.org/10.1084/jem.20050085>
- Russo, R. C., Garcia, C. C., Teixeira, M. M., & Amaral, F. A. (2014). The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. *Expert Review of Clinical Immunology*, 10(5), 593–619. <http://doi.org/10.1586/1744666X.2014.894886>
- Rusznak, C., Mills, P. R., Devalia, J. L., Sapsford, R. J., Davies, R. J., & Lozewicz, S. (2000). Effect of cigarette smoke on the permeability and IL-1 $\beta$  and sICAM-1 release from cultured human

- bronchial epithelial cells of never-smokers, smokers, and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 23(4), 530–536. <http://doi.org/10.1165/ajrcmb.23.4.3959>
- Rutault, K., Alderman, C., Chain, B. M., & Katz, D. R. (1999). Reactive oxygen species activate human peripheral blood dendritic cells. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(1–2), 232–238.
- Sa, S. M., Valdez, P. A., Wu, J., Jung, K., Zhong, F., Hall, L., ... Ouyang, W. (2007). The effects of IL-20 subfamily cytokines on reconstituted human epidermis suggest potential roles in cutaneous innate defense and pathogenic adaptive immunity in psoriasis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 178(4), 2229–2240.
- Saag, K. G., Cerhan, J. R., Kolluri, S., Ohashi, K., Hunninghake, G. W., & Schwartz, D. A. (1997). Cigarette smoking and rheumatoid arthritis severity. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 56(8), 463–469.
- Sadlack, B., Merz, H., Schorle, H., Schimpl, A., Feller, A. C., & Horak, I. (1993). Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell*, 75(2), 253–261.
- Saetta, M. (1999). Airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 160(5 Pt 2), S17-20. [http://doi.org/10.1164/ajrccm.160.supplement\\_1.6](http://doi.org/10.1164/ajrccm.160.supplement_1.6)
- Saetta, M., Di Stefano, A., Turato, G., Facchini, F. M., Corbino, L., Mapp, C. E., ... Fabbri, L. M. (1998). CD8+ T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 157(3 Pt 1), 822–826. <http://doi.org/10.1164/ajrccm.157.3.9709027>
- 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. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 155(3), 1151–1164.
- Sallusto, F. (1999). The role of chemokines and chemokine receptors in T cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Haematologica*, 84 Suppl EHA-4, 28–31.
- Santarasci, V., Maggi, L., Capone, M., Frosali, F., Querci, V., De Palma, R., ... Annunziato, F. (2009). TGF-beta indirectly favors the development of human Th17 cells by inhibiting Th1 cells. *European Journal of Immunology*, 39(1), 207–215. <http://doi.org/10.1002/eji.200838748>
- Santarasci, V., Maggi, L., Capone, M., Querci, V., Beltrame, L., Cavalieri, D., ... 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), 201–214. <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.12.013>
- Sapkota, A. R., Berger, S., & Vogel, T. M. (2010). Human pathogens abundant in the bacterial metagenome of cigarettes. *Environmental Health Perspectives*, 118(3), 351–356. <http://doi.org/10.1289/ehp.0901201>
- Sarris, M., Andersen, K. G., Randow, F., Mayr, L., & Betz, A. G. (2008). Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition. *Immunity*, 28(3), 402–413. <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.01.012>
- Sasco, A. J., Secretan, M. B., & Straif, K. (2004). Tobacco smoking and cancer: a brief review of recent epidemiological evidence. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 45 Suppl 2, S3-9. <http://doi.org/10.1016/j.lungcan.2004.07.998>

- Savale, L., Chaouat, A., Bastuji-Garin, S., Marcos, E., Boyer, L., Maitre, B., ... Adnot, S. (2009). Shortened telomeres in circulating leukocytes of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 179(7), 566–571. <http://doi.org/10.1164/rccm.200809-1398OC>
- Sazanov, L. A. (2007). Respiratory complex I: mechanistic and structural insights provided by the crystal structure of the hydrophilic domain. *Biochemistry*, 46(9), 2275–2288. <http://doi.org/10.1021/bi602508x>
- Schade, A. E., & Levine, A. D. (2004). Cutting edge: extracellular signal-regulated kinases 1/2 function as integrators of TCR signal strength. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 172(10), 5828–5832.
- Schaerli, P., Britschgi, M., Keller, M., Steiner, U. C., Steinmann, L. S., Moser, B., & Pichler, W. J. (2004). Characterization of human T cells that regulate neutrophilic skin inflammation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 173(3), 2151–2158.
- Schmitt, N., Liu, Y., Bentebibel, S.-E., Munagala, I., Bourdery, L., Venuprasad, K., ... Ueno, H. (2014). The cytokine TGF- $\beta$  co-opts signaling via STAT3-STAT4 to promote the differentiation of human TFH cells. *Nature Immunology*, 15(9), 856–865. <http://doi.org/10.1038/ni.2947>
- Schmittgen, T. D., Lee, E. J., & Jiang, J. (2008). High-throughput real-time PCR. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 429, 89–98. [http://doi.org/10.1007/978-1-60327-040-3\\_7](http://doi.org/10.1007/978-1-60327-040-3_7)
- Schröder, J. M., Mrowietz, U., & Christophers, E. (1988). Purification and partial biologic characterization of a human lymphocyte-derived peptide with potent neutrophil-stimulating activity. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 140(10), 3534–3540.
- Schwartzberg, P. L., Finkelstein, L. D., & Readinger, J. A. (2005). TEC-family kinases: regulators of T-helper-cell differentiation. *Nature Reviews. Immunology*, 5(4), 284–295. <http://doi.org/10.1038/nri1591>
- Schwindling, C., Quintana, A., Krause, E., & Hoth, M. (2010). Mitochondria positioning controls local calcium influx in T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 184(1), 184–190. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.0902872>
- Seddiki, N., Santner-Nanan, B., Martinson, J., Zaunders, J., Sasson, S., Landay, A., ... Fazekas de St Groth, B. (2006). Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 203(7), 1693–1700. <http://doi.org/10.1084/jem.20060468>
- Segal, B. H., Sakamoto, N., Patel, M., Maemura, K., Klein, A. S., Holland, S. M., & Bulkley, G. B. (2000). Xanthine oxidase contributes to host defense against *Burkholderia cepacia* in the p47(phox<sup>-/-</sup>) mouse model of chronic granulomatous disease. *Infection and Immunity*, 68(4), 2374–2378.
- Segal, L. N., Clemente, J. C., Tsay, J.-C. J., Koralov, S. B., Keller, B. C., Wu, B. G., ... Weiden, M. D. (2016). Enrichment of the lung microbiome with oral taxa is associated with lung inflammation of a Th17 phenotype. *Nature Microbiology*, 1, 16031. <http://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.31>
- Sena, L. A., Li, S., Jairaman, A., Prakriya, M., Ezponda, T., Hildeman, D. A., ... Chandel, N. S. (2013). Mitochondria are required for antigen-specific T cell activation through reactive oxygen species signaling. *Immunity*, 38(2), 225–236. <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.10.020>

- Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D., & Lowe, S. W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*, 88(5), 593–602.
- 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. *The Journal of Experimental Medicine*, 201(5), 723–735. <http://doi.org/10.1084/jem.20041982>
- Shaler, C. R., Horvath, C. N., McCormick, S., Jeyanathan, M., Khera, A., Zganiacz, A., ... Xing, Z. (2013). Continuous and discontinuous cigarette smoke exposure differentially affects protective Th1 immunity against pulmonary tuberculosis. *PloS One*, 8(3), e59185. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0059185>
- Shan, M., Cheng, H.-F., Song, L.-Z., Roberts, L., Green, L., Hacken-Bitar, J., ... Kheradmand, F. (2009). Lung myeloid dendritic cells coordinately induce TH1 and TH17 responses in human emphysema. *Science Translational Medicine*, 1(4), 4ra10. <http://doi.org/10.1126/scitranslmed.3000154>
- Shan, M., Yuan, X., Song, L.-Z., Roberts, L., Zarinkamar, N., Seryshev, A., ... Kheradmand, F. (2012). Cigarette smoke induction of osteopontin (SPP1) mediates T(H)17 inflammation in human and experimental emphysema. *Science Translational Medicine*, 4(117), 117ra9. <http://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003041>
- Shaykhiev, R., Krause, A., Salit, J., Strulovici-Barel, Y., Harvey, B.-G., O'Connor, T. P., & Crystal, R. G. (2009). Smoking-dependent reprogramming of alveolar macrophage polarization: implication for pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 183(4), 2867–2883. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.0900473>
- Shi, G., Ramaswamy, M., Vistica, B. P., Cox, C. A., Tan, C., Wawrousek, E. F., ... Gery, I. (2009). Unlike Th1, Th17 cells mediate sustained autoimmune inflammation and are highly resistant to restimulation-induced cell death. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 183(11), 7547–7556. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.0900519>
- Shi, L. Z., Wang, R., Huang, G., Vogel, P., Neale, G., Green, D. R., & Chi, H. (2011). HIF1alpha-dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of TH17 and Treg cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 208(7), 1367–1376. <http://doi.org/10.1084/jem.20110278>
- Shi, Y. (2002). Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Molecular Cell*, 9(3), 459–470.
- Shieh, S. Y., Ikeda, M., Taya, Y., & Prives, C. (1997). DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell*, 91(3), 325–334.
- Shiloh, Y. (2006). The ATM-mediated DNA-damage response: taking shape. *Trends in Biochemical Sciences*, 31(7), 402–410. <http://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.05.004>
- Shin, J., Yang, J., Lee, J. C., & Baek, K.-H. (2013). Depletion of ERK2 but not ERK1 abrogates oncogenic Ras-induced senescence. *Cellular Signalling*, 25(12), 2540–2547. <http://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.08.014>
- Shinton, R., & Beevers, G. (1989). Meta-analysis of relation between cigarette smoking and stroke. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 298(6676), 789–794.
- Siegel, D., Yan, C., & Ross, D. (2012). NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in the sensitivity and resistance to antitumor quinones. *Biochemical Pharmacology*, 83(8), 1033–1040. <http://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.12.017>

- Singh, A., Rangasamy, T., Thimmulappa, R. K., Lee, H., Osburn, W. O., Brigelius-Flohé, R., ... Biswal, S. (2006). Glutathione peroxidase 2, the major cigarette smoke-inducible isoform of GPX in lungs, is regulated by Nrf2. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 35(6), 639–650. <http://doi.org/10.1165/rcmb.2005-0325OC>
- Singh, A., & Settleman, J. (2010). EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene*, 29(34), 4741–4751. <http://doi.org/10.1038/onc.2010.215>
- Singh, S. P., Zhang, H. H., Foley, J. F., Hedrick, M. N., & Farber, J. M. (2008). Human T cells that are able to produce IL-17 express the chemokine receptor CCR6. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 180(1), 214–221.
- Sitkovsky, M. V., Lukashev, D., Apasov, S., Kojima, H., Koshiba, M., Caldwell, C., ... Thiel, M. (2004). Physiological control of immune response and inflammatory tissue damage by hypoxia-inducible factors and adenosine A2A receptors. *Annual Review of Immunology*, 22, 657–682. <http://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104731>
- Sköld, C. M., Lundahl, J., Halldén, G., Hallgren, M., & Eklund, A. (1996). Chronic smoke exposure alters the phenotype pattern and the metabolic response in human alveolar macrophages. *Clinical and Experimental Immunology*, 106(1), 108–113.
- Slattery, M. L., Schuman, K. L., West, D. W., French, T. K., & Robison, L. M. (1989). Nutrient intake and ovarian cancer. *American Journal of Epidemiology*, 130(3), 497–502.
- Slebos, D.-J., Ryter, S. W., van der Toorn, M., Liu, F., Guo, F., Baty, C. J., ... Choi, A. M. K. (2007). Mitochondrial localization and function of heme oxygenase-1 in cigarette smoke-induced cell death. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 36(4), 409–417. <http://doi.org/10.1165/rcmb.2006-0214OC>
- Smith, C. J., & Fischer, T. H. (2001). Particulate and vapor phase constituents of cigarette mainstream smoke and risk of myocardial infarction. *Atherosclerosis*, 158(2), 257–267.
- Smith, M. R., Kinmonth, A.-L., Luben, R. N., Bingham, S., Day, N. E., Wareham, N. J., ... Khaw, K.-T. (2003). Smoking status and differential white cell count in men and women in the EPIC-Norfolk population. *Atherosclerosis*, 169(2), 331–337.
- Smyth, L. J. C., Starkey, C., Vestbo, J., & Singh, D. (2007). CD4-regulatory cells in COPD patients. *Chest*, 132(1), 156–163. <http://doi.org/10.1378/chest.07-0083>
- Sohn, C., Lee, A., Qiao, Y., Loupasakis, K., Ivashkiv, L. B., & Kalliolias, G. D. (2015). Prolonged tumor necrosis factor  $\alpha$  primes fibroblast-like synoviocytes in a gene-specific manner by altering chromatin. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)*, 67(1), 86–95. <http://doi.org/10.1002/art.38871>
- Soltaninassab, S. R., Sekhar, K. R., Meredith, M. J., & Freeman, M. L. (2000). Multi-faceted regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase. *Journal of Cellular Physiology*, 182(2), 163–170. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(200002\)182:2<163::AID-JCP4>3.0.CO;2-1](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(200002)182:2<163::AID-JCP4>3.0.CO;2-1)
- Son, Y., Cheong, Y.-K., Kim, N.-H., Chung, H.-T., Kang, D. G., & Pae, H.-O. (2011). Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species: How Can ROS Activate MAPK Pathways? *Journal of Signal Transduction*, 2011, 792639. <http://doi.org/10.1155/2011/792639>
- Song, Z., von Figura, G., Liu, Y., Kraus, J. M., Torrice, C., Dillon, P., ... Lenhard Rudolph, K. (2010). Lifestyle impacts on the aging-associated expression of biomarkers of DNA damage and telomere dysfunction in human blood. *Aging Cell*, 9(4), 607–615. <http://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2010.00583.x>

- Sopori, M. (2002). Effects of cigarette smoke on the immune system. *Nature Reviews. Immunology*, 2(5), 372–377. <http://doi.org/10.1038/nri803>
- Sopori, M. L., Cherian, S., Chilukuri, R., & Shopp, G. M. (1989). Cigarette smoke causes inhibition of the immune response to intratracheally administered antigens. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 97(3), 489–499.
- Sopori, M. L., Gairola, C. C., DeLucia, A. J., Bryant, L. R., & Cherian, S. (1985). Immune responsiveness of monkeys exposed chronically to cigarette smoke. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 36(3), 338–344.
- Spolski, R., Kashyap, M., Robinson, C., Yu, Z., & Leonard, W. J. (2008). IL-21 signaling is critical for the development of type I diabetes in the NOD mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(37), 14028–14033. <http://doi.org/10.1073/pnas.0804358105>
- Staal, F. J. T., & Sen, J. M. (2008). The canonical Wnt signaling pathway plays an important role in lymphopoiesis and hematopoiesis. *European Journal of Immunology*, 38(7), 1788–1794. <http://doi.org/10.1002/eji.200738118>
- Stahl, W., & Sies, H. (2002). Carotenoids and protection against solar UV radiation. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology*, 15(5), 291–296. <http://doi.org/64532>
- Starnes, T., Robertson, M. J., Sledge, G., Kelich, S., Nakshatri, H., Broxmeyer, H. E., & 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. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 167(8), 4137–4140.
- Stein, G. H., Drullinger, L. F., Robetorye, R. S., Pereira-Smith, O. M., & Smith, J. R. (1991). Senescent cells fail to express cdc2, cycA, and cycB in response to mitogen stimulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(24), 11012–11016.
- St-Laurent, J., Proulx, L.-I., Boulet, L.-P., & Bissonnette, E. (2009). Comparison of two in vitro models of cigarette smoke exposure. *Inhalation Toxicology*, 21(13), 1148–1153. <http://doi.org/10.3109/08958370902926692>
- Stocker, R., Yamamoto, Y., McDonagh, A. F., Glazer, A. N., & Ames, B. N. (1987). Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science (New York, N.Y.)*, 235(4792), 1043–1046.
- Stone, P. C. W., Fisher, A. C., Rainger, G. E., & Nash, G. B. (2002). Neutrophil capture by selectins on endothelial cells exposed to cigarette smoke. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 295(5), 1150–1155.
- Stowe, D. F., & Camara, A. K. S. (2009). Mitochondrial reactive oxygen species production in excitable cells: modulators of mitochondrial and cell function. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11(6), 1373–1414. <http://doi.org/10.1089/ars.2008.2331>
- Strauss, L., Bergmann, C., & Whiteside, T. L. (2009). Human circulating CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells kill autologous CD8<sup>+</sup> but not CD4<sup>+</sup> responder cells by Fas-mediated apoptosis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 182(3), 1469–1480.
- Strioga, M., Pasukoniene, V., & Characiejus, D. (2011). CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> and CD8<sup>+</sup> CD57<sup>+</sup> T cells and their role in health and disease. *Immunology*, 134(1), 17–32. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2011.03470.x>

- Stumhofer, J. S., Laurence, A., Wilson, E. H., Huang, E., Tato, C. M., Johnson, L. M., ... Hunter, C. A. (2006). Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nature Immunology*, 7(9), 937–945. <http://doi.org/10.1038/ni1376>
- Su, X., Ye, J., Hsueh, E. C., Zhang, Y., Hoft, D. F., & Peng, G. (2010). Tumor microenvironments direct the recruitment and expansion of human Th17 cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 184(3), 1630–1641. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.0902813>
- Sugimoto, K., Ogawa, A., Mizoguchi, E., Shimomura, Y., Andoh, A., Bhan, A. K., ... Mizoguchi, A. (2008). IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(2), 534–544. <http://doi.org/10.1172/JCI33194>
- Suzuki, N., Wakisaka, S., Takeba, Y., Mihara, S., & Sakane, T. (1999). Effects of cigarette smoking on Fas/Fas ligand expression of human lymphocytes. *Cellular Immunology*, 192(1), 48–53. <http://doi.org/10.1006/cimm.1998.1432>
- Szabo, S. J., Kim, S. T., Costa, G. L., Zhang, X., Fathman, C. G., & Glimcher, L. H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*, 100(6), 655–669.
- Sze, M. A., Dimitriu, P. A., Hayashi, S., Elliott, W. M., McDonough, J. E., Gosselink, J. V., ... Hogg, J. C. (2012). The lung tissue microbiome in chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 185(10), 1073–1080. <http://doi.org/10.1164/rccm.201111-2075OC>
- Taguchi, K., Motohashi, H., & Yamamoto, M. (2011). Molecular mechanisms of the Keap1–Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 16(2), 123–140. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2010.01473.x>
- Takahashi, A., Hanson, M. G. V., Norell, H. R., Havelka, A. M., Kono, K., Malmberg, K.-J., & Kiessling, R. V. R. (2005). Preferential cell death of CD8<sup>+</sup> effector memory (CCR7-CD45RA<sup>+</sup>) T cells by hydrogen peroxide-induced oxidative stress. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 174(10), 6080–6087.
- Takeuchi, M., Nagai, S., Nakajima, A., Shinya, M., Tsukano, C., Asada, H., ... Izumi, T. (2001). Inhibition of lung natural killer cell activity by smoking: the role of alveolar macrophages. *Respiration; International Review of Thoracic Diseases*, 68(3), 262–267. <http://doi.org/10.1159/000050508>
- Talhout, R., Opperhuizen, A., & van Amsterdam, J. G. C. (2006). Sugars as tobacco ingredient: Effects on mainstream smoke composition. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 44(11), 1789–1798. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2006.06.016>
- Tan, A. H.-M., & Lam, K.-P. (2010). Pharmacologic inhibition of MEK-ERK signaling enhances Th17 differentiation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 184(4), 1849–1857. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.0901509>
- Tanaka, K., Tsuji, I., Wakai, K., Nagata, C., Mizoue, T., Inoue, M., ... Research Group for the Development and Evaluation of Cancer Prevention Strategies in Japan. (2006). Cigarette smoking and liver cancer risk: an evaluation based on a systematic review of epidemiologic evidence among Japanese. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 36(7), 445–456. <http://doi.org/10.1093/jjco/hyl040>
- Tarasov, A. I., Griffiths, E. J., & Rutter, G. A. (2012). Regulation of ATP production by mitochondrial Ca<sup>2+</sup>. *Cell Calcium*, 52(1), 28–35. <http://doi.org/10.1016/j.ceca.2012.03.003>

- Tepper, C. G., Seldin, M. F., & Mudryj, M. (2000). Fas-mediated apoptosis of proliferating, transiently growth-arrested, and senescent normal human fibroblasts. *Experimental Cell Research*, 260(1), 9–19. <http://doi.org/10.1006/excr.2000.4990>
- Tesoriero, J. M., Gieryic, S. M., Carrascal, A., & Lavigne, H. E. (2010). Smoking among HIV positive New Yorkers: prevalence, frequency, and opportunities for cessation. *AIDS and Behavior*, 14(4), 824–835. <http://doi.org/10.1007/s10461-008-9449-2>
- Tetley, T. D. (2005). Inflammatory cells and chronic obstructive pulmonary disease. *Current Drug Targets. Inflammation and Allergy*, 4(6), 607–618.
- Thibaudin, M., Chaix, M., Boidot, R., Végran, F., Derangère, V., Limagne, E., ... Ghiringhelli, F. (2016). Human ectonucleotidase-expressing CD25(high) Th17 cells accumulate in breast cancer tumors and exert immunosuppressive functions. *Oncoimmunology*, 5(1), e1055444. <http://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1055444>
- Thorén, F. B., Betten, A., Romero, A. I., & Hellstrand, K. (2007). Cutting edge: Antioxidative properties of myeloid dendritic cells: protection of T cells and NK cells from oxygen radical-induced inactivation and apoptosis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 179(1), 21–25.
- Thornton, A. M., & Shevach, E. M. (1998). CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *The Journal of Experimental Medicine*, 188(2), 287–296.
- Tibbetts, R. S., Brumbaugh, K. M., Williams, J. M., Sarkaria, J. N., Cliby, W. A., Shieh, S. Y., ... Abraham, R. T. (1999). A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes & Development*, 13(2), 152–157.
- Tilp, C., Bucher, H., Haas, H., Duechs, M. J., Wex, E., & Erb, K. J. (2016). Effects of conventional tobacco smoke and nicotine-free cigarette smoke on airway inflammation, airway remodelling and lung function in a triple allergen model of severe asthma. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 46(7), 957–972. <http://doi.org/10.1111/cea.12665>
- Tirosh, O., Shilo, S., Aronis, A., & Sen, C. K. (2003). Redox regulation of mitochondrial permeability transition: effects of uncoupler, lipoic acid and its positively charged analog LA-plus and selenium. *BioFactors (Oxford, England)*, 17(1–4), 297–306.
- Tollerud, D. J., Brown, L. M., Blattner, W. A., Mann, D. L., Pankiw-Trost, L., & Hoover, R. N. (1991). T cell subsets in healthy black smokers and nonsmokers. Evidence for ethnic group as an important response modifier. *The American Review of Respiratory Disease*, 144(3 Pt 1), 612–616. [http://doi.org/10.1164/ajrccm/144.3\\_Pt\\_1.612](http://doi.org/10.1164/ajrccm/144.3_Pt_1.612)
- Tomida, T., Hirose, K., Takizawa, A., Shibasaki, F., & Iino, M. (2003). NFAT functions as a working memory of Ca<sup>2+</sup> signals in decoding Ca<sup>2+</sup> oscillation. *The EMBO Journal*, 22(15), 3825–3832. <http://doi.org/10.1093/emboj/cdg381>
- Toninello, A., Salvi, M., Pietrangeli, P., & Mondovì, B. (2004). Biogenic amines and apoptosis: minireview article. *Amino Acids*, 26(4), 339–343. <http://doi.org/10.1007/s00726-004-0080-x>
- Toy, D., Kugler, D., Wolfson, M., Vanden Bos, T., Gurgel, J., Derry, J., ... Peschon, J. (2006). Cutting edge: interleukin 17 signals through a heteromeric receptor complex. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 177(1), 36–39.
- Trédaniel, J., Boffetta, P., Buiatti, E., Saracci, R., & Hirsch, A. (1997). Tobacco smoking and gastric cancer: review and meta-analysis. *International Journal of Cancer*, 72(4), 565–573.

- Trifari, S., Kaplan, C. D., Tran, E. H., Crellin, N. K., & Spits, H. (2009). Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nature Immunology*, 10(8), 864–871. <http://doi.org/10.1038/ni.1770>
- Trosini-Desert, V., Germaud, P., & Dautzenberg, B. (2004). [Tobacco smoke and risk of bacterial infection]. *Revue Des Maladies Respiratoires*, 21(3 Pt 1), 539–547.
- Tse, H. M., Thayer, T. C., Steele, C., Cuda, C. M., Morel, L., Piganelli, J. D., & Mathews, C. E. (2010). NADPH oxidase deficiency regulates Th lineage commitment and modulates autoimmunity. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 185(9), 5247–5258. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001472>
- Tsoi, K. K. F., Pau, C. Y. Y., Wu, W. K. K., Chan, F. K. L., Griffiths, S., & Sung, J. J. Y. (2009). Cigarette smoking and the risk of colorectal cancer: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association*, 7(6), 682–688–5. <http://doi.org/10.1016/j.cgh.2009.02.016>
- Tsuchiya, M., Suematsu, M., & Suzuki, H. (1994). In vivo visualization of oxygen radical-dependent photoemission. *Methods in Enzymology*, 233, 128–140.
- Tsuji, T., Aoshiba, K., & Nagai, A. (2004). Cigarette smoke induces senescence in alveolar epithelial cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 31(6), 643–649. <http://doi.org/10.1165/rcmb.2003-0290OC>
- Tsuji, T., Aoshiba, K., & Nagai, A. (2006). Alveolar cell senescence in patients with pulmonary emphysema. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 174(8), 886–893. <http://doi.org/10.1164/rccm.200509-1374OC>
- Tumbarello, M., Tacconelli, E., Donati, K. G., Leone, F., Morace, G., Cauda, R., & Ortona, L. (1998). Nosocomial bloodstream infections in HIV-infected patients: attributable mortality and extension of hospital stay. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology: Official Publication of the International Retrovirology Association*, 19(5), 490–497.
- Turrens, J. F. (1997). Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Bioscience Reports*, 17(1), 3–8.
- Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology*, 552(Pt 2), 335–344. <http://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.049478>
- Uhlig, H. H., Coombes, J., Mottet, C., Izcue, A., Thompson, C., Fanger, A., ... Powrie, F. (2006). Characterization of Foxp3+CD4+CD25+ and IL-10-secreting CD4+CD25+ T cells during cure of colitis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 177(9), 5852–5860.
- Umemura, K., Itoh, T., Hamada, N., Fujita, Y., Akao, Y., Nozawa, Y., ... Ito, M. (2008). Preconditioning by sesquiterpene lactone enhances H2O2-induced Nrf2/ARE activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 368(4), 948–954. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.02.018>
- Upadhyay, A. K., Borbat, P. P., Wang, J., Freed, J. H., & Edmondson, D. E. (2008). Determination of the oligomeric states of human and rat monoamine oxidases in the outer mitochondrial membrane and octyl beta-D-glucopyranoside micelles using pulsed dipolar electron spin resonance spectroscopy. *Biochemistry*, 47(6), 1554–1566. <http://doi.org/10.1021/bi7021377>
- Valavanidis, A., Vlachogianni, T., & Fiotakis, K. (2009). Tobacco smoke: involvement of reactive oxygen species and stable free radicals in mechanisms of oxidative damage, carcinogenesis and

- synergistic effects with other respirable particles. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 6(2), 445–462. <http://doi.org/10.3390/ijerph6020445>
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44–84. <http://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>
- Vallejo, A. N. (2005). CD28 extinction in human T cells: altered functions and the program of T-cell senescence. *Immunological Reviews*, 205, 158–169. <http://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2005.00256.x>
- Valmori, D., Raffin, C., Raimbaud, I., & Ayyoub, M. (2010). Human ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> TH17 cells preferentially differentiate from naive FOXP3<sup>+</sup>Treg in the presence of lineage-specific polarizing factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(45), 19402–19407. <http://doi.org/10.1073/pnas.1008247107>
- van den Berg, R., Haenen, G. R., van den Berg, H., & Bast, A. (2001). Transcription factor NF-kappaB as a potential biomarker for oxidative stress. *The British Journal of Nutrition*, 86 Suppl 1, S121–127.
- van Eeden, S. F., & Hogg, J. C. (2000). The response of human bone marrow to chronic cigarette smoking. *The European Respiratory Journal*, 15(5), 915–921.
- van Loo, G., Saelens, X., Matthijssens, F., Schotte, P., Beyaert, R., Declercq, W., & Vandenabeele, P. (2002). Caspases are not localized in mitochondria during life or death. *Cell Death and Differentiation*, 9(11), 1207–1211. <http://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401101>
- van Oers, N. S., Killeen, N., & Weiss, A. (1994). ZAP-70 is constitutively associated with tyrosine-phosphorylated TCR zeta in murine thymocytes and lymph node T cells. *Immunity*, 1(8), 675–685.
- van Reyk, D. M., King, N. J., Dinauer, M. C., & Hunt, N. H. (2001a). The intracellular oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein in murine T lymphocytes. *Free Radical Biology & Medicine*, 30(1), 82–88.
- van Reyk, D. M., King, N. J., Dinauer, M. C., & Hunt, N. H. (2001b). The intracellular oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein in murine T lymphocytes. *Free Radical Biology & Medicine*, 30(1), 82–88.
- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009a). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5930), 1029–1033. <http://doi.org/10.1126/science.1160809>
- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009b). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5930), 1029–1033. <http://doi.org/10.1126/science.1160809>
- Vargas-Rojas, M. I., Ramírez-Venegas, A., Limón-Camacho, L., Ochoa, L., Hernández-Zenteno, R., & Sansores, R. H. (2011). Increase of Th17 cells in peripheral blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respiratory Medicine*, 105(11), 1648–1654. <http://doi.org/10.1016/j.rmed.2011.05.017>
- Vassallo, R., Tamada, K., Lau, J. S., Kroening, P. R., & Chen, L. (2005). Cigarette smoke extract suppresses human dendritic cell function leading to preferential induction of Th-2 priming. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 175(4), 2684–2691.

- 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. *The Journal of Experimental Medicine*, 206(1), 43–49. <http://doi.org/10.1084/jem.20081438>
- Veldhoen, M., Hirota, K., Westendorf, A. M., Buer, J., Dumoutier, L., Renauld, J.-C., & Stockinger, B. (2008). The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature*, 453(7191), 106–109. <http://doi.org/10.1038/nature06881>
- Veldhoen, M., Hocking, R. J., Flavell, R. A., & Stockinger, B. (2006). Signals mediated by transforming growth factor-beta initiate autoimmune encephalomyelitis, but chronic inflammation is needed to sustain disease. *Nature Immunology*, 7(11), 1151–1156. <http://doi.org/10.1038/ni1391>
- Vindis, C., Séguélas, M. H., Bianchi, P., Parini, A., & Cambon, C. (2000). Monoamine oxidase B induces ERK-dependent cell mitogenesis by hydrogen peroxide generation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 271(1), 181–185. <http://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2524>
- Volpe, E., Servant, N., Zollinger, R., Bogiatzi, S. I., Hupé, P., Barillot, E., & Soumelis, V. (2008). A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. *Nature Immunology*, 9(6), 650–657. <http://doi.org/10.1038/ni.1613>
- Voo, K. S., Wang, Y.-H., Santori, F. R., Boggiano, C., Wang, Y.-H., Arima, K., ... Liu, Y.-J. (2009). Identification of IL-17-producing FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(12), 4793–4798. <http://doi.org/10.1073/pnas.0900408106>
- Wagner, M., Hampel, B., Bernhard, D., Hala, M., Zwerschke, W., & Jansen-Dürr, P. (2001). Replicative senescence of human endothelial cells in vitro involves G1 arrest, polyploidization and senescence-associated apoptosis. *Experimental Gerontology*, 36(8), 1327–1347.
- Wan, Q., Kozhaya, L., ElHed, A., Ramesh, R., Carlson, T. J., Djuretic, I. M., ... Unutmaz, D. (2011). Cytokine signals through PI-3 kinase pathway modulate Th17 cytokine production by CCR6<sup>+</sup> human memory T cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 208(9), 1875–1887. <http://doi.org/10.1084/jem.20102516>
- Wang, D., Zhou, R., Yao, Y., Zhu, X., Yin, Y., Zhao, G., ... Sheng, Z. (2010). Stimulation of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor by nicotine increases suppressive capacity of naturally occurring CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in mice in vitro. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 335(3), 553–561. <http://doi.org/10.1124/jpet.110.169961>
- Wang, E. (1995). Senescent human fibroblasts resist programmed cell death, and failure to suppress bcl2 is involved. *Cancer Research*, 55(11), 2284–2292.
- Wang, H., Mo, P., Ren, S., & Yan, C. (2010). Activating transcription factor 3 activates p53 by preventing E6-associated protein from binding to E6. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(17), 13201–13210. <http://doi.org/10.1074/jbc.M109.058669>
- Wang, H., Ying, H., Wang, S., Gu, X., Weng, Y., Peng, W., ... Yu, W. (2015). Imbalance of peripheral blood Th17 and Treg responses in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *The Clinical Respiratory Journal*, 9 (3), 330–341. doi:10.1111/crj.12147.
- Wang, Y., Meng, A., & Zhou, D. (2004). Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase uncouples H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced senescent phenotype and cell cycle arrest in normal human diploid fibroblasts. *Experimental Cell Research*, 298(1), 188–196. <http://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.04.012>

- Wang, Y.-H., Voo, K. S., Liu, B., Chen, C.-Y., Uygungil, B., Spoede, W., ... Liu, Y.-J. (2010). A novel subset of CD4(+) T(H)2 memory/effector cells that produce inflammatory IL-17 cytokine and promote the exacerbation of chronic allergic asthma. *The Journal of Experimental Medicine*, 207(11), 2479–2491. <http://doi.org/10.1084/jem.20101376>
- Weaver, C. T., Hatton, R. D., Mangan, P. R., & Harrington, L. E. (2007). IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annual Review of Immunology*, 25, 821–852. <http://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141557>
- West, A. P., Shadel, G. S., & Ghosh, S. (2011). Mitochondria in innate immune responses. *Nature Reviews. Immunology*, 11(6), 389–402. <http://doi.org/10.1038/nri2975>
- Whitehurst, A., Cobb, M. H., & White, M. A. (2004). Stimulus-coupled spatial restriction of extracellular signal-regulated kinase 1/2 activity contributes to the specificity of signal-response pathways. *Molecular and Cellular Biology*, 24(23), 10145–10150. <http://doi.org/10.1128/MCB.24.23.10145-10150.2004>
- Whitehurst, C. E., & Geppert, T. D. (1996). MEK1 and the extracellular signal-regulated kinases are required for the stimulation of IL-2 gene transcription in T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 156(3), 1020–1029.
- Wikström, M., & Verkhovsky, M. I. (2007). Mechanism and energetics of proton translocation by the respiratory heme-copper oxidases. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1767(10), 1200–1214. <http://doi.org/10.1016/j.bbabo.2007.06.008>
- Williams, I. R. (2006). CCR6 and CCL20: partners in intestinal immunity and lymphorganogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1072, 52–61. <http://doi.org/10.1196/annals.1326.036>
- Wilson, D. M., & Barsky, D. (2001). The major human abasic endonuclease: formation, consequences and repair of abasic lesions in DNA. *Mutation Research*, 485(4), 283–307.
- Wilson, N. J., Boniface, K., Chan, J. R., McKenzie, B. S., Blumenschein, W. M., Mattson, J. D., ... de Waal Malefyt, R. (2007). Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nature Immunology*, 8(9), 950–957. <http://doi.org/10.1038/ni1497>
- Winterbourn, C. C. (2013). The biological chemistry of hydrogen peroxide. *Methods in Enzymology*, 528, 3–25. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-405881-1.00001-X>
- Witherden, I. R., Vanden Bon, E. J., Goldstraw, P., Ratcliffe, C., Pastorino, U., & Tetley, T. D. (2004). Primary human alveolar type II epithelial cell chemokine release: effects of cigarette smoke and neutrophil elastase. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 30(4), 500–509. <http://doi.org/10.1165/rcmb.4890>
- Witowski, J., Pawlaczyk, K., Breborowicz, A., Scheuren, A., Kuzlan-Pawlaczyk, M., Wisniewska, J., ... Jörres, A. (2000). IL-17 stimulates intraperitoneal neutrophil infiltration through the release of GRO alpha chemokine from mesothelial cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 165(10), 5814–5821.
- Wofford, J. A., Wieman, H. L., Jacobs, S. R., Zhao, Y., & Rathmell, J. C. (2008). IL-7 promotes Glut1 trafficking and glucose uptake via STAT5-mediated activation of Akt to support T-cell survival. *Blood*, 111(4), 2101–2111. <http://doi.org/10.1182/blood-2007-06-096297>
- 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 Reviews*, 17(5), 367–380. <http://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2006.09.001>

- Wong, C. K., Ho, C. Y., Ko, F. W., Chan, C. H., Ho, A. S., Hui, D. S., & Lam, C. W. (2001). Proinflammatory cytokines (IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and Th cytokines (IFN-gamma, IL-4, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma. *Clinical and Experimental Immunology*, 125(2), 177–183.
- Wooten, J. B., Chouchane, S., & McGrath, T. E. (2006). Tobacco Smoke Constituents Affecting Oxidative Stress. In B. B. Halliwell & H. E. Poulsen (Eds.), *Cigarette Smoke and Oxidative Stress* (pp. 5–46). Springer Berlin Heidelberg. Retrieved from [http://link.springer.com/chapter/10.1007/3-540-32232-9\\_2](http://link.springer.com/chapter/10.1007/3-540-32232-9_2)
- Wright, J. F., Guo, Y., Quazi, A., Luxenberg, D. P., Bennett, F., Ross, J. F., ... Wolfman, N. M. (2007). Identification of an interleukin 17F/17A heterodimer in activated human CD4+ T cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(18), 13447–13455. <http://doi.org/10.1074/jbc.M700499200>
- Wu, C., Yosef, N., Thalhamer, T., Zhu, C., Xiao, S., Kishi, Y., Regev, A. & Vijay K. Kuchroo. (2013) « Induction of Pathogenic TH17 Cells by Inducible Salt-Sensing Kinase SGK1 ». *Nature* 496, n° 7446 : 513-17. doi:10.1038/nature11984.
- Wu, C.-Y., Kirman, J. R., Rotte, M. J., Davey, D. F., Perfetto, S. P., Rhee, E. G., ... Seder, R. A. (2002). Distinct lineages of T(H)1 cells have differential capacities for memory cell generation in vivo. *Nature Immunology*, 3(9), 852–858. <http://doi.org/10.1038/ni832>
- Wu, J. N., & Koretzky, G. A. (2004). The SLP-76 family of adapter proteins. *Seminars in Immunology*, 16(6), 379–393. <http://doi.org/10.1016/j.smim.2004.08.018>
- Wu, P.-K., Hong, S.-K., Yoon, S.-H., & Park, J.-I. (2015). Active ERK2 is sufficient to mediate growth arrest and differentiation signaling. *The FEBS Journal*, 282(6), 1017–1030. <http://doi.org/10.1111/febs.13197>
- Wu, W., Patel, K. B., Booth, J. L., Zhang, W., & Metcalf, J. P. (2011). Cigarette smoke extract suppresses the RIG-I-initiated innate immune response to influenza virus in the human lung. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 300(6), L821-830. <http://doi.org/10.1152/ajplung.00267.2010>
- Xu, Y., Li, H., Bajrami, B., Kwak, H., Cao, S., Liu, P., ... Luo, H. R. (2013). Cigarette smoke (CS) and nicotine delay neutrophil spontaneous death via suppressing production of diphosphoinositol pentakisphosphate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(19), 7726–7731. <http://doi.org/10.1073/pnas.1302906110>
- Xu, Y., Li, N., Xiang, R., & Sun, P. (2014). Emerging roles of the p38 MAPK and PI3K/AKT/mTOR pathways in oncogene-induced senescence. *Trends in Biochemical Sciences*, 39(6), 268–276. <http://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.04.004>
- Yamaguchi, T., & Sakaguchi, S. (2006). Skin controls immune regulators. *Nature Medicine*, 12(12), 1358–1359. <http://doi.org/10.1038/nm1206-1358>
- Yamane, H., Zhu, J., & Paul, W. E. (2005). Independent roles for IL-2 and GATA-3 in stimulating naive CD4+ T cells to generate a Th2-inducing cytokine environment. *The Journal of Experimental Medicine*, 202(6), 793–804. <http://doi.org/10.1084/jem.20051304>
- Yamashita, M., Shinnakasu, R., Asou, H., Kimura, M., Hasegawa, A., Hashimoto, K., ... Nakayama, T. (2005). Ras-ERK MAPK cascade regulates GATA3 stability and Th2 differentiation through ubiquitin-proteasome pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(33), 29409–29419. <http://doi.org/10.1074/jbc.M502333200>

- Yan, C., Lu, D., Hai, T., & Boyd, D. D. (2005). Activating transcription factor 3, a stress sensor, activates p53 by blocking its ubiquitination. *The EMBO Journal*, 24(13), 2425–2435. <http://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600712>
- Yan, F., Williams, S., Griffin, G. D., Jagannathan, R., Plunkett, S. E., Shafer, K. H., & Vo-Dinh, T. (2005). Near-real-time determination of hydrogen peroxide generated from cigarette smoke. *Journal of Environmental Monitoring: JEM*, 7(7), 681–687. <http://doi.org/10.1039/b502061a>
- Yan, Z., Garg, S. K., & Banerjee, R. (2010). Regulatory T cells interfere with glutathione metabolism in dendritic cells and T cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(53), 41525–41532. <http://doi.org/10.1074/jbc.M110.189944>
- Yan, Z., Garg, S. K., Kipnis, J., & Banerjee, R. (2009). Extracellular redox modulation by regulatory T cells. *Nature Chemical Biology*, 5(10), 721–723. <http://doi.org/10.1038/nchembio.212>
- Yanagita, M., Mori, K., Kobayashi, R., Kojima, Y., Kubota, M., Miki, K., ... Murakami, S. (2012). Immunomodulation of dendritic cells differentiated in the presence of nicotine with lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis*. *European Journal of Oral Sciences*, 120(5), 408–414. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2012.00992.x>
- Yang, L., Anderson, D. E., Baecher-Allan, C., Hastings, W. D., Bettelli, E., Oukka, M., ... Hafler, D. A. (2008). IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature*, 454(7202), 350–352. <http://doi.org/10.1038/nature07021>
- Yang, X. O., Panopoulos, A. D., Nurieva, R., Chang, S. H., Wang, D., Watowich, S. S., & Dong, C. (2007). STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(13), 9358–9363. <http://doi.org/10.1074/jbc.C600321200>
- Yaqoob, P., & Calder, P. C. (1997). Glutamine requirement of proliferating T lymphocytes. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 13(7–8), 646–651.
- Yaqoob, P., & Calder, P. C. (1998). Cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells: differential sensitivity to glutamine availability. *Cytokine*, 10(10), 790–794. <http://doi.org/10.1006/cyto.1998.0358>
- Ye, J., Huang, X., Hsueh, E. C., Zhang, Q., Ma, C., Zhang, Y., ... Peng, G. (2012). Human regulatory T cells induce T-lymphocyte senescence. *Blood*, 120(10), 2021–2031. <http://doi.org/10.1182/blood-2012-03-416040>
- Ye, J., Ma, C., Hsueh, E. C., Dou, J., Mo, W., Liu, S., ... Peng, G. (2014). TLR8 signaling enhances tumor immunity by preventing tumor-induced T-cell senescence. *EMBO Molecular Medicine*, 6(10), 1294–1311. <http://doi.org/10.15252/emmm.201403918>
- Ye, P., Rodriguez, F. H., Kanaly, S., Stocking, K. L., Schurr, J., Schwarzenberger, P., ... Kolls, J. K. (2001). Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *The Journal of Experimental Medicine*, 194(4), 519–527.
- Yoshino, I., & Maehara, Y. (2007). Impact of smoking status on the biological behavior of lung cancer. *Surgery Today*, 37(9), 725–734. <http://doi.org/10.1007/s00595-007-3516-6>
- Yuan, F., Fu, X., Shi, H., Chen, G., Dong, P., & Zhang, W. (2014). Induction of murine macrophage M2 polarization by cigarette smoke extract via the JAK2/STAT3 pathway. *PloS One*, 9(9), e107063. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0107063>
- Zafarullah, M., Li, W. Q., Sylvester, J., & Ahmad, M. (2003). Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 60(1), 6–20.

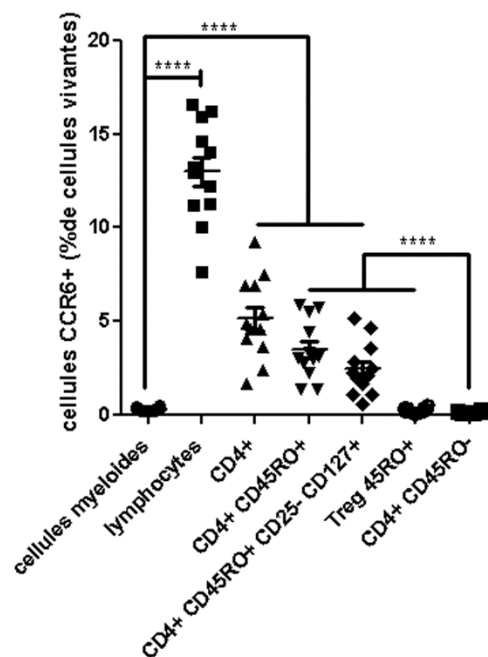
- Zangar, R. C., Davydov, D. R., & Verma, S. (2004). Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 199(3), 316–331. <http://doi.org/10.1016/j.taap.2004.01.018>
- Zenewicz, L. A., Yancopoulos, G. D., Valenzuela, D. M., Murphy, A. J., Karow, M., & Flavell, R. A. (2007). Interleukin-22 but not interleukin-17 provides protection to hepatocytes during acute liver inflammation. *Immunity*, 27(4), 647–659. <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.07.023>
- Zhang, D. H., Cohn, L., Ray, P., Bottomly, K., & Ray, A. (1997). Transcription factor GATA-3 is differentially expressed in murine Th1 and Th2 cells and controls Th2-specific expression of the interleukin-5 gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(34), 21597–21603.
- Zhang, H., Liu, H., Borok, Z., Davies, K. J. A., Ursini, F., & Forman, H. J. (2012). Cigarette smoke extract stimulates epithelial-mesenchymal transition through Src activation. *Free Radical Biology & Medicine*, 52(8), 1437–1442. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.01.024>
- 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. *International Immunopharmacology*, 15(1), 58–66. <http://doi.org/10.1016/j.intimp.2012.10.018>
- Zhang, J.-P., Yan, J., Xu, J., Pang, X.-H., Chen, M.-S., Li, L., ... Zheng, L. (2009). Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *Journal of Hepatology*, 50(5), 980–989. <http://doi.org/10.1016/j.jhep.2008.12.033>
- Zhang, Y., Blattman, J. N., Kennedy, N. J., Duong, J., Nguyen, T., Wang, Y., ... Dong, C. (2004). Regulation of innate and adaptive immune responses by MAP kinase phosphatase 5. *Nature*, 430(7001), 793–797. <http://doi.org/10.1038/nature02764>
- Zhang, Z., Kobayashi, S., Borczuk, A. C., Leidner, R. S., Laframboise, T., Levine, A. D., & Halmos, B. (2010). Dual specificity phosphatase 6 (DUSP6) is an ETS-regulated negative feedback mediator of oncogenic ERK signaling in lung cancer cells. *Carcinogenesis*, 31(4), 577–586. <http://doi.org/10.1093/carcin/bgq020>
- Zhang, Z., Zheng, M., Bindas, J., Schwarzenberger, P., & Kolls, J. K. (2006). Critical role of IL-17 receptor signaling in acute TNBS-induced colitis. *Inflammatory Bowel Diseases*, 12(5), 382–388. <http://doi.org/10.1097/01.MIB.0000218764.06959.91>
- Zhao, Q., Wang, X., Nelin, L. D., Yao, Y., Matta, R., Manson, M. E., ... Liu, Y. (2006). MAP kinase phosphatase 1 controls innate immune responses and suppresses endotoxic shock. *The Journal of Experimental Medicine*, 203(1), 131–140. <http://doi.org/10.1084/jem.20051794>
- Zhao, Z., Wu, Y., Cheng, M., Ji, Y., Yang, X., Liu, P., ... Yuan, Z. (2011). Activation of Th17/Th1 and Th1, but not Th17, is associated with the acute cardiac event in patients with acute coronary syndrome. *Atherosclerosis*, 217(2), 518–524. <http://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.03.043>
- Zheng, W., & Flavell, R. A. (1997). The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell*, 89(4), 587–596.
- Zheng, Y., Danilenko, D. M., 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(7128), 648–651. <http://doi.org/10.1038/nature05505>
- Zhou, L., Ivanov, I. I., Spolski, R., Min, R., Shenderov, K., Egawa, T., ... Littman, D. R. (2007). IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nature Immunology*, 8(9), 967–974. <http://doi.org/10.1038/ni1488>

- Zhu, J. (2010). Transcriptional regulation of Th2 cell differentiation. *Immunology and Cell Biology*, 88(3), 244–249. <http://doi.org/10.1038/icb.2009.114>
- Zhu, J., Cote-Sierra, J., Guo, L., & Paul, W. E. (2003). Stat5 activation plays a critical role in Th2 differentiation. *Immunity*, 19(5), 739–748.
- Zhu, J., Min, B., Hu-Li, J., Watson, C. J., Grinberg, A., Wang, Q., ... Paul, W. E. (2004). Conditional deletion of Gata3 shows its essential function in T(H)1-T(H)2 responses. *Nature Immunology*, 5(11), 1157–1165. <http://doi.org/10.1038/ni1128>
- Zhu, J., & Paul, W. E. (2010). Peripheral CD4<sup>+</sup> T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. *Immunological Reviews*, 238(1), 247–262. <http://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00951.x>
- Zhu, X., Gadgil, A. S., Givelber, R., George, M. P., Stoner, M. W., Sciurba, F. C., & Duncan, S. R. (2009). Peripheral T cell functions correlate with the severity of chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 182(5), 3270–3277. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.0802622>
- Zorn, E., Nelson, E. A., Mohseni, M., Porcheray, F., Kim, H., Litsa, D., ... Ritz, J. (2006). IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo. *Blood*, 108(5), 1571–1579. <http://doi.org/10.1182/blood-2006-02-004747>
- Zorov, D. B., Filburn, C. R., Klotz, L. O., Zweier, J. L., & Sollott, S. J. (2000). Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, 192(7), 1001–1014.
- Zorov, D. B., Juhaszova, M., & Sollott, S. J. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiological Reviews*, 94(3), 909–950. <http://doi.org/10.1152/physrev.00026.2013>
- Zou, W., & Restifo, N. P. (2010). T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy. *Nature Reviews. Immunology*, 10(4), 248–256. <http://doi.org/10.1038/nri2742>

## Annexes

# I. Caractérisation des différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> auxiliaires et expression du marqueur CCR6 à la surface des PBMCs de donneurs volontaires sains.

Le marqueur CCR6 est principalement exprimé à la surface des cellules T mémoires, sur certains nTreg, sur les lymphocytes B, certaines cellules dendritiques et cellules de Langerhans. CCR6 *via* son ligand CCL20 est impliqué dans le recrutement tissulaire des cellules. Les Th17 sont des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> effecteurs mémoires sécrétant de l'IL-17A comprises dans une population exprimant le marqueur CD161 et sont pour la plus grande partie d'entre eux CCR6<sup>+</sup>. Au contraire, les lymphocytes Th1 n'expriment pas le marqueur CCR6. Les données acquises au cours de ce projet confirment que CCR6 est majoritairement exprimé sur les lymphocytes, et au sein de ces lymphocytes, sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> CD127<sup>+</sup> (Fig.A1).



**Fig. A 1. Fréquence des cellules exprimant le marqueur CCR6 au sein des PBMCs de donneurs volontaires sains.**

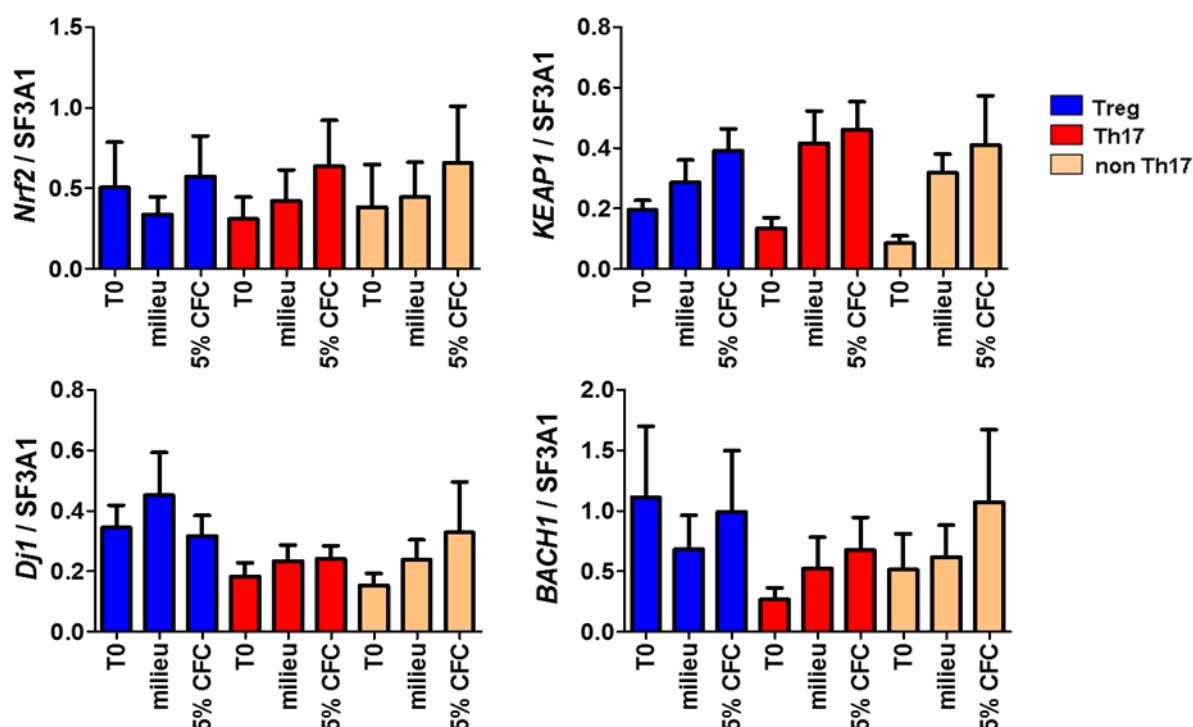
Les différentes sous-populations cellulaires contenues dans les PBMCs de donneurs volontaires sains ont été identifiées par cytométrie en flux selon les paramètres taille/structure et l'expression de différents marqueurs membranaires (n=12).

## **II. Réponse antioxydante dépendante de Nrf2 et expression du gène codant pour l'IL4I1 dans les différentes sous-populations de lymphocytes CD4<sup>+</sup> exposées à la fumée de cigarette.**

### **A. Réponse anti-oxydante dépendante de Nrf2 des différentes sous-populations de lymphocytes CD4<sup>+</sup> exposées à la fumée de cigarette.**

La fumée de cigarette est une source importante d'oxydants. En réponse à une exposition à ces oxydants, les cellules mettent en place une réponse anti-oxydante. Celle-ci peut-être non enzymatique (système du glutathion par exemple), ou induire une activation de la réponse anti-oxydante dépendante de Nrf2. L'activation du système Nrf2 permet ensuite d'induire la transcription de gènes anti-oxydants. Les niveaux d'ERO plus importants dans les Th17 comparativement aux Tregs et « non Th17 », en absence de stimulation ou après exposition au CFC laissent supposer que la réponse anti-oxydante dans les Th17 pourrait être déficiente.

Nous avons donc analysé en RT-qPCR l'expression des différents composants du système anti-oxydant Nrf2. Les résultats obtenus ne montrent pas de défaut de l'expression des gènes codant pour Nrf2, KEAP1, Dj1 et BACH1 dans les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> en absence de stimulation, ni de défaut de l'induction de ces gènes en réponse à une exposition au CFC (Fig. A2). Néanmoins, dans les Th17, en réponse à l'exposition au CFC, nous observons une augmentation de la transcription du gène codant pour ATF3 (Fig. R5 C.). ATF3 est à la fois un répresseur de la fixation de Nrf2 sur les séquences ARE (« antioxidant responsive element ») inhibant ainsi la transcription de gènes antioxydants (Brown SL, 2008), et peut-être dans d'autres modèles cellulaires comme les astrocytes rapidement induit en réponse à différents stress. De plus la transcription de ATF3 est sous la dépendance de Nrf2 (Kim KH, 2010).



**Fig. A 2. Expression des gènes codant pour les différents membres du système anti-oxydant Nrf2 après exposition au CFC.**

L'expression relative des gènes codants pour les différents éléments du système antioxydant Nrf2 a été quantifiée par PCR quantitative dans les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4+ isolés à partir de cônes de cytophérèse de donneurs anonymes sains par tri cellulaire et exposés ou non à 5% de CFC 48H. Les données présentées montrent les moyennes +/-SEM de 5 expériences.

Nous avons ensuite analysé l'expression de différents gènes antioxydants cibles du système Nrf2. Les résultats obtenus (Fig. A3) ne montrent pas de défaut d'expression de la GPx1, impliquée dans la détoxification contre l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, et de la GCLM, une enzyme limitante dans la synthèse du glutathion, en absence de stimulation comme en réponse à l'exposition au CFC. Dans les Tregs, on observe une augmentation significative de la transcription de GCLM en réponse à l'exposition au CFC, mais le niveau d'expression de ce gène est comparable dans les différentes sous-populations étudiées dans cette même condition.

La Trx est une enzyme antioxydante capable de piéger les ERO et de faciliter la réduction d'autres protéines ou d'enzymes métabolisant l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par des mécanismes d'échanges cystéine thiol-disulfure. Les TrxRD1 et 2 ont pour rôle de réduire la Trx. Nos résultats ne montrent pas de défaut d'expression de Trx, TrxRD1 et 2 en absence de stimulation ou lors d'une exposition au CFC dans les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4+. En réponse à une exposition au CFC, nous observons une tendance à une augmentation de l'expression des 3 enzymes dans les Th17 et « non Th17 ». De plus, nos résultats montrent une augmentation

significative de l'expression de TrxRD1 dans les Tregs exposés au CFC et vont dans le sens des résultats obtenus par Mougiakakos (Mougiakakos D, 2011) qui montrent que les Tregs sont protégés contre le stress oxydant grâce à un métabolisme de la thiorédoxine plus important.

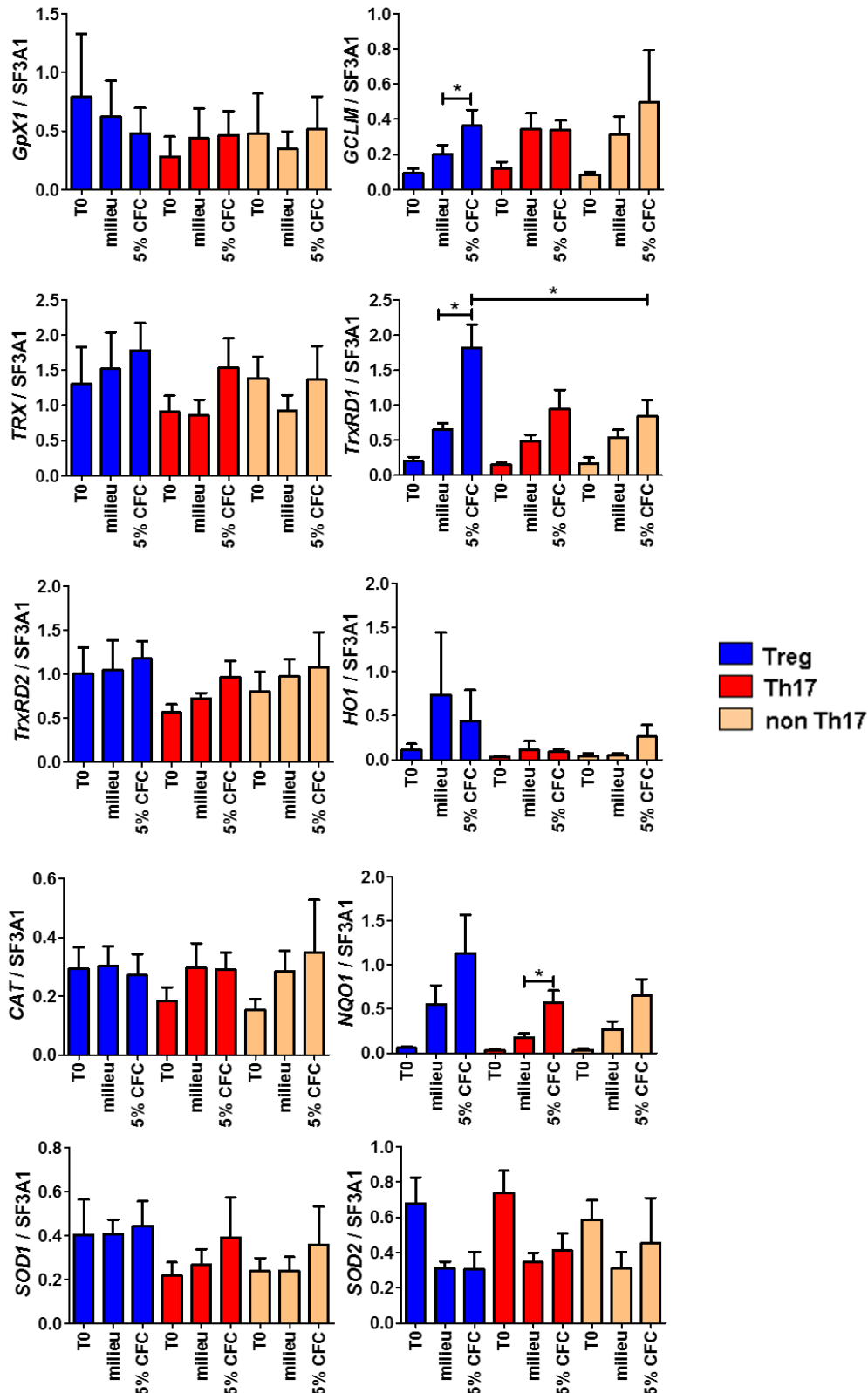
Nous observons une tendance à une moindre expression de l'enzyme antioxydante HO1 dans les Th17 et « non Th17 » par rapport aux Tregs. L'exposition à la fumée de cigarette ne modifie pas l'expression de ce gène dans les Th17, et induit une tendance à l'augmentation de son expression dans les « non Th17 ».

Nous ne montrons pas de défaut d'expression du gène codant pour la catalase en absence de stimulation et après exposition au CFC. Nous n'observons pas de modulation lors de l'exposition au CFC.

En absence de stimulation, l'expression de NQO1 est comparable dans les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. L'exposition provoque une augmentation de l'expression de cet enzyme dans les trois sous-populations mais cette augmentation n'est significative que dans les Th17. Outre sa fonction antioxydante, NQO1 est impliqué dans la protection de p53 contre la dégradation indépendante de l'ubiquitination en participant à sa stabilisation (Ross D, 2004) et pourrait participer à l'arrêt du cycle cellulaire des cellules Th17 exposées à la fumée de cigarette.

Enfin, nous n'observons pas de défaut d'expression des SOD1, présente dans le cytosol et l'espace intermembranaire mitochondrial, et SOD2 mitochondriale, responsables de la dismutation de l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et O<sub>2</sub>, en absence de stimulation et en réponse à l'exposition au CFC. De plus, nous n'observons pas de modification de l'expression des gènes codants pour les SOD1 et 2 en réponse à l'exposition au CFC.

Au final, cette analyse en RT-qPCR des différents composants du système anti-oxydant Nrf2 et des gènes antioxydants cibles de ce système permet de confirmer la meilleure résistance des Tregs aux agressions oxydantes *via* une expression plus importante des enzymes du système thiorédoxine. En revanche, nous ne montrons pas de défaut majeur d'expression des gènes antioxydants dans les Th17 qui pourrait expliquer les différences de niveaux d'expression des ERO dans ces cellules en absence de stimulation et après exposition à la fumée de cigarette. Au contraire, l'expression plus importante des gènes codants pour ATF3 et NQO1 vont dans le sens d'une réponse antioxydante adaptée de ces cellules lors de l'exposition au CFC, tout en participant à l'arrêt du cycle cellulaire compatible avec un phénotype sénescence. Néanmoins, ces résultats sont à interpréter avec précaution car la plupart des protéines évoquées ici font l'objet de modifications et d'une régulation post-traductionnelle. De plus l'expression en ARN n'augure pas de l'activité enzymatique de ces différentes protéines.



**Fig. A 3. Analyse de la réponse antioxydante dépendante de Nrf2 après exposition au CFC dans les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>.**

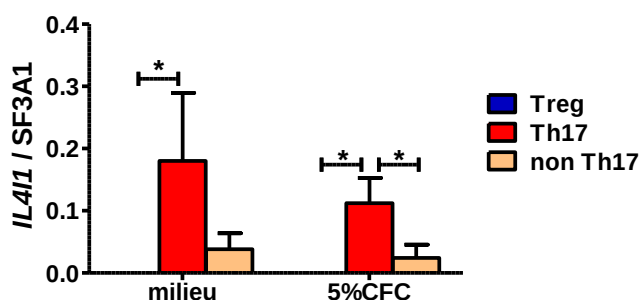
L'expression relative de gènes codants pour des enzymes antioxydantes régulées par le système Nrf2 a été quantifiée par PCR quantitative dans les différentes sous-populations de

lymphocytes T CD4<sup>+</sup> isolés à partir de cônes de cytophérèse de donneurs anonymes sains par tri cellulaire et exposés ou non à 5% de CFC 48H. Les données présentées montrent les moyennes  $\pm$  SEM de 5 expériences. \*  $p < 0,05$ , Mann-Whitney U.

## B. Expression du gène IL4I1 dans les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>.

Les résultats obtenus jusqu'ici ne permettent pas d'expliquer les niveaux d'ERO plus importants dans les Th17 comparativement aux autres sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, en absence de stimulation comme en réponse à une exposition au CFC. Récemment, l'équipe de Boulland ML a montré que l'IL4I1 déamine la phénylalanine en phénylpyruvate et produit de l'ammonium et du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Boulland ML, 2007), et le travail de Santarlasci a montré que l'IL4I1 est surexprimée dans les Th17 et pourrait être utilisé comme un marqueur caractéristique de ces cellules. De plus, cette enzyme diminue l'expression de la chaîne  $\zeta$  du CD3 *via* la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et est responsable des anomalies de prolifération des Th17 après une stimulation par des anticorps anti-CD3/CD28, et explique en partie leur faible proportion dans les sites inflammatoires (Santarlasci V, 2012).

L'analyse en RT-qPCR de l'expression de l'IL4I1 dans les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Fig. A4) montre que cette enzyme n'est pas exprimée dans les Tregs et exprimée à un niveau faible (proche des limites de détection) dans les « non Th17 ». Elle est en revanche fortement exprimée dans les Th17, et les résultats obtenus ne permettent pas de conclure à une modulation de l'expression de cet enzyme en réponse à une exposition au CFC, mais pourraient contribuer à expliquer les niveaux d'ERO plus importants dans les Th17.



**Fig. A 4. Analyse de l'expression de la L-phenylalanine oxydase IL4I1 dans les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> en absence de stimulation et après exposition à 5% de CFC.**

L'expression relative du gène codant pour l'IL4I1 a été quantifiée par PCR quantitative dans les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> isolés à partir de cônes de cytophérèse de

donneurs anonymes sains par tri cellulaire et exposés ou non à 5% de CFC 48H. Les données présentées montrent les moyennes  $\pm$  SEM de 5 expériences. \*  $p < 0,05$ , Mann-Whitney U.

### C. Séquences des primers utilisés.

| NOM          | SeqRef(S)<br>des différents<br>isoformes  |                   | SEQUENCES DES PRIMERS<br>(5'-3')                                    | TAILLE DES<br>AMPLICONS<br>(pbs) |
|--------------|-------------------------------------------|-------------------|---------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| <b>SF3A1</b> | NM_005877<br>NM_001005409                 | Sens<br>Anti sens | TGCAGGATAAGACGGAATGGAA<br>ACTGA<br>GTAGTAAGCCAGTGAGTTGGAAT<br>CTTTG | 179                              |
| <b>BACH1</b> | NM_001186<br>NM_206866<br>NM_001011545    | Sens<br>Anti sens | GAGGTAAACTGCCATTCAATGC<br>CGCTGTGCAGCAATTCTGTT                      | 152                              |
| <b>CAT</b>   | NM_001752                                 | Sens<br>Anti sens | GAACGTGCTGAATGAGGAACAG<br>GCACAGATGGCGGCTATCA                       | 90                               |
| <b>DJ1</b>   | NM_007262<br>NM_001123377                 | Sens<br>Anti sens | GGGCGCACAGAAATTTATCTGA<br>GCACAGATGGCGGCTATCA                       | 90                               |
| <b>IL4I1</b> | NM_152899                                 | Sens<br>Anti sens | TGTCACCAAGAGCTGGAGACAC<br>GGGCTTCAGGGTCCGATT                        | 217                              |
| <b>GCLM</b>  | NM_002061                                 | Sens<br>Anti sens | CAGATTTGACTGCATTTGCTAAA<br>CA<br>AGAGCTTCTTGGAAACTTGCTTC<br>A       | 97                               |
| <b>GPX1</b>  | NM_000581                                 | Sens<br>Anti sens | CCCGTGCAACCAGTTTGG<br>GCATGAAGTTGGGCTCGAA                           | 104                              |
| <b>GPX2</b>  | NM_002083                                 | Sens<br>Anti sens | CCCACCCCTCTAATAGGCTCAT<br>GCCCCGGAACGTATTGAAAT                      | 150                              |
| <b>HO1</b>   | NM_002133                                 | Sens<br>Anti sens | ACTGCGTTCCTGCTCAACATC<br>AGTGTAAGGACCCATCGGAGAA                     | 209                              |
| <b>KEAP1</b> | NM_203500<br>NM_012289                    | Sens<br>Anti sens | GGGAGTACATCTACATGCATTTT<br>GG<br>GTCGTCCCGGCTGATGAG                 | 98                               |
| <b>NQO1</b>  | NM_000903<br>NM_001025433<br>NM_001025434 | Sens<br>Anti sens | CAGCTCACCGAGAGCCTAGTTC<br>GCCAGTACGATCAGTGCTCTTCT                   | 117                              |
| <b>Nrf-2</b> | NM_006164<br>NM_001145412                 | Sens<br>Anti sens | GCCCACATTCCCAAATCAGA<br>CGTAGCCGAAGAAACCTCATTG                      | 102                              |
| <b>SOD1</b>  | NM_000454                                 | Sens<br>Anti sens | GCACACTGGTGGTCCATGAA<br>CACCACAAGCCAAACGACTTC                       | 99                               |
| <b>SOD2</b>  | NM_000636<br>NM_001024465<br>NM_001024466 | Sens<br>Anti sens | TGGTGTCCAAGGCTCAGGTT<br>TAAGCGTGCTCCCACACATC                        | 147                              |

|               |                                                                  |                   |                                                    |     |
|---------------|------------------------------------------------------------------|-------------------|----------------------------------------------------|-----|
| <b>TXN</b>    | NM_003329                                                        | Sens<br>Anti sens | AAGCCTTTCTTTCATTCCCTCTCT<br>CCCACCTTTTGTCCCTTCTTAA | 146 |
| <b>TXNRD1</b> | NM_003330<br>NM_182729<br>NM_182742<br>NM_182743<br>NM_001093771 | Sens<br>Anti sens | CGGTGATGCTGGCAATAGG<br>GGAACCTGCATAGAGCCTCTGA      | 227 |
| <b>TXNRD2</b> | NM_006440.3                                                      | Sens<br>Anti sens | GCAGGCGAAGTTACTCAAGGA<br>CTCAGAGCATGTGGGATGGA      | 99  |
| <b>TXNRD3</b> | NM_052883.1                                                      | Sens<br>Anti sens | TTGTTCTGGCCTCTTGAATGG<br>ACCTCACCGGCGTTTGGT        | 131 |

**Table A 1. Liste des amorces nucléotidiques utilisées pour l'analyse de la réponse anti-oxydante des différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> exposés ou non au condensat de fumée de cigarette.**

Les couples de « primers » sont déterminés à partir des banques de données génomiques (GenBank, NCBI, Ensembl), et en particulier à partir de séquences de référence correspondant à l'ARN du gène d'intérêt et à ses différents isoformes (séquences annotées NM dans la banque de données). Pour un gène donné, le nombre d'isoforme existant peut être important. L'analyse préalable des publications scientifiques existantes est essentielle afin de bien identifier le gène d'intérêt et ses isoformes potentielles, et de pouvoir choisir entre la possibilité de construire des primers communs à plusieurs isoformes ou spécifiques d'une isoforme particulière. Ce tableau liste les différentes isoformes amplifiées par les primers construits pour chaque gène.

- III. Article : L'absence de la protéine adaptatrice PEA-15 est associé à un profil de production des cytokines Th des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> activés altéré *in vitro*, et à un défaut de la réponse alloimmune dirigée contre les globules rouges *in vivo*.

RESEARCH ARTICLE

# Absence of the Adaptor Protein PEA-15 Is Associated with Altered Pattern of Th Cytokines Production by Activated CD4+ T Lymphocytes *In Vitro*, and Defective Red Blood Cell Alloimmune Response *In Vivo*

Stéphane Kerbrat<sup>1,2</sup>, Benoît Vinger<sup>2,3</sup>, Marie-Pierre Junier<sup>4,5,6</sup>, Flavia Castellano<sup>1,2,7</sup>, François Renault-Mihara<sup>4,5,6</sup>, Silvina Dos Reis Tavares<sup>4,5,6</sup>, Mathieu Surenaud<sup>2</sup>, France Noizat-Pirenne<sup>1,2,3</sup>, Jorge Boczkowski<sup>1,2</sup>, Georges Guellaen<sup>1,2</sup>, Hervé Chneiweiss<sup>4,5,6\*</sup>, Sabine Le Gouvello<sup>1,2,7\*</sup>

**1** Université Paris-Est, Créteil, France, **2** Inserm U955, Créteil, France, **3** Etablissement Français du Sang, Créteil, France, **4** Inserm, U1130, Neurosciences Paris Seine, IBPS, Paris, France, **5** Université Pierre et Marie Curie, UMR119, Neurosciences Paris Seine, IBPS, Paris, France, **6** CNRS, UMR8246, Neurosciences Paris Seine, IBPS, Paris, France, **7** AP-HP, Hôpital H. Mondor-A. Chenevier, Pôle de Biologie-Pathologie, Créteil, France

\* [sabine.le-gouvello@hmn.aphp.fr](mailto:sabine.le-gouvello@hmn.aphp.fr) (SLG); [herve.chneiweiss@inserm.fr](mailto:herve.chneiweiss@inserm.fr) (HC)



## OPEN ACCESS

**Citation:** Kerbrat S, Vinger B, Junier M-P, Castellano F, Renault-Mihara F, Dos Reis Tavares S, et al. (2015) Absence of the Adaptor Protein PEA-15 Is Associated with Altered Pattern of Th Cytokines Production by Activated CD4+ T Lymphocytes *In Vitro*, and Defective Red Blood Cell Alloimmune Response *In Vivo*. PLoS ONE 10(8): e0136885. doi:10.1371/journal.pone.0136885

**Editor:** Derya Unutmaz, Jackson Laboratory, UNITED STATES

**Received:** June 12, 2015

**Accepted:** August 10, 2015

**Published:** August 28, 2015

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

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

**Funding:** This work was supported by Association pour la recherche contre le cancer (grant n°3500) (HC); Assistance-publique hôpitaux de Paris (SLG); Inserm (HC and SLG); and Legs Poix (SLG). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## Abstract

TCR-dependent and costimulation signaling, cell division, and cytokine environment are major factors driving cytokines expression induced by CD4+ T cell activation. PEA-15 (Protein Enriched in Astrocyte / 15kDa) is an adaptor protein that regulates death receptor-induced apoptosis and proliferation signaling by binding to FADD and relocating ERK1/2 to the cytosol, respectively. By using *PEA-15*-deficient mice, we examined the role of PEA-15 in TCR-dependent cytokine production in CD4+ T cells. TCR-stimulated *PEA-15*-deficient CD4+ T cells exhibited defective progression through the cell cycle associated with impaired expression of cyclin E and phosphoRb, two ERK1/2-dependent proteins of the cell cycle. Accordingly, expression of the division cycle-dependent cytokines IL-2 and IFN $\gamma$ , a Th1 cytokine, was reduced in stimulated *PEA-15*-deficient CD4+ T cells. This was associated with abnormal subcellular compartmentalization of activated ERK1/2 in *PEA-15*-deficient T cells. Furthermore, *in vitro* TCR-dependent differentiation of naive CD4+ CD62L+ *PEA-15*-deficient T cells was associated with a lower production of the Th2 cytokine, IL-4, whereas expression of the Th17-associated molecule IL17 was enhanced. Finally, a defective humoral response was shown in *PEA-15*-deficient mice in a model of red blood cell alloimmunization performed with Poly IC, a classical adjuvant of Th1 response *in vivo*. Collectively, our data suggest that PEA-15 contributes to the specification of the cytokine pattern of activated Th cells, thus highlighting a potential new target to interfere with T cell functional polarization and subsequent immune response.

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

## Introduction

The mechanisms by which naïve CD4<sup>+</sup> T cells differentiate into different cell functional fates that include the T helper 1 (Th1), Th2, Th17, and T regulatory (Treg) cell lineages, characterized by a specific pattern of cytokines production, are of much interest in understanding how host immune response become adapted to different challenges [1,2]. Although cytokine environment and costimulation are major factors influencing CD4<sup>+</sup> T cell differentiation, the cell division cycle is an intrinsic cue that has been involved in the specification of cytokine expression in Th cell, considering that DNA replication allows chromatin remodeling and demethylation of effector Th cytokine loci [3–6]. However, other studies suggested that DNA replication might not be mechanistically linked to Th cytokine specification [7,8]. Alternatively, different signaling pathways from the TCR complex itself were shown to influence the set of cytokine genes transcribed [9]. In particular, the involvement of ERK1/2 in T cell functional polarization was previously shown in different reports where the authors explain that TCR signal strength-dependent magnitude of ERK1/2 activity, as well as the duration of ERK1/2 activation control Th1 versus Th2 outcome of T cell activation [10–15], or Th17 versus regulatory T cell (Treg) differentiation [16–19]. ERK1/2 signaling has been also involved in regulation of G1 cell cycle progression [20]. However, whether ERK1/2 activation or compartmentalization contributes to cell cycle-dependent Th differentiation is not known.

The DED (death effector domain)-containing adaptor PEA-15 (Protein Enriched in Astrocytes/ 15k kDa) [21] regulates multiple cellular functions depending on the cell type. PEA-15 contains a nuclear export sequence that mediates the relocation of ERK1/2 from the nucleus to the cytoplasm, thereby regulating the Ras-dependent signaling pathway [22–25]. Another role of PEA-15 is to inhibit apoptosis induced by Fas, TNF- $\alpha$  or TRAIL, by interacting with the DED of FADD and caspase-8, and blocking DISC formation. The mitochondrial protein Htra2/OMI promotes apoptosis by targeting PEA-15 to proteasome (reviewed in [23]).

Here, we have taken advantage of PEA-15-deficient mice [26], to study the impact of PEA-15 deficiency on TCR-dependent specification of cytokine expression by CD4<sup>+</sup> helper T cells.

## Materials and Methods

### Mice

PEA-15-deficient mice were previously described [26]. Mice were bred in our facility and backcrossed to a C57BL/6J background for 3 generations. For each experiment, PEA-15<sup>-/-</sup> animals and PEA-15<sup>+/-</sup> sex-matched littermates from PEA-15<sup>+/-</sup> intercrosses, were used at 6–9 months of age. On the day of experiment, mice were sacrificed by cervical dislocation. All animals were maintained in our conventional animal facilities and manipulated in accordance with protocols approved by the Paris Est Creteil University (UPEC) ethical committee (COMETH, Authorization N°11/12/12-16), according to European guidelines.

### Flow cytometry and cell sorting

Spleen, lymph nodes, or thymus were harvested into a tissue culture dish and teased apart into a single cell suspension by pressing with the plunger of a 3 ml-syringe; the obtained cell suspension was passed through a cell strainer (20 $\mu$ m) to eliminate clumps and small fragments. Post-centrifugation supernatant was discarded, and cell pellet resuspended in red blood cell lysing buffer. After centrifugation, supernatant was discarded and cell pellet resuspended in staining media. A cell count and viability analysis were then performed. Flow cytometry studies were performed using a FC500 or a CyAn flow cytometer (both FC from Beckman-Coulter, Villepinte, France). Data were analysed using CXP software (Beckman-Coulter,

Villepinte, France) or FlowJo software (v10.0.6 Tree Star, Ashland, OR). Antibodies for flow cytometry experiments were obtained from Caltag (San Francisco, CA, USA), BD Pharmingen, (San Diego, CA, USA), Beckman Coulter (Villepinte, France) and Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany). CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> or naïve CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> T cells were enriched out of thymus or pooled lymph nodes (LN) and/or spleen cells suspensions as indicated, with negative selection magnetic cell sorting kit: pan T cell isolation kit mouse, CD4<sup>+</sup> T cell isolation kit II mouse, CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> T cell isolation kit II, respectively (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany).

### Cell cycle and proliferation analysis

Cell cycle analysis of LN T cells was performed using Coulter Reagents Kit (Beckman-Coulter, Villepinte, France) on the basis of DNA staining with propidium iodide (PI) as described [27]. At least 30000 events were analyzed at low speed (100 events/second) and collected on list mode files. The percentage of T cells in the different phases of the cell cycle (i.e. G0/G1, S, G2/M phase) was determined. T lymphocyte proliferation capacity was analyzed after 24, 48 and 72h of culture of T cells with plate bound anti-CD3- (0.1/-1-2 µg/ml, as indicated in figure legend) with or without recombinant anti-CD28 (2µg/ml), with or without recombinant IL-2 (50U/ml) by enumeration in a haemocytometer after dilution of T cells in trypan blue, or by cytometric analysis of stimulated LN T cells labeled with the fluorescent dye carboxy-fluorescein diacetate succinimidylester (CFSE) (CFDASE, Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France). Propidium iodide staining [1µg/ml] was performed in CFSE labelled cells [27]. In each histogram, the percentage of the dividing cells per cell generation was determined by quantification of CFSE cellular fluorescence halving using a flow cytometer CyAn (Beckman-Coulter, Villepinte, France), and data were analyzed using FlowJo software (v10.0.6 Tree Star, Ashland, OR).

### Cytokine production and IL4/1 activity analysis

The amount of IL2 in 18h culture supernatant of T cells stimulated with ConA, a mitogenic lectin that mimic anti-CD3 stimulation, was quantified by a CTLL2 bioassay, and the amount of IL-4 and IFNγ was quantified by Immunoassay (Quantikine, R&D systems Inc., Minneapolis, MN, USA). The amount of IFNγ, IL4, IL10 and IL17A produced in 5-days culture supernatant of plate bound anti-CD3- (0.1-1 µg/ml) stimulated naïve CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> T cells with or without recombinant anti-CD28 (2µg/ml) was quantified by Luminex assay (MCYTOMAG-70K, Merck Millipore, Saint-Quentin en Yvelines, France). IL4/1 activity was quantified as already described by us [28].

### Western blot

NP-40 total cell lysates (50µg/lane) of stimulated T cells were resolved on SDS-PAGE (6% for pRb-ppRb analysis; 12% for ERK1/2 & Akt analysis; 15% for cyclin E analysis) and transferred to 0.45µm pore size Immobilon-P PVDF membrane (Millipore, Billerica, MA, USA). Ab specific for phospho-ERK1/2, ERK1/2, Akt, phospho-Akt (Cell signaling technologies, Danvers, MA, USA), cyclin E (Santa Cruz, Dallas, TX, USA), or pRb (BD Biosciences, San Diego, CA) and actin (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) were used for immunoblotting, and immunoreactive bands were detected using ECF Western Blotting Reagent Pack (GE Healthcare Biosciences, Piscataway, NJ, USA), and analysed using a Storm Phosphorimager and the Image Quant software (GE Healthcare Biosciences, Piscataway, NJ, USA).

## Immunofluorescence

Stimulated purified LN T were spread on Superfrost plus slides (Menzel-Glaser, Braunschweig, Germany) at  $1 \times 10^5$  cells/slide after washing with PBS containing a cocktail of protease inhibitors: okadaic acid (1nM), NaF (10mM), sodium orthovanadate (1mM), and then fixed and permeabilized by PBS containing 4% formaldehyde for 15 minutes at room temperature. For anti-ERK1/2 staining, non-specific sites were blocked with goat serum (5%) (BioWest, Nuaille, France) in PBS Triton X-100 (0.3%), incubated overnight at 4°C with anti-ERK1 (1:500, Santa Cruz, Dallas, TX, USA) in PBS-Triton X-100 (0.3%) and BSA (0.1%), and subsequently for 1h at room temperature with Cy3 conjugated goat anti-rabbit antibody (1:1000, BD Biosciences, San Diego, CA). For anti-phospho ERK1/2 staining, cells were incubated in Triton X-100 (0.3%) for 30 minutes at room temperature before being fixed again with 50% methanol for 15 minutes at 4°C. After non-specific sites blocking, cells were incubated for 48h at 4°C with anti-phospho ERK1/2 (1:25, Cell Signaling technologies, Danvers, MA, USA) in PBS containing Triton X-100 (0.3%) and 0.1% BSA, and then for 1h at room temperature with Alexa 488 conjugated goat anti-rabbit (1:5000, Life Technologies, Saint Aubin, France). A cocktail of phosphatase inhibitors was added in medium at each step of the procedure. After both staining, cells were washed with RNase A (1:20 in PBS, Life Technologies, Saint Aubin, France) for 1 minute, incubated with the DNA marker TOPRO3 (1:1000 in PBS, Life Technologies, Saint Aubin, France) for 20 minutes at room temperature, washed once with PBS and once with PB before being mounted in fluoromount-G medium (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) and analyzed on a Zeiss LSM 510 confocal microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

## RNA isolation and real time quantitative RT-PCR

Total mRNA isolation and qRT-PCR analysis were performed as published [29]. The sequences of primers are indicated in [S1 Table](#). The expression of all the indicated target transcripts was measured by the relative quantification of real-time PCR using a mix of each cDNA sample as a calibrator sample, according to the  $\Delta\Delta C_t$  method [30].

## Measurement of anti-HEL IgG and Blood transfusion

Anti-HEL IgG flow-cytometry detection was based by flow cytometry crossmatch, and performed as described [31,32]. HEL-expressing HOD RBCs were incubated with a 1/10 dilution of serum sampling, followed by incubation with anti-mouse IgG labeled with APC (BD Biosciences, San Diego, CA). FVB RBCs were used as a negative control. Anti-HEL antiserum was used as a positive control. Donor blood was leukoreduced with a neonatal leukoreduction filter (Purecell, Pall Biomedical, East Hills, NY). A total of 100  $\mu$ l of leukoreduced RBC was injected via tail vein of recipient mice. Four hours before transfusion, recipients were injected intraperitoneally with either 100  $\mu$ g of poly(I:C) (Pfizer, New York, NY) in 500  $\mu$ l of PBS or with PBS alone. For Treg depletion, anti-CD25-purified mAb (clone PC61, rat IgG1, BIOXCELL West Lebanon, USA) were administered once intraperitoneally (500 $\mu$ g/mouse) 3 days before the transfusion as previously described [33,34]. The complete depletion of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T cells was checked by flow cytometry before blood transfusion. CD3-eF780-APC, CD4-PE-Cy7, CD25-APC, CD45RA-FITC mAbs used for Treg phenotyping were from BD Biosciences (San Diego, CA) and eBioscience (San Diego, CA). Cells were treated with a fixation/permeabilization kit (eBioscience, San Diego, CA) and labeled with Foxp3-PE (eBioscience, San Diego, CA). All data were collected on an eight-color Canto II flow cytometer (BD, San Diego, CA) and analyzed using with FlowJo software (v10.0.6 Tree Star, Ashland, OR).

## Statistical analysis

All analyses were performed with Prism 5.0c software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Differences were considered significant if  $p < 0.05$ .

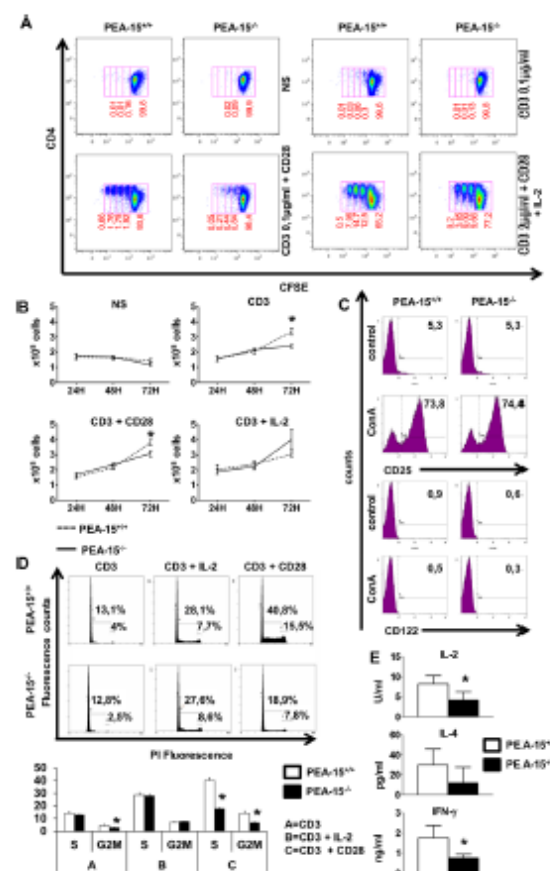
## Results

### PEA-15-deficient mice have impaired TCR-dependent T cell proliferation and Th1/2 cytokines production

We first tested the capacity of *PEA-15*-deficient T cells to proliferate and to produce IL-2, the T cell growth factor, as well as IFN $\gamma$  and IL-4, the major Th1 and Th2 cytokines involved in CD4 $^{+}$ -dependent cellular or humoral immune response, respectively. *PEA-15*-deficient lymph nodes (LN) T cells were incubated with low concentrations (0.1–2  $\mu$ g/ml) of anti-CD3 mAbs, with or without anti-CD28 mAbs *in vitro*. Compared to *PEA-15*-proficient (wt) control T cells, *PEA-15*-deficient T cells proliferated less as demonstrated by slower kinetics of proliferating CFSE labeled *PEA-15* $^{-/-}$  CD4 $^{+}$  T cells (Fig 1; panel A) as well as reduced total cell number (Fig 1; panel B). Moreover, *PEA-15* $^{-/-}$  CD4 $^{+}$  T cells exhibited a reduced frequency of cells in the S phase upon incubation with anti-CD3 and anti-CD28 mAbs, and a reduced frequency of cells in the G2/M phase upon incubation with anti-CD3 mAb alone and together with anti-CD28 mAb (Fig 1; panel C). Accordingly, compared to their wild type (wt) littermates, lymph nodes of *PEA-15*-deficient mice contained a lower frequency of CD4 $^{+}$  T cells expressing a central memory CD62L $^{high}$ CD44 $^{high}$  phenotype which are homeostatically proliferating in lymph nodes (Table 1), whereas percentages of non proliferating effector/memory CD62L $^{low}$ CD44 $^{high}$  CD4 $^{+}$ - and CD8 $^{+}$  LN T cells were similar in both murine lines. The percentage of naïve CD62L $^{high}$ CD44 $^{low}$  CD4 $^{+}$ - and CD8 $^{+}$  T cells were also similar in both murine lines, in accordance with the absence of alteration of thymus architecture or cellularity in *PEA-15*-deficient mice compared to wt mice (Table 1). In contrast, number of peripheral CD4 $^{+}$  and CD8 $^{+}$  splenocytes was lower in *PEA-15*-deficient mice compared to wt mice (Table 1). Addition of exogenous IL-2 suppressed the proliferation differences between *PEA-15*-deficient and -proficient T cells (Fig 1; panel A, B, C). Accordingly, activated *PEA-15*-deficient peripheral T cells secreted lower amounts of IL-2 than wt T cells (Fig 1; panel E). IFN $\gamma$  and IL-4 production by activated *PEA-15*-deficient T cells was also reduced compared to wt T cells, although the difference for IL-4 production did not reach significance (Fig 1; panel E). Modulation of the expression level of the early activation marker CD25 which encode for the  $\alpha$  chain of the IL-2 receptor, was similar at the surface of stimulated *PEA-15*-deficient- compared to wt T cells. Similarly, expression of CD122 which encode for the  $\beta$  chain of the IL-2 receptor, was similar at the surface of *PEA-15*-deficient- compared to wt T cells (Fig 1; panel D). Considering that PI labeling of CFSE positive cells showed no survival defect and neither higher susceptibility to AICD of *PEA-15*-deficient T cells (data not shown) as previously described [24], our results suggested that absence of *PEA-15* is associated with defective cell cycling of CD4 $^{+}$  T cell and T cells reduced production of Th1/2 cytokines, both phenomena potentially contributing to impaired proliferation capacity of *PEA-15* $^{-/-}$  T cells.

### PEA-15 regulates subcellular compartmentalization and activity of phosphoERK

PEA-15 regulates ERK1/2 compartmentalization in different cell types [22–25]. Proper cell cycling and activation of ERK1/2 are linked [20]. Thus we investigated whether defective CD4 $^{+}$  T cell cycling in *PEA-15*-deficient mice was associated with abnormal activation/compartmentalization



**Fig 1. Activated PEA-15<sup>-/-</sup> T cells have impaired proliferation, and reduced IL-2 & IFN-γ production.** (A & B) Purified lymph node (LN) CD4<sup>+</sup> T cells of PEA-15<sup>-/-</sup> and PEA-15<sup>+/+</sup> mice were stimulated with 0.1 μg/ml or 2 μg/ml (when indicated) of anti-CD3, with or without anti-CD28 (2 μg/ml), in the presence or not of recombinant IL-2 (50 U/mL). Proliferation was analyzed (A) by flow cytometry analysis of CFSE-labeled cells (numbers indicate the percentage of cells in each division at 72h, data are representative of 4 independent experiments) and (B) by enumeration of cells at the indicated time by trypan blue exclusion test. Data shown are means ± SEM of 3 independent experiments (\**p* < 0.05). (C) PEA-15<sup>-/-</sup> and PEA-15<sup>+/+</sup> T cells treated without (control) or with ConA mitogen for 18h, were analysed for CD25 and CD122 expression by flow cytometry at 12h and 24h after stimulation, respectively. The data shown were obtained using PE-labeled mAbs specific for CD25 and CD122 and FITC-labeled mAbs specific for CD4, and are gated on CD4-FITC positive cells. The percentage of cells in each quadrant is indicated. These values are representative of 6 experiments. (D) LNT cells from PEA-15<sup>-/-</sup> mice and PEA-15<sup>+/+</sup> littermates were treated as in (A & B) for 72h. Flow cytometry of cells stained with propidium iodide (PI) gated on CD4<sup>+</sup> cells was performed for cell cycle analysis. Histograms of the percentage of cells in the S and G2M phases of the cell cycle of a representative experiment (D upper panel) and cumulative data of 4 independent experiments ± SD (\**p* < 0.05) (D lower panel) are shown. (E) Purified T cells from PEA-15<sup>-/-</sup> mice and PEA-15<sup>+/+</sup> littermates were stimulated as in (C). IL2 production in the culture supernatant was quantified by CTL22 bioassay (n = 8; 3 independent experiments). Quantification of IL-4 (Th2) and IFN-γ (Th1) (n = 6; 3 independent experiments) in the culture supernatant was determined by ELISA (\**p* < 0.05).

doi:10.1371/journal.pone.0136885.g001

of ERK1/2. After stimulation with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) which bypass the membranous steps of TCR/CD3 complex-dependent stimulation of ERK1/2, T cells from PEA-15-deficient and wt mice expressed similar expression levels of total ERK1/2 (p42/p44)- as well as

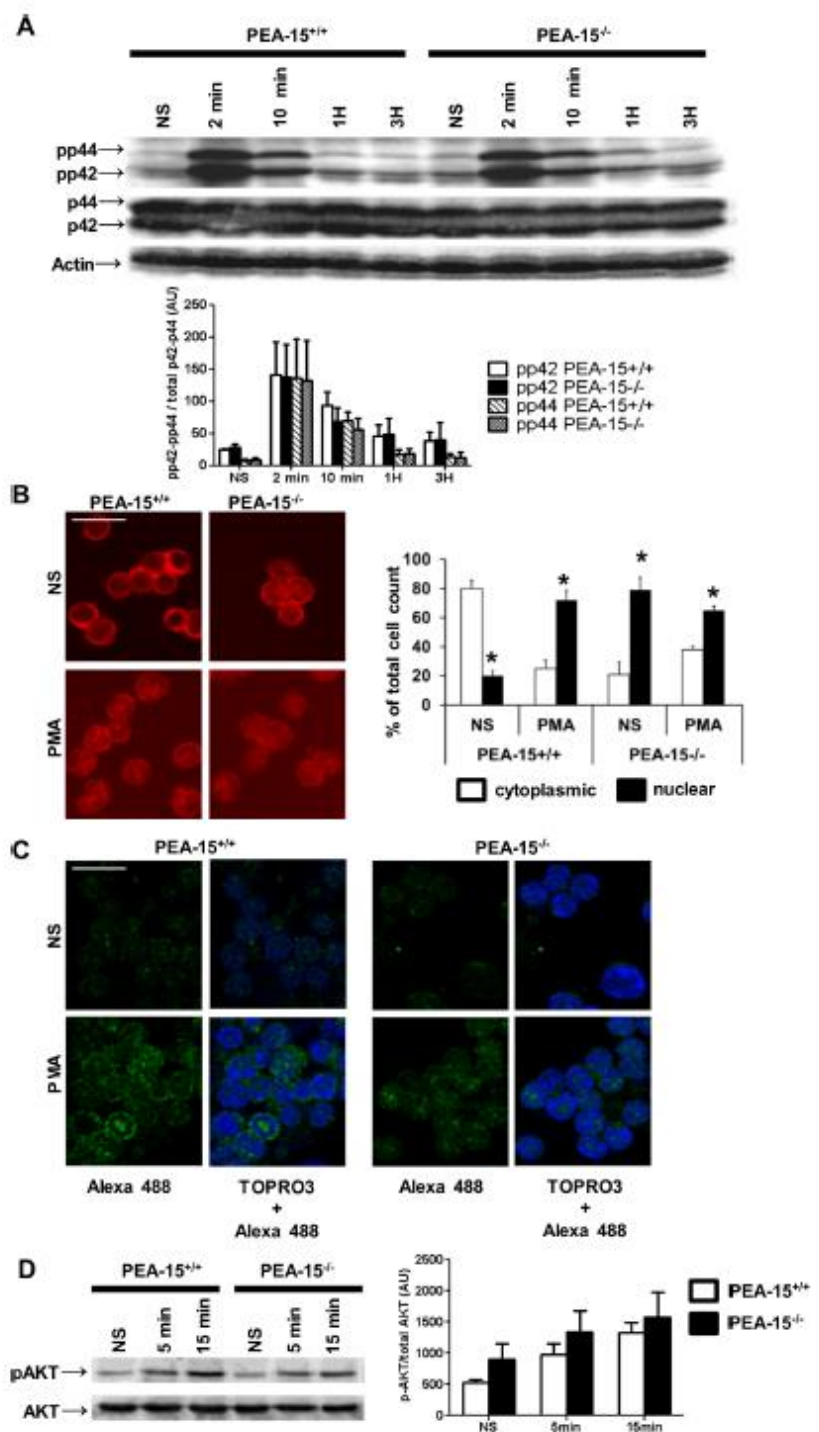
**Table 1. Lymphocytes composition of spleen, lymph nodes, and thymus in *PEA-15*<sup>+/+</sup> mice.** The cellular composition of spleen, lymph nodes, and thymus for *PEA-15*<sup>+/+</sup> mice and their WT littermates was determined by cell counting and/or flow cytometry after staining with mAbs specific for lymphocyte subsets. (N = 6; \*\*: P < 0.05).

|                                            | Spleen                                        |                       |
|--------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------|
|                                            | PEA-15 <sup>+/+</sup>                         | PEA-15 <sup>-/-</sup> |
|                                            | Number of total splenocytes x 10 <sup>6</sup> |                       |
| B cells                                    | 40.4 ± 18.2                                   | 24.8 ± 5.1            |
| CD4+8- T cells                             | 19.9 ± 1.8                                    | 16 ± 5.1 **           |
| CD4-8+ T cells                             | 12.6 ± 2.9                                    | 8.9 ± 1.5 **          |
|                                            | Lymph nodes                                   |                       |
|                                            | PEA-15 <sup>+/+</sup>                         | PEA-15 <sup>-/-</sup> |
|                                            | % among total leukocytes                      |                       |
| B cells                                    | 16.4 ± 3.5                                    | 14.6 ± 4.5            |
| CD4+8- T cells                             | 43.5 ± 1.1                                    | 40.8 ± 7.9            |
| CD4-8+ T cells                             | 23.4 ± 3.5                                    | 22.9 ± 6              |
|                                            | % among CD4+ T cells                          |                       |
| CD62L <sup>high</sup> CD44 <sup>low</sup>  | 75.8 ± 4.2                                    | 75.3 ± 7.4            |
| CD62L <sup>high</sup> CD44 <sup>high</sup> | 5.7 ± 2.5                                     | 3.2 ± 1.1 **          |
| CD62L <sup>low</sup> CD44 <sup>high</sup>  | 10.4 ± 1.9                                    | 9.3 ± 3.5             |
|                                            | % among CD8+ T cells                          |                       |
| CD62L <sup>high</sup> CD44 <sup>low</sup>  | 88.0 ± 2.1                                    | 87.8 ± 2.1            |
| CD62L <sup>high</sup> CD44 <sup>high</sup> | 5.9 ± 1.6                                     | 4.6 ± 1.3             |
| CD62L <sup>low</sup> CD44 <sup>high</sup>  | 2.4 ± 0.7                                     | 2.9 ± 0.8             |
|                                            | Thymus                                        |                       |
|                                            | PEA-15 <sup>+/+</sup>                         | PEA-15 <sup>-/-</sup> |
|                                            | % among total thymocytes                      |                       |
| CD4+ 8-                                    | 9.4 ± 0.5                                     | 11.7 ± 1.2            |
| CD4+ 8+                                    | 76.3 ± 2.3                                    | 68.1 ± 2.4            |
| CD4- 8-                                    | 11.4 ± 3.1                                    | 16.5 ± 3              |
| CD4- 8+                                    | 2.9 ± 0.6                                     | 3.6 ± 0.6             |

doi:10.1371/journal.pone.0136885.t001

phosphorylated ERK1/2 (pp42/pp44) (Fig 2; panel A). However, whereas incubation with PMA induced the translocation of part of total ERK1/2 from the cytoplasm to the nucleus in wt T cells, our results show that total ERK1/2 was already mainly localized in the nucleus in resting *PEA-15*-deficient T cells (Fig 2; panel B), confirming that *PEA-15* contributed to maintain location of some ERK1/2 in the cytoplasm of T lymphocytes [24]. Moreover, phosphoERK1/2 was also mainly detected in the nucleus in activated *PEA-15*-deficient T cells, whereas it was both nuclear and cytoplasmic in activated wt T cells (Fig 2; panel C). We then tested PI3K-signaling pathway downstream CD28 triggering, which might modulate TCR-signaling either via the ERK1/2 pathway or via the PI3K pathway [35,36]. Our results showed that CD28 activation of the PI3K-dependent phosphorylation of Akt did not differ between *PEA-15*-deficient T cells as compared to control wt cells (Fig 2; panel D).

Then we investigated the expression level of the immediate early growth response genes (EGR)-1, -2, -3 and cFos, which are classical transcriptional targets of the ERK1/2 signaling pathway [37]. Basal expression level of these four genes was similar between *PEA-15*-proficient and -deficient CD4+ T cells. Stimulation with anti-CD3 mAb induced a higher expression of EGR-1 and EGR-3 and to a lesser extent of EGR-2 in wt T cells, while it did not in *PEA-15*-deficient T cells (Fig 3; panel A). Addition of anti-CD28 mAbs enforced the anti-CD3-stimulated expression of EGR-1, -2 and -3 in *PEA-15*-proficient T cells. In *PEA-15*-deficient T cells, simultaneous



**Fig 2. PEA-15 regulates ERK1/2 and phosphoERK1/2 subcellular compartmentalization.** (A) Negatively sorted *PEA-15<sup>+/+</sup>* or *PEA-15<sup>-/-</sup>* CD4<sup>+</sup> T lymphocytes were stimulated with cross-linked anti-CD3 mAbs (1 µg/ml) for the indicated times. Total cell lysates (50 µg/lane) were resolved by SDS-PAGE followed by western blotting. Total ERK-1/2 was detected by the mean of anti-p42/p44 antibodies; ERK-1/2 phosphorylation was assessed with anti-phospho-ERK 1/2 antibodies. Quantitative densitometric analysis of phospho-p42 and phospho-p44 expression out of 4 experiments is presented below a representative immunoblot. Results are expressed as means  $\pm$  SEM (n = 4). (B & C) ERK1/2 localization was assessed by immunofluorescence in resting cells (NS) or cells stimulated with PMA (200 nM) for 15 minutes, using an anti-P42/P44 antibody. A representative experiment is shown in (B); histograms represent the % of enumerated cells in which the ERK 1/2 staining was cytoplasmic and/or nuclear. Values are means  $\pm$  SD of 4 independent experiments (\*  $p < 0.05$ ). (C) Phospho-ERK 1/2 localization was assessed in the same stimulation conditions as in (B) using an anti-phospho ERK-1/2 antibody. Nuclei were stained with TOPRO3. (D) Expression of phospho-Akt and Akt was assessed in sorted CD4<sup>+</sup> T lymphocytes from *PEA-15<sup>+/+</sup>* or *PEA-15<sup>-/-</sup>* mice stimulated or not with cross-linked anti-CD28 mAb (5 µg/ml) for 5 or 15 min. 50 µg of total cell lysate proteins were resolved by 12% SDS-PAGE followed by western blotting. Representative results out of 4 independent experiments are shown. Histograms representing densitometric analysis of phospho-Akt expression are shown on the right of the panel. Results are expressed as means  $\pm$  SEM of 4 independent experiments.

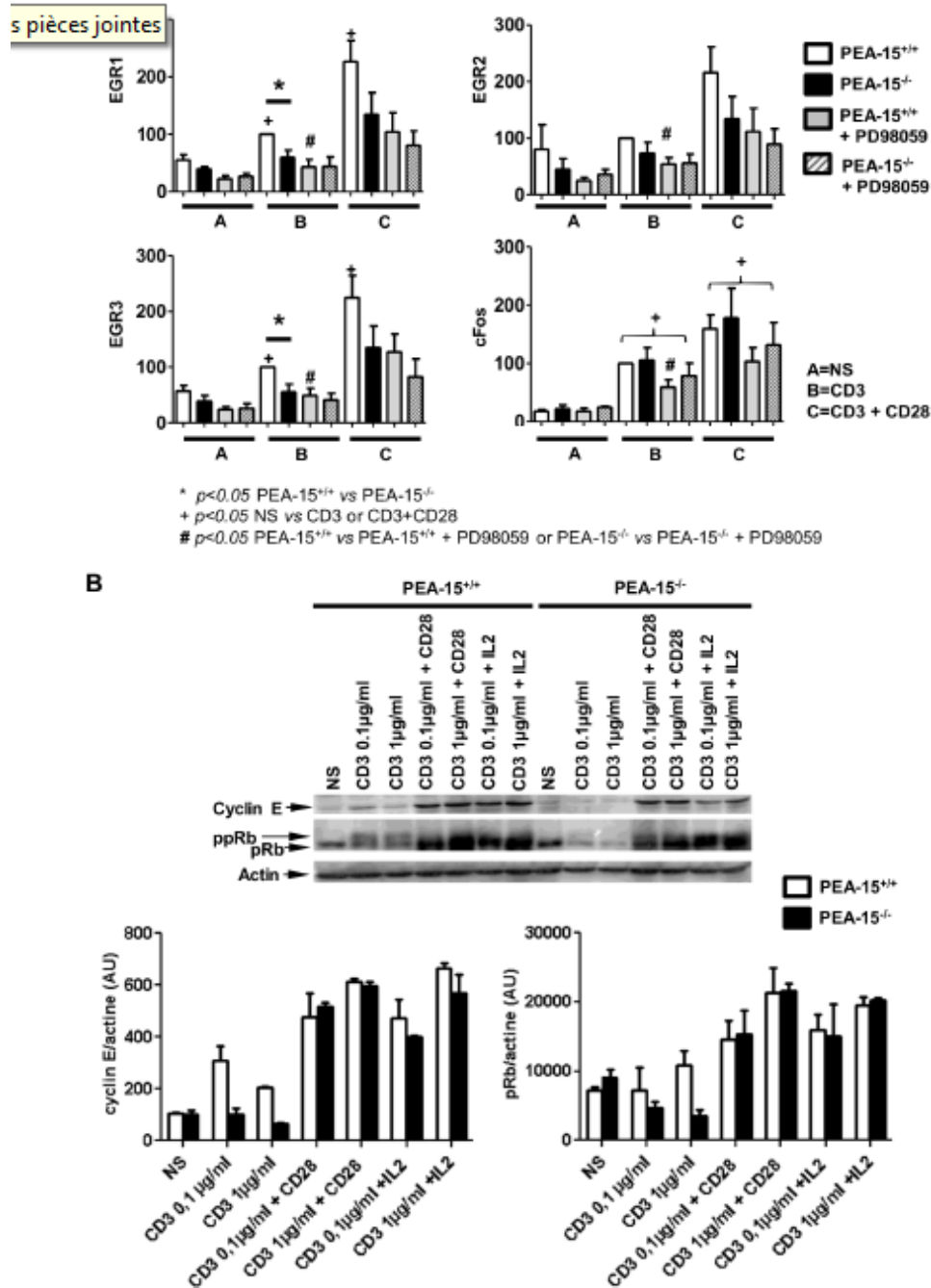
doi:10.1371/journal.pone.0136885.g002

addition of anti-CD3- and anti-CD28 mAbs stimulated the expression of EGR-1, -2, -3 although it did not reach significant level compared to resting cells (EGR1:  $p = 0.0635$ ; EGR2:  $p = 0.063$ ; EGR3:  $p = 0.19$ ). To confirm the involvement of ERK1/2 signaling in modulation of EGR1, -2, -3 expression in *PEA-15* proficient T cells, we treated wt cells with the MEK inhibitor (PD98059) before stimulation. As expected, PD98059 prevented the CD3- and CD3+CD28-stimulated enhancement of EGR-1, -2, -3 expression level in wt T cells; in accordance with defective *PEA-15*-dependent regulation of ERK1/2 activity, PD98059 treatment of stimulated *PEA-15*-deficient T cells had no effect on EGR-1, -2, -3 expression. Similarly, although expression of cFos was similarly up-regulated in *PEA-15*-deficient T cells and control wt cells after stimulation with anti-CD3 mAb in addition or not with anti-CD28 mAb; PD98059 treatment reduced this up-regulated expression only in the stimulated the wt line (Fig 3; panel A).

Considering that proper cyclin E expression and pRb phosphorylation by ERK1/2 in the nucleus is required for progression into the S phase [20], we then investigated the effect of *PEA-15* deficiency on pRb and cyclin E regulation. pRb and cyclin E were expressed at the same weak level in *PEA-15*-deficient T cells and wt control cells in the resting state. Incubation with anti-CD3 mAb alone induced pRb phosphorylation in wt cells, while it did not in *PEA-15*-deficient T cells (Fig 3; panel B). Upon incubation with anti-CD3 mAb and either with anti-CD28 mAb or rIL-2, pRb was phosphorylated in both wt and *PEA-15*-deficient T cells. Similar results were obtained when using 0.1 µg/ml or 1 µg/ml of anti-CD3 mAb. Likewise, upon incubation with anti-CD3 mAb, cyclin E expression was induced in wt- but not in *PEA-15*-deficient T cells (Fig 3; panel B). Costimulation with anti-CD28 mAb or addition of exogenous rIL-2 enhanced the CD3-stimulated expression of cyclin E in wt cells and in *PEA-15*-deficient T cells. Altogether, our data suggest that abnormal localization of phosphoERK1/2 in *PEA-15*-deficient T cells is associated with defective regulation of some downstream targets of the ERK1/2 signaling pathway.

### PEA-15 modulates the set of cytokines expressed upon TCR-stimulation of naive CD4<sup>+</sup> T cells

We then investigated how absence of *PEA-15* would impact the specification of cytokine production by naive CD62L<sup>high</sup> CD4<sup>+</sup> T cell stimulated by anti-CD3 and anti-CD28 mAbs, non-polarizing Th0 condition of functional differentiation in the absence of exogenously added polarizing cytokines. Compared to wt cells, *PEA-15*-deficient T cells secreted less IL-4 and exhibited a trend to secrete less IL-10 (Fig 4; panel A). Conversely, CD3-stimulated *PEA-15*-deficient T cells secreted more IL-17 compared to stimulated wt cells. IFN- $\gamma$  expression levels



**Fig 3. Dysregulation of ERK signaling dependent—targets in TCR-stimulated PEA-15<sup>-/-</sup> T cells.** (A) Negatively sorted CD4<sup>+</sup> T lymphocytes from PEA-15<sup>-/-</sup> mice and PEA-15<sup>+/+</sup> littermates were preincubated or not with the MEK/ERK inhibitor PD98059 (30  $\mu$ M) for 30 minutes, and then stimulated with cross-linked anti-CD3 mAbs (0.1  $\mu$ g/ml), with or without anti-CD28 mAbs (2  $\mu$ g/ml) for 30 min. Indicated genes expression was quantified by real-time quantitative PCR. Means  $\pm$  SEM from 5 separate experiments are shown, and expressed as percentage of the "CD3 (0.1  $\mu$ g/ml)-stimulated-PEA-15<sup>+/+</sup>-CD4<sup>+</sup>-T-cells" condition taken as positive control. Statistical significance is indicated \* $p < 0.05$ : for comparison between PEA-15<sup>+/+</sup> or PEA-15<sup>-/-</sup>; + $p < 0.05$ : for pairwise

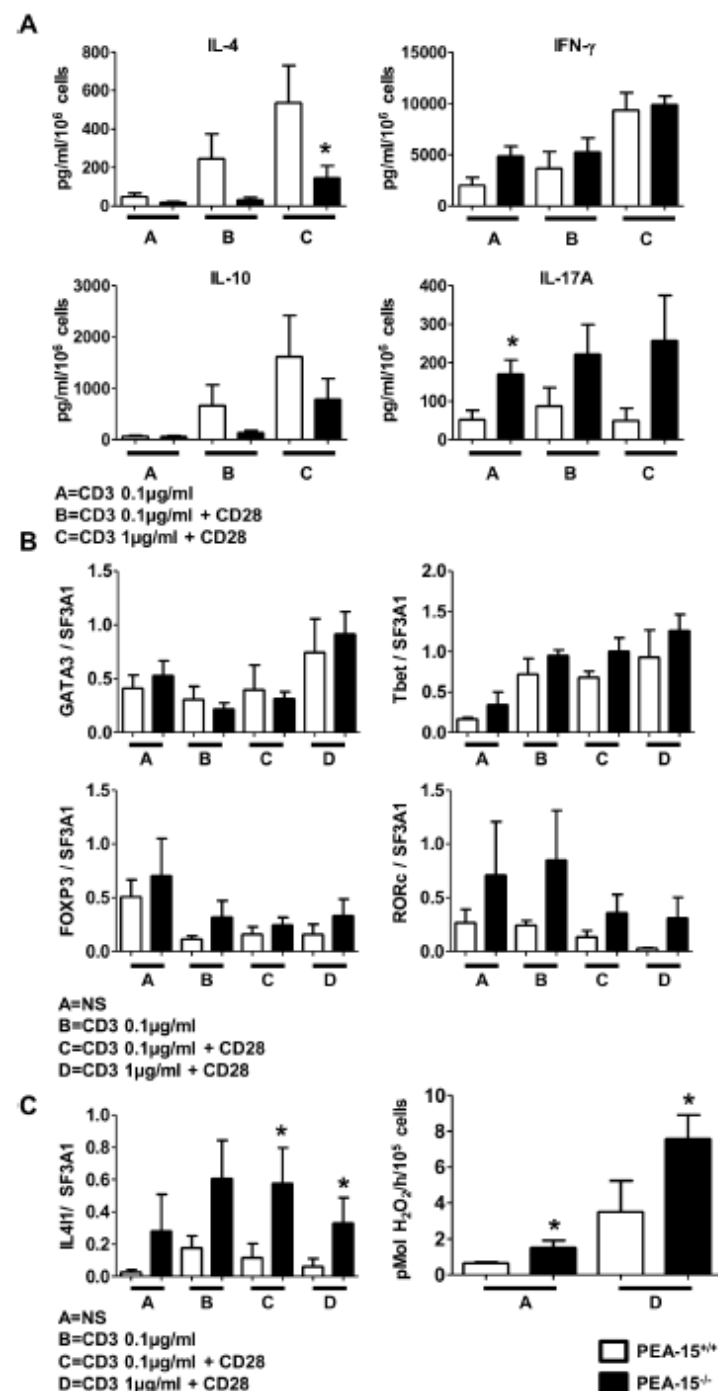
comparison of different culture condition groups; #  $p < 0.05$ : between cells treated without or with PD98059; (Mann-Whitney  $U$  test). (B) Negatively sorted CD4<sup>+</sup> T lymphocytes from *PEA-15*<sup>-/-</sup> mice and *PEA-15*<sup>+/+</sup> littermates were stimulated for 30 min with anti-CD3 (0.1–1 µg/ml), with or without anti-CD28 (5 µg/ml) mAbs, or with or without rIL-2 (100 U/ml). Whole cell lysates were prepared, and equal amounts of proteins were resolved by SDS-PAGE and blotted with anti-cyclin E mAbs, or with anti-pRb mAbs. A representative experiment out of 3 is shown. Arbitrary densitometric units for the bands were analysed by computing densitometry. Means  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ) for pRb and cyclin E expression are represented below the immunoblot.

doi:10.1371/journal.pone.0136885.g003

were similar between the lines in the different stimulation conditions. We then measured the expression of mRNA coding for the transcription factors T-bet, GATA-3, RORc and FoxP3 that are master regulators of Th1, Th2, Th17 and T<sub>reg</sub> cells differentiation, respectively [2]. While *PEA-15*-deficient and wt T cells exhibited similar levels of T-bet, GATA-3 and FoxP3, RORc seemed to be expressed at higher levels in *PEA-15*-deficient T cells although this difference did not reach statistical significance (Fig 4; panel B). Furthermore, compared to wt cells, *PEA-15*-deficient T cells expressed (Fig 4; left panel C) and secreted more IL-4-induced gene 1 (IL4I1) (Fig 4; right panel C), a phenylalanine oxidase [28,38,39], whose mRNA expression was recently showed in Th17 to be strictly dependent on RORc expression [38]. We next investigated whether the lower production of IL-4 and IL-10 by TCR-stimulated *PEA-15*-deficient CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> naïve T cells *in vitro*, was associated with an abnormal humoral immune response *in vivo*. To this aim, we used the previously described red blood cells (RBC) alloimmunization model in which mice are injected intraperitoneally with poly(I:C) and then transfused with Hen Egg Lysozyme (HEL)-conjugated RBC [31,32]. In order to sensitize the model by preventing potential suppression, prior injection with anti-CD25 mAbs was performed before transfusion, to deplete Treg before alloimmunization (Fig 5; panel A) [33,34]. Mice were sacrificed after one week, and serum levels of anti-HEL IgG were measured by cross-matched flow cytometry. While wt mice exhibited readily detectable anti-HEL IgG in their serum, *PEA-15*-deficient mice did not, demonstrating that *PEA-15* was necessary for antibody production in this model (Fig 5; panel B & panel C).

## Discussion

In this paper, we have found that *PEA-15* deficiency in CD4<sup>+</sup> T cells resulted in constrained T cell cycling and impaired production of IL-2 and IFN $\gamma$  by activated mature CD4<sup>+</sup> T cells *in vitro*, as well as impaired production of IL-4 and to a lesser extent IL-10 by TCR-stimulated differentiating CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> naïve T cells. Conversely, higher expression and activity of IL4I1, a Th17-associated phenylalanine oxidase was induced in TCR-stimulated *PEA-15*-deficient CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> naïve T cells. These abnormalities were associated with defective humoral response to RBC alloimmunization in *PEA-15*-deficient mice *in vivo*. In parallel, our results showed that absence of *PEA-15* resulted in abnormal subcellular compartmentalization of phosphoERK1/2 in resting and activated CD4<sup>+</sup> T cells, and this was associated with impaired regulation of classical targets of the ERK1/2 signaling pathway. Although indirectly, our data suggest that *PEA-15*-dependent regulation of cytokines expression in CD4<sup>+</sup> T cells, involves lower ERK1/2-signaling, in accordance with other reports, showing that subcellular compartmentalization of ERK1/2 represents another level of regulation of the enzymes activity, besides phosphorylation of ERK1/2 [40–42]. The resident nuclear ERK1/2 in resting *PEA-15*-deficient T cells, confirms the data reported by Pastorino et al. [24]; it may be the result of previous *in vivo* ERK1/2 activation followed by dephosphorylation by nuclear phosphatases and defect of return of ERK1/2 to the cytoplasm due to *PEA-15* deficiency, both mechanisms resulting in lower amount of the enzyme available in the cytoplasm for a subsequent activation. In agreement with this hypothesis, crystal structure analysis recently illustrated that *PEA-15* binding triggers an extended allosteric conduit in dually phosphorylated ERK2, disrupting key features



**Fig 4.** Activated PEA-15<sup>-/-</sup> T cells have decreased IL-4 production, and increased activity of IL4I1. (A, B & C) Sorted naïve CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> T lymphocytes from PEA-15<sup>-/-</sup> mice (■) and PEA-15<sup>+/+</sup> (□) mice were

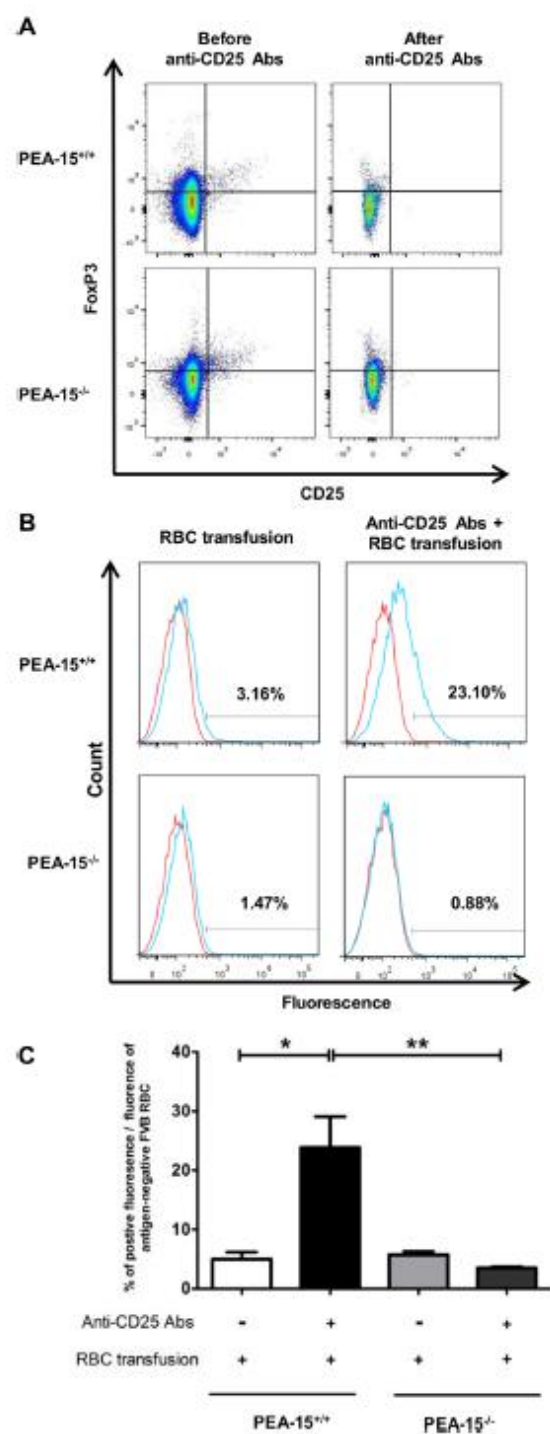
stimulated with anti-CD3 (0.1–1  $\mu\text{g/ml}$ ) with or without anti-CD28 (2 $\mu\text{g/ml}$ ), for 5 days. (A) Cytokines production was quantified in the culture supernatants by Luminex assay. (B) GATA3, Tbet, FOXP3 and RORc, and IL4/11 (C left panel) genes expression was analyzed by real-time quantitative PCR in total mRNA extracts of the cultures. Means  $\pm$  SEM from  $n = 6$  out of 2 independent experiments are presented. (C right panel) IL4/11 activity was measured in  $10^5$  CD4 $^{+}$  CD62L $^{+}$  T lymphocytes stimulated or not with plate-bound anti-CD3- (1  $\mu\text{g/ml}$ ) and soluble anti-CD28 (2 $\mu\text{g/ml}$ ) mAbs for 5 days. Means  $\pm$  SEM from four separate experiments are presented. Statistical significance is indicated for comparison between PEA-15 $^{+/+}$  and PEA-15 $^{-/-}$  T cells, \* $p < 0.05$  (Mann-Whitney U test).

doi:10.1371/journal.pone.0136885.g004

of active ERK2 and at the same time PEA-15 binding protects ERK2 from dephosphorylation and finally prepares it to be released at a given place for a given target [25]. In support of the regulatory role of PEA-15 on amplitude of ERK1/2 activity, is the lower expression of the ERK1/2 transcriptional target *EGR1* [37] in stimulated PEA-15-deficient T cells compared to stimulated PEA-15-proficient T cells; conversely, ERK1/2 signal duration seems not to be not affected by PEA-15 absence, as suggested by the similar *c-Fos* expression level shown in both lines [43]. Pretreatment of CD3-stimulated PEA-15-deficient T cell with the MEK/ERK inhibitor (PD98059) had no effect on *EGR1*, -2, -3 expression compared to the inhibitory effect of this pretreatment on expression of the same four genes in CD3-stimulated wt T cells; this further supports the involvement of ERK1/2 in impaired *EGRs* expression shown in PEA-15-deficient T cells. Moreover, the lower expression of *EGR1* in stimulated PEA-15-deficient T cells may contribute to reduced IL-2 expression [44,45] and lower counts of proliferating PEA-15-deficient T cells due to impaired IL-2-dependent ERK autocrine loop [18,46]. Further, the lower expression of *EGR1* may also contribute to reduced IL-4 expression in stimulated-naïve PEA-15-deficient T cells [47]. This would be in accordance with reports showing that Th2 differentiation was positively regulated by ERK [12–15]. Impaired IL-2 and/or IL-4 secretion by TCR/CD28-stimulated PEA-15-deficient cells could also contribute to the higher expression of IL-17A and IL-11 shown in mutant cells compared to PEA-15-proficient cells, in accordance with previous results showing that IL-2 constrains Th17 cell generation and that IL-4 negatively regulates T helper cell production of IL-17A [48–50]. However, direct effect of altered ERK1/2 activity on enhanced expression of Th17-related molecules in PEA-15-deficient T cells cannot be excluded, as MEK/ERK1/2 signaling was shown to regulate Th17 differentiation, positively or negatively, depending on the pharmacologic inhibitor used [16,17].

In our model of RBC alloimmunization, we have used poly(I:C), a classical adjuvant for Th1 responses [51]. Thus the lower IL-2 and IFN $\gamma$  production after activation of mature PEA-15-deficient CD4 $^{+}$  T cells compare to wt CD4 $^{+}$  T cells, could contribute to the defective humoral alloimmune response to RBC observed *in vivo* in Treg-depleted PEA-15-deficient mice. Moreover, impairment of IL-10 production could contribute to the abnormal humoral response to RBC observed *in vivo* in PEA-15-deficient mice. Indeed, IL-10 plays a major role in B cell differentiation and Ig switching [52,53]. However, our results do not allow to exclude the potential contribution of abnormal antigen presenting cells- and B cells proper functions due to PEA-15 deficiency in these cells, in the defective humoral alloimmune response to RBC observed in our model.

Alternatively, another mechanism that could contribute to explain reduced IL-4, IL-10 and IFN $\gamma$  production by stimulated PEA-15-deficient CD4 $^{+}$  T cells, could be the defective cell cycling [3–6] of TCR-stimulated PEA-15 $^{-/-}$  T cells, associated with the reduced levels of cyclin E expression and phosphorylation of pRb, both molecules regulating the G1 to S/G2/M transition and being ERK-dependent [54]. Similar expression of GATA-3, the master regulator of IL-4 transcription, found in the mutant and control T cells might be explained by the cell cycle independence of GATA-3 expression [55]. Further, the impaired proliferation of PEA-15-



**Fig 5. Resistance of PEA-15<sup>-/-</sup> mice to HEL+RBC alloimmunization.** Three days before the red blood cell (RBC) transfusion, PEA-15<sup>-/-</sup> or PEA-15<sup>+/+</sup> mice were depleted in Treg with an anti-CD25 mAb. At day 0, mice were transfused with a leukoreduced blood from HEL<sup>+</sup> HOD mice, 4 hours after injection of the adjuvant poly (I:C). (A) Representative Dot plots showing % of CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg among CD4<sup>+</sup> T-cells before and after *in vivo* Treg depletion with anti-CD25 Abs; (B) Histograms showing representative data of anti-HEL IgG in sera from PEA-15<sup>-/-</sup> or PEA-15<sup>+/+</sup> mice using flow cytometry-based mHEL crossmatch. HEL<sup>+</sup> HOD RBCs (blue line) or HEK-negative FVB RBCs (red line; negative control) were incubated with a 1/10 dilution of sera from transfused PEA-15<sup>-/-</sup> or PEA-15<sup>+/+</sup> mice (n = 10; 2 independent experiments). (C) For each group of mice, the % of the positive mean fluorescence intensity was defined as the mean fluorescence of the serum crossmatched with HEL-negative FVB RBCs subtracted from the mean fluorescence of the serum crossmatched with HEL<sup>+</sup> HOD RBCs. Statistical analysis were performed with the Mann-Whitney test. \* p<0.05; \*\* p<0.01.

doi:10.1371/journal.pone.0136885.g005

deficient T cells when treated with both anti-CD3- and anti-CD28 mAbs might derive from a partial block in mitosis due to the ERK1/2-dependent arm of CD28-dependent signaling [56]. Conversely, the similar phosphorylation of Akt in PEA-15-deficient and -proficient T cells after stimulation with anti-CD28 mAb suggested that the PI3-kinase-dependent arm of CD28-dependent signaling [57,58] did not contribute to the defective proliferation of PEA-15-deficient T cells, in contrast with the effect of the other DD (death domain)-adaptor c-FLIP on T-cell activation, which was proposed to be PI3K-dependent [59]. Finally, a higher sensitivity of PEA-15-deficient CD4<sup>+</sup> T cells to Fas-dependent AICD [60] cannot be evoked to explain the lower frequency of CD4<sup>+</sup> T cells reported in PEA-15-deficient mice; indeed, in accordance with Pastorino *et al.* [24], we showed that Fas-dependent AICD was preserved in PEA-15-deficient T cells, in contrast to the anti-apoptotic function of PEA-15 in fibroblasts, gliomas and astrocytes [23]. Some of our results contrast with those reported by Pastorino *et al.* [24], who claimed that PEA-15 negatively regulated T cell proliferation and IL-2 production. This discrepancy could be due to the much greater amount of anti-CD3 mAb, and therefore the strength of TCR signaling [10,11,15] used in Pastorino *et al.*'s experiments [24], which could account for the higher anti-TNP Ig levels due to higher Th1/Th2 cytokines production. It is notable that we found that the PEA-15-deficient mice do not have spontaneous adenopathy, as similarly reported by Pastorino *et al.* [24] which already noticed that this observation was rather paradoxical compared to the PEA-15-dependent negative regulation of T cell proliferation suggested by their others results. However, the differences in immunization conditions, for example the subcutaneous route of immunization used in this latter work, as well as the difference in the genetic background, could also explain the discrepancy of this result compared to ours. Altogether our findings demonstrate that PEA-15 contributes to the specification of the cytokine repertoire downstream the TCR-dependent activation of naïve T cells which contributes to regulation of Th differentiation. Although indirectly, our results suggest also that this phenomenon is dependent on PEA-15-dependent ERK1/2 activity regulation. Thus, it might be speculated that the PEA-15/ERK2 axis is an attractive target for therapeutic approaches aiming at suppressing the T cell-dependent activation and differentiation.

## Supporting Information

**S1 Table. Sequences of oligonucleotide primers used for quantitative RT-PCR studies.** (PDF)

## Acknowledgments

We thank Dr. Steve Hedrick and Pr. Nicolas Glaichenhaus for critical review of the manuscript and helpful discussions. We thank also Véronique Bierre and Enora Floch for expert technical skill.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: BV MPJ FC JB GG HC SLG. Performed the experiments: SK BV FC FRM SDRT MS. Analyzed the data: SK BV MPJ FC SDRT MS JB GG HC SLG. Contributed reagents/materials/analysis tools: BV MPJ FC FNP. Wrote the paper: SK BV MPJ FC GG HC SLG.

## References

1. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996. 383:787–793. PMID: [8893001](#)
2. Murphy KM, Reiner SL. The lineage decisions of helper T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2002. 2:933–944. PMID: [12461566](#)
3. Bird JJ, Brown DR, Mullen AC, Moskowitz NH, Mahowald MA, Sider JR, et al. Helper T cell differentiation is controlled by the cell cycle. *Immunity* 1998. 9: 229–237. PMID: [9729043](#)
4. Gett AV, Hodgkin PD. Cell division regulates the T cell cytokine repertoire, revealing a mechanism underlying immune class regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998. 95: 9488–9493. PMID: [9689107](#)
5. Gudmundsdottir H, Wells AD, Turka LA. Dynamics and requirements of T cell clonal expansion in vivo at the single-cell level: effector function is linked to proliferative capacity. *J. Immunol.* 1999. 162: 5212–5223. PMID: [10227995](#)
6. Richter A, Lohning M, Radbruch A. Instruction for cytokine expression in T helper lymphocytes in relation to proliferation and cell cycle progression. *J. Exp. Med.* 1999. 190:1439–1450. PMID: [10562319](#)
7. Laouar Y, Crispe IN. Functional flexibility in T cells: independent regulation of CD4+ T cell proliferation and effector function in vivo. *Immunity* 2000. 13: 291–301. PMID: [11021527](#)
8. Ben-Sasson SZ, Gerstel R, Hu-Li J, Paul WE. Cell division is not a 'clock' measuring acquisition of competence to produce IFN- $\gamma$  or IL-4. *J. Immunol.* 2001. 166: 112–120. PMID: [11123283](#)
9. Rooney JW, Hoey T, Glimcher LH. Coordinate and cooperative roles for NF-AT and AP-1 in regulation of the murine IL-4 gene. *Immunity* 1995. 2:473–483. PMID: [7749982](#)
10. Schade AE, Levine AD. Extracellular signal-regulated kinase1/2 function as integrators of TCR signal strength. *J. Immunol.* 2004. 172:5828–5832. PMID: [15128760](#)
11. Jorritsma PJ, Brogdon JL, Bottomly K. Role of TCR-induced extracellular signal-regulated kinase activation in the regulation of early IL-4 expression in naive CD4+ T cells. *J. Immunol.* 2003. 170:2427–2434. PMID: [12594266](#)
12. Yamashita M, Shinnakasu R, Asou H, Kimura M, Hasegawa A, Hashimoto K, et al. Ras-ERK MAPK cascade regulates GATA3 stability and Th2 differentiation through ubiquitin-proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* 2005. 280: 29409–29419. PMID: [15975924](#)
13. Yamane H, Zhu J, Paul WE. Independent roles for IL-2 and GATA3 in stimulating naive CD4+ T cells to generate a Th2-inducing cytokine environment. *J. Exp. Med.* 2005. 202: 793–804. PMID: [16172258](#)
14. Goplen N, Karim Z, Guo L, Zhuang Y, Huang H, Gorska MM, et al. ERK1 is important for Th2 differentiation and development of experimental asthma. *FASEB J.* 2012; 26: 1934–1945. doi: [10.1096/fj.11.195477](#) PMID: [22262639](#)
15. Chang CF, D'Souza WN, Ch'en IL, Pagès G, Pouyssegur J, Hedrick SM. Polar opposites: Erk direction of CD4+ T cell subsets. *J. Immunol.* 2012. 189: 721–731. doi: [10.4049/jimmunol.1103015](#) PMID: [22675204](#)
16. Tan AH, Lam KP. Pharmacologic inhibition of MEK-ERK signaling enhances Th17 differentiation. *J. Immunol.* 2010. 184: 1849–1857. doi: [10.4049/jimmunol.0901509](#) PMID: [20061405](#)
17. Liu H, Yao S, Dann SM, Qin H, Elson CO, Cong Y. ERK differentially regulates Th17- and Treg-cell development and contributes to the pathogenesis of colitis. *Eur. J. Immunol.* 2013. 43: 1716–1726. doi: [10.1002/eji.201242889](#) PMID: [23620016](#)
18. Luo X, Zhang Q, Liu V, Xia Z, Pothoven KL, Lee C. Cutting hedge: TGF- $\beta$ -induced expression of Foxp3 in T cells is mediated through inactivation of ERK. *J. Immunol.* 2008. 180: 2757–2761. PMID: [18292494](#)
19. Mor A, Keren G, Kloog Y, George J. N-Ras or K-Ras inhibition increases the number and enhances the function of Foxp3 regulatory T cells. *Eur. J. Immunol.* 2008. 38: 1493–1502. doi: [10.1002/eji.200838292](#) PMID: [18461565](#)
20. Meloche S, Pouyssegur J. The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene* 2000. 26: 3227–3239.

21. Araujo H, Danziger N, Cordier J, Glowinski J, Chneiweiss H. Characterization of PEA-15, a major substrate for protein kinase C in astrocytes. *J. Biol. Chem.* 1993. 268: 5911–5920. PMID: [8449955](#)
22. Formstecher E, Ramos JW, Fauquet M, Calderwood DA, Hsieh JC, Canton B, et al. PEA-15 mediates cytoplasmic sequestration of ERK MAP kinase. *Dev. Cell.* 2001. 1: 239–250. PMID: [11702783](#)
23. Flory F, Formisano P, Perruolo G, Beguinot F. Frontiers: PED/PEA-15, a multifunctional protein controlling cell survival and glucose metabolism. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2009. 297: 592–601.
24. Pastorino S, Renganathan H, Caliva MJ, Filbert EL, Opoku-Ansah J, Sulzmaier FJ, et al. The death effector domain protein PEA-15 negatively regulates T-cell receptor signalling. *FASEB J.* 2010. 24: 2818–2828. doi: [10.1096/fj.09-144295](#) PMID: [20354143](#)
25. Maoc PD, Waller Y, Egger MF, Dobaczewska MK, Robinson H, Pasquale EB, et al. Structure of ERK2 bound to PEA-15 reveals a mechanism for rapid release of activated MAPK. *Nature Communications.* 2013. 4: 1681. doi: [10.1038/ncomms2687](#) PMID: [23575685](#)
26. Kitzberg D, Formstecher E, Fauquet M, Kubas M, Cordier J, Canton B, et al. Knock-out of the neural death effector domain protein PEA-15 demonstrates that its expression protects astrocytes from TNF $\alpha$ -induced apoptosis. *J. Neurosci.* 1999. 19: 8244–8251. PMID: [10493725](#)
27. Lyons AB. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *J. Immunol. Methods* 2000. 243: 147–154. PMID: [10986412](#)
28. Boulland ML, Marquet J, Molinier-Frenkel V, Moller P, Guiter C, Lasoudris F, et al. Human IL411 is a secreted L-phenylalanine oxidase expressed by mature dendritic cells that inhibits T-lymphocyte proliferation. *Blood* 2007. 110: 220–227. PMID: [17356132](#)
29. Guillot-Deibst M, Le Gouvello S, Mesele-Lemoine M, Cherai M, Baillou C, Simon A, et al. Human CD90 antigen identifies interleukin 17 and granulysin positive T-cells that are defective in HIV-infected patients. *J. Immunol.* 2012. 188: 981–991. doi: [10.4049/jimmunol.1101592](#) PMID: [22184726](#)
30. Gibson UE, Held CA, Williams PM. A novel method for real-time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* 1996. 6: 995–1001. PMID: [8908519](#)
31. Zimring JC, Hair GA, Chadwick TE, Deshpande SS, Anderson KM, Hillyer CD, et al. Nonhemolytic antibody-induced loss of erythrocyte surface antigen. *Blood* 2005. 106: 1105–1112. PMID: [15831698](#)
32. Hendrickson JE, Desmarests M, Deshpande SS, Chadwick TE, Hillyer CD, Roback JD, et al. Recipient inflammation affects the frequency and magnitude of immunization to transfused red blood cells. *Transfusion* 2006. 46: 1526–1536. PMID: [16965580](#)
33. Yu J, Heck S, Yazdanbakhsh K. Prevention of red cell alloimmunization by CD25 regulatory T cells in mouse models. *Am. J. Hematol.* 2007. 82: 691–696. PMID: [17492644](#)
34. Oldenhove G, de Heusch M, Urbain-Vansanten G, Urbain J, Maliszewski C, Leo O, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells control T helper cell type-1 responses to foreign antigens induced by mature dendritic cells in vivo. *J. Exp. Med.* 2003. 198: 259–266. PMID: [12874259](#)
35. Riley JL, Mao M, Kobayashi S, Biery M, Burchard J, Cavet G, et al. Modulation of TCR-induced transcriptional profiles by ligation of CD28, ICOS, and CTLA-4 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002. 99: 11790–11795. PMID: [12195015](#)
36. Diehn M, Alizadeh AA, Rando OJ, Liu CL, Stankunas K, Botstein D, et al. Genomic expression programs and the integration of the CD28 costimulatory signal in T cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002. 99: 11796–11801. PMID: [12195013](#)
37. Murphy LO, MacKeigan JP, Blenis J. A network of immediate early gene products propagates subtle differences in mitogen-activated protein kinase signal amplitude and duration. *Mol. Cell. Biol.* 2004. 24: 144–153. PMID: [14673150](#)
38. Santarlasci V, Maggi L, Capone M, Querci V, Beltrame L, Cavalieri D, et al. Rarity of human T helper 17 cells is due to retinoic acid orphan receptor-dependent mechanisms that limit their expansion. *Immunity* 2012. 36: 201–214. doi: [10.1016/j.immuni.2011.12.013](#) PMID: [22326581](#)
39. Scarlata C-M, Celse C, Pignon P, Ayyoub M, Valmori D. Differential expression of the immunosuppressive enzyme IL411 induces Aiolos+, but not Helios+, FOXP3+ Treg cells. *Eur J Immunol* 2015. doi: [10.1002/eji.201444897](#)
40. Pouyssegur J, Volmat V, Lenormand P. Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Biochemical Pharmacology* 2002. 64: 755–763. PMID: [12213567](#)
41. Ebisuya M, Kondoh K, Nishida E. The duration, magnitude and compartmentalization of ERK MAP kinase activity: mechanisms for providing signaling specificity. *J. Cell. Sci.* 2005. 118: 2997–3002. PMID: [16014377](#)
42. Mebratu Y, Tesfagzi Y. How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death, is subcellular localization the answer? *Cell Cycle* 2009. 8: 1168–1175. PMID: [19282669](#)

43. Murphy LO, Smith S, Chen RH, Finger DC, Blenis J. Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products. *Nat. Cell. Biol.* 2002. 4: 556–564. PMID: [12134156](#)
44. Skerka C, Decker EL, Zipfel PF. A regulatory element in the human interleukin 2 gene promoter is a binding site for the zinc finger proteins Sp1 and EGR1. *J. Biol. Chem.* 1995. 270: 22500–22506. PMID: [7673240](#)
45. Decker EL, Skerka C, Zipfel PF. The early growth response protein (EGR1) regulates Interleukin-2 transcription by synergistic interaction with the nuclear factor of activated T cells. *J. Biol. Chem.* 1998. 273: 26923–26930. PMID: [9756940](#)
46. Boyman O, Sprent J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2012. 12: 180–190. doi: [10.1038/nri3156](#) PMID: [22343569](#)
47. Lohoff M, Gialli M, Köhler R, Casper B, Krammer PH, Li-Weber M. Early growth response protein-1 (EGR1) is preferentially expressed in T helper type 2 (Th2) cells and is involved in acute transcription of the Th2 cytokine interleukin-4. *J. Biol. Chem.* 2010. 285: 1643–1652. doi: [10.1074/jbc.M109.011585](#) PMID: [19915002](#)
48. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang Y-H, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nature Immunol.* 2005. 6: 1133–1141.
49. Laurence A, Tato CM, Davidson TS, Kanno Y, Chen Z, Yao Z, et al. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* 2007. 26: 371–381. PMID: [17363300](#)
50. Gomez-Rodriguez J, Wohlfert EA, Hannon R, Meylan F, Wu JZ, Anderson SM, et al. Itk-mediated integration of T cell receptor and cytokine signaling regulates the balance between Th17 and regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 2014. 211:529–543. doi: [10.1084/jem.20131459](#) PMID: [24534190](#)
51. Longhi MP, Trumpfheller C, Idoyaga J, Caskey M, Matos I, Kluger C, et al. Dendritic cells require a systemic type I interferon response to mature and induce CD4+ Th1 immunity with poly I:C as adjuvant. *J. Exp. Med.* 2009. 206:1589–1602. doi: [10.1084/jem.20090247](#) PMID: [19564349](#)
52. Rousset F, Garcia E, DeFrance T, Péronne C, Vezzio N, Hsu DH, et al. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1992. 89:1890–1893. PMID: [1371884](#)
53. DeFrance T, Vanbervliet B, Brière F, Durand I, Rousset F, Banchereau J. Interleukin 10 and transforming growth factor beta cooperate to induce anti-CD40-activated naive human B cells to secrete immunoglobulin A. *J. Exp. Med.* 1992. 175:671–682. PMID: [1371300](#)
54. Torii S, Yamamoto T, Tsuchiya Y, Nishida E. ERK MAP kinase in G1 cell cycle progression and cancer. *Cancer Sci.* 2006. 97:697–702. PMID: [16800820](#)
55. Mullen AC, Hutchins AS, Villarino AV, Lee HW, High FA, Cereb N, et al. Cell cycle controlling the silencing and functioning of the mammalian activators. *Current Biology* 2001. 11:1695–1699. PMID: [11696328](#)
56. Janardhan SV, Praveen K, Marks R, Gajewski TF. Evidence implicating the Ras pathway in multiple CD28 costimulatory functions in CD4+ T cells. *PloS ONE* 2001. 6: e24931. doi: [10.1371/journal.pone.0024931](#)
57. Appleman LJ, Berezovskaya A, Grass I, Boussiotis VA. CD28 costimulation mediates T cell expansion via IL-2-independent and IL-2-dependent regulation of cell cycle progression. *J. Immunol.* 2000. 164: 144–151. PMID: [10605005](#)
58. Appleman LJ, van Puijenbroek AA, Shu KM, Nadler LM, Boussiotis VA. CD28 costimulation mediates down-regulation of p27kip1 and cell cycle progression by activation of the PI3K/PKB signaling pathway in primary human T cells. *J. Immunol.* 2002. 168: 2729–2736. PMID: [11884439](#)
59. Fang LW, Tai TS, Yu WN, Liao F, Lai MZ. Phosphatidylinositol 3-kinase priming couples c-FLIP to T cell activation. *J. Biol. Chem.* 2004. 279: 13–18. PMID: [14578361](#)
60. Van den Brink MR, Kapeller R, Pratt JC, Chang JH, Burakoff SJ. The extracellular signal-regulated kinase pathway is required for activation-induced cell death of T cells. *J. Biol. Chem.* 1999. 274: 11178–11185. PMID: [10196203](#)

## Résumés

**Title :** Cigarette smoke exposure induces senescence of CD4<sup>+</sup> Th17 lymphocytes

**Keywords :** Th17, IL-8, senescence, mitochondrial metabolism

**Abstract :**

Smoking worsens chronic inflammatory diseases (COPD, Crohn disease, rheumatoid arthritis, psoriasis) associated with inflammatory CD4<sup>+</sup> IL-17 secreting lymphocytes (Th17). Smoking is associated with an absolute number and proportion increase, at both systemic and pulmonary levels, of Th17 cells. This increase of Th17 cells in smokers contrasts with their usual rarity in peripheral tissues and inflammatory sites. Most of the knowledge about the effects of cigarette smoke exposure comes from COPD studies, and, in COPD increased senescence of pulmonary cells has been associated to the pathogenesis of the disease. The mechanisms responsible for the increase of Th17 cells are still unknown, and the potential role of senescence in this increase and functional modifications of Th17 in smokers has never been explored.

In this study, we hypothesized that Th17 present a higher susceptibility to cigarette smoke-induced senescence, as compared to other CD4<sup>+</sup> T lymphocytes subsets, which could be responsible for the increased number and proportion of Th17 in smokers, and the higher inflammatory potential of these cells. We analyzed senescence susceptibility of Th17 exposed to cigarette smoke condensate (CSC), and the potential role of ERK1/2 signaling pathway in this phenomenon. We also analyzed the potential role of reactive oxygen species (ROS) known to be implicated, on one hand in ERK1/2 activation, and on another hand in cellular senescence.

Quiescent CCR6<sup>+</sup> Th17 and CCR6<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T lymphocytes of healthy donors are exposed *in vitro* to cigarette smoke extract (CSE). ROS production is measured by H<sub>2</sub>DCF-DA oxidation (flow cytometry). Senescence is evaluated by p16<sup>INK4a</sup> expression (ImmunoFluorescence). Expression of relevant cytokines (Luminex/CBA) evaluated inflammatory potential.

Our results show that quiescent CD4<sup>+</sup> Th17 exposed to CSE present an increase of senescence markers:  $\beta$ -galactosidase activity and expression of cell cycle inhibitors p16<sup>INK4a</sup> and ATF3. Moreover, CSE exposure modifies Th17 secretion pattern and increases IL-8 secretion. Our results also show that ERK1/2 MAPK pathway is implicated in Th17 senescent phenotype induction upon CSE exposure. The overexpression of p16<sup>INK4a</sup> is associated with a higher activation and a nuclear translocation of ERK1/2 in Th17 cells. Treatment with the anti-oxidant NAC reduces CSE-induced ROS and p16<sup>INK4a</sup> expression in all CD4<sup>+</sup> T cell subsets, but the higher production of ROS and higher p16<sup>INK4a</sup> expression in Th17 as compared to other CD4<sup>+</sup> T cells are maintained. Treatment with mitochondrial complex III inhibitor, antimycin, maintains the higher production of ROS in Th17 as compared to other CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, whereas p16<sup>INK4a</sup> expression is reduced to the same level in all subsets. Conversely, treatment with the mitochondrial decoupling agent, FCCP, reduces p16<sup>INK4a</sup> expression to the same level in Th17 as in other CD4<sup>+</sup> T cell subsets, and abrogates the difference of ROS production between Th17 compared to CCR6<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T lymphocytes.

We show that human Th17 lymphocytes present a higher senescence susceptibility to CSE exposure as compared to other CD4<sup>+</sup> T lymphocytes sub-populations. Moreover, our results suggest that a higher mitochondrial activity in Th17 in steady state is responsible for the Th17 higher senescence susceptibility upon CSC exposure. Finally, we show for the first time, that mild mitochondrial respiratory chain uncoupling is an effective solution to prevent Th17 senescent phenotype and could represent an anti-inflammatory strategy in Th17-associated chronic inflammatory diseases.

**Titre :** L'exposition à la fumée de cigarette induit la sénescence des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Th17 humains.

**Mots clés :** Th17, IL-8, sénescence, métabolisme mitochondrial

## Résumé :

Le tabagisme aggrave de nombreuses maladies inflammatoires chroniques (BPCO, maladie de Crohn, arthrite rhumatoïde, psoriasis) associées à la sous-population de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (LT CD4<sup>+</sup>) inflammatoires sécrétant l'IL-17 (Th17). Le tabagisme est associé à une augmentation en nombre et en proportion, du nombre de Th17 systémiques et pulmonaires, contrastant avec la rareté habituelle de ces cellules dans les tissus périphériques-sites d'inflammation. Le tabagisme est associé à l'augmentation de la sénescence des cellules pulmonaires récemment impliquée dans la pathogénèse de la BPCO. Les mécanismes responsables de l'augmentation des Th17 chez les fumeurs sont encore inconnus, et le rôle potentiel de la sénescence dans cette augmentation et la modification des fonctions des Th17 n'a jamais été exploré.

Dans ce travail, nous avons fait l'hypothèse que les Th17 présentent une susceptibilité augmentée à la sénescence induite par l'exposition à la fumée de cigarette, en comparaison des autres sous-populations de LT CD4<sup>+</sup>, qui serait responsable de l'augmentation des Th17, et contribuerait à l'aggravation de leur potentiel inflammatoire. Nous avons analysé la susceptibilité des Th17 à la sénescence induite par l'exposition au condensat de FC (CFC), et le rôle de la voie de signalisation ERK1/2 dans ce phénomène. Nous avons également analysé le rôle des espèces réactives de l'oxygène (ERO), impliquées, d'une part dans la régulation de l'activation de ERK1/2, et d'autre part dans la sénescence cellulaire.

Des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> CCR6<sup>+</sup> Th17 et T CD4<sup>+</sup> CCR6<sup>-</sup> quiescents de donneurs sains ont été exposés *in vitro* au CFC. La production d'ERO est mesurée en analysant l'oxydation de la sonde H<sub>2</sub>DCF-DA (cytométrie de flux). La sénescence est évaluée en analysant l'expression de p16<sup>INK4a</sup> (ImmunoFluorescence). L'analyse de l'expression des cytokines (Luminex/CBA) évalue le potentiel inflammatoire des cellules.

Nos résultats montrent que les LT CD4<sup>+</sup> Th17 quiescents exposés au CFC présentent une augmentation de différents marqueurs de sénescence : activité  $\beta$ -galactosidase, expression des inhibiteurs du cycle cellulaire p16<sup>INK4a</sup> et ATF3. L'exposition au CFC modifie le profil sécrétoire des Th17 quiescents et induit leur sécrétion d'IL-8. Nous montrons que la voie des MAPKs ERK1/2 est impliquée dans l'induction du phénotype sénéscent des Th17 en réponse à une exposition au CFC. La sur-expression de p16<sup>INK4a</sup> est associée à une activation et une translocation nucléaire de ERK1/2 plus importante dans les Th17. Le traitement antioxydant par la NAC, diminue l'expression des ERO et de p16<sup>INK4a</sup> induite par l'exposition au CFC dans toutes les sous-populations de LT CD4<sup>+</sup>, mais maintient la production d'ERO et l'expression de p16<sup>INK4a</sup> plus importantes dans les Th17 en comparaison des autres sous-populations de LT CD4<sup>+</sup>. Le traitement par l'inhibiteur du complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale, l'antimycine, maintient la production d'ERO plus importante dans les Th17, mais l'expression de p16<sup>INK4a</sup> est diminuée à des niveaux comparables dans tous les LT CD4<sup>+</sup>. En revanche, le traitement par l'agent découplant, le FCCP, diminue l'expression de p16<sup>INK4a</sup> et la production d'ERO à des niveaux comparables dans tous les LT CD4<sup>+</sup>, et abroge les différences de production d'ERO entre les Th17 et les T CD4<sup>+</sup> CCR6<sup>-</sup>.

Nous montrons que les lymphocytes Th17 humains présentent une susceptibilité plus importante à la sénescence induite par l'exposition au CFC en comparaison des autres sous-populations de LT CD4<sup>+</sup>. Nos résultats suggèrent que l'activité mitochondriale basale plus importante dans les Th17, est responsable de la plus grande susceptibilité des Th17 à la sénescence après exposition au CFC. Enfin, nous montrons pour la première fois qu'un découplage modéré de la chaîne respiratoire mitochondriale est une solution efficace pour prévenir la sénescence des Th17 et pourrait être une stratégie anti-inflammatoire dans les maladies chroniques associées aux Th17.