

ÉCOLE DOCTORALE
SANTÉ, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE DU VIVANT

INEM UMR 7355 Equipe : Inflammation pulmonaire, Signaux de dangers, Asthme

THÈSE présentée par :

Manoussa FANNY

soutenue le : **25 Novembre 2016**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université d'Orléans**

Discipline/ Spécialité : Biologie Moléculaire et Cellulaire, spécialité Immunologie

**Etude des mécanismes de l'inflammation
pulmonaire lors de l'exposition aux
nanoparticules ou la fumée de cigarette**
Implication des voies de signalisations des récepteurs
ST2 et NLRP6

THÈSE dirigée par :

Isabelle COUILLIN
François ERARD

Directrice de recherche, UMR 7355, CNRS Orléans
Professeur, Université d'Orléans

RAPPORTEURS :

Anne TSICOPOULOS
Virginie PETRILLI

Directrice de recherche, UMR Inserm 1019, Pasteur Lille
Chargée de recherche, UMR CNRS 5286, CRCL Lyon

JURY :

Stéphane MORTAUD
Anne TSICOPOULOS
Virginie PETRILLI
Sophie LANONE
Tobias STÖGER
Isabelle COUILLIN
François ERARD

Professeur, Université d'Orléans
Directrice de recherche, C2IL, Pasteur Lille
Chargée de recherche, CRCL Lyon
Directrice de recherche, IMRB, Créteil
Directeur de recherche, CPC, Munich
Directrice de recherche, CNRS Orléans
Professeur, Université d'Orléans

Remerciements	
Production scientifique.....	
Liste des abréviations.....	
Table des figures.....	
Introduction	1
1.1 Les poumons interface de libre échange	1
1.1.1 Qu'est-ce que le poumon	1
1.1.2 Le poumon chez l'Homme	1
1.1.3 Le poumon chez la souris	4
1.2 Les maladies pulmonaires.....	5
1.2.1 Historique	5
1.2.2 Les maladies pulmonaires infectieuses	6
1.2.2.1 La pneumonie	6
1.2.2.2 La grippe	7
1.2.2.3 Aspergillose	7
1.2.3 Les maladies pulmonaires inflammatoires	7
1.2.3.1 L'asthme allergique	7
1.2.3.2 La fibrose pulmonaire	8
1.2.3.2.1 Généralités	8
1.2.3.2.2 Les agents responsables de la fibrose pulmonaire idiopathique	9
i Les nanoparticules	9
ii La bléomycine	12
1.2.3.2.3 La physiopathologie de la fibrose pulmonaire idiopathique	12
i La phase d'inflammation aiguë	12
ii La phase d'inflammation chronique	13
1.2.3.3 La broncho pneumopathie obstructive chronique (BPCO)	13
1.2.3.3.1 Les agents responsables de la BPCO	13
1.2.3.3.2 La physiopathologie de la BPCO	13
i La phase de remodelage pulmonaire	14
ii La phase emphysémateuse	14
iii Les traitements de la BPCO	15
1.3 Les modèles expérimentaux utilisés	16
1.3.1 Le modèle nanoparticule	16
1.3.2 Le modèle bléomycine	16
1.3.3 Le modèle de fumée de cigarette.....	16
1.4 Le système immunitaire	16
1.4.1 Le système immunitaire inné	17
1.4.1.1 La notion de danger	17
1.4.1.2 Les cellules immunitaires et peptides de défense	17
1.4.1.2.1 Les cellules dendritiques	18
1.4.1.2.2 Les monocytes et macrophages	20
1.4.1.2.3 Les polynucléaires neutrophiles	24
1.4.1.2.4 Les éosinophiles, basophiles et mastocytes	28
1.4.1.3 Les cytokines	29
1.4.1.3.1 Le « tumor necrosis factor » (TNF)	29
1.4.1.3.2 Les interférons (IFNs)	32
1.4.1.3.3 Les chimiokines.....	33
1.4.1.3.4 Les interleukines (IL).....	35

i	La superfamille de l'IL-1	35
ii	IL-1 β /IL-1F2.....	36
iii	L'Interleukine 33.....	37
1.4.1.4	Les senseurs de l'immunité innée.....	43
1.4.1.4.1	Les Toll-like receptors (TLR).....	43
1.4.1.4.2	Les Nod-like receptors (NLR).....	45
1.4.2	Le système immunitaire adaptatif	56
1.4.2.1	Les cellules T	56
1.4.2.2	Les cellules B	59
1.5	<i>Objectifs de la thèse</i>	<i>60</i>
Résultats		61
1.1	<i>L'IL-33 intracellulaire contenu dans les macrophages permet l'exacerbation de l'inflammation pulmonaire médiée par les nanoparticules de silices</i>	<i>61</i>
1.2	<i>L'axe IL-33/ST2 est précocement impliqué dans la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine</i>	<i>106</i>
1.3	<i>Le récepteur NLRP6 régule l'inflammation induite par la fumée de cigarette.....</i>	<i>126</i>
Discussion		160
1.1	<i>Les nanoparticules de silices induisent une inflammation pulmonaire dépendante de l'IL-33 intracellulaire.....</i>	<i>160</i>
1.2	<i>Rôle anti-inflammatoire de l'IL-33, dans un modèle de fibrose induite par la bléomycine.....</i>	<i>164</i>
1.3	<i>NLRP6 est impliqué dans la régulation de l'inflammation en réponse à la fumée de cigarette</i>	<i>165</i>
1.4	<i>BPCO et fibrose pulmonaire, les enjeux thérapeutiques actuels</i>	<i>167</i>
1.5	<i>Pertinence du modèle murin utilisé dans l'étude de la fibrose pulmonaire et la BPCO</i>	<i>171</i>
Conclusion		173

Remerciements

Voici venue l'heure des remerciements. La thèse est une vraie course de fond avec ces incertitudes ses déceptions, mais aussi ses joies et ses moments de partage. Ce périple ne s'entreprend jamais seul. Nous sommes accueillis dans une grande famille et c'est aujourd'hui à cette famille que je vais dire MERCI.

Tout d'abord je souhaite remercier les Dr Valérie Quesniaux et le Pr Bernhard Ryffel de m'avoir accueillie à bras ouverts au sein de cette unité.

Un grand merci à ma directrice de thèse le Dr Isabelle Couillin et mon co-directeur le Pr François Erard, auprès desquels j'ai énormément appris et qui m'ont accompagnée tout au long de cette étape.

Bien entendu je n'oublie pas de remercier mon équipe sans qui rien de tout cela n'aurait été réalisable. Merci à Beb la première personne qui a pris en charge le début de ma formation ; merci à Auré auprès de laquelle j'ai partagé dans le même bureau les derniers mois de stress et l'épisode de Greys anatomy de 5h du matin ! Merci à Coco qui m'a montré les ficelles de l'*in vivo*. Merci à Florence de m'avoir formée sur la qPCR et enfin bon courage à Mégane, c'est à ton tour de reprendre le fil de l'histoire. Je n'oublie pas non plus le Dr Le Bert qui était toujours disponible pour nous informer sur les bonnes pratiques de laboratoire. Merci aussi à toi Ludivin on ne s'est pas connues longtemps mais on s'est tout de suite bien entendue.

Je souhaite également remercier les autres membres du laboratoire

La TB team : tout d'abord merci à Steph pour son aide constante et ces midis à manger en ta compagnie. Un remerciement tout spécial à Sulayman, merci pour les services que tu as pu me rendre pendant ces deux dernières années et tous ces « apple time » à discuter de muscu, de tout et de rien mais surtout de muscu. Un immense merci à mon amie Noria avec qui j'ai partagé 2 années et ½, nous nous sommes rencontrées puis accompagnées dans cette épreuve pendant laquelle nous avons pu rire de tout, de rien et faire des sessions de « brain storming ».

Merci à Izaz qui a été là pour me former à la qualité et m'aider à passer les commandes en urgence.

Merci aux membres du G4 : Rafiou merci pour tous les moments de rigolades que nous avons passé ensemble. Au moment où j'écris ces quelques lignes tu soutiens dans 2 semaines mais j'ai l'intime conviction que tout se passera bien. Un grand merci à Mémez qui a été mon tout premier voisin de bureau et qui a fini par devenir un ami (sans oublier Kim bien entendu). Merci donc de nouveau à Noria qui a été là pour initier et mettre en place l'organisation du BBQ INEM 2015.

Un grand merci à toute l'équipe d'Artimunne au grand complet, notamment Loulou qui a toujours été là pour me montrer quelques techniques, Popo également là pour faire un brin de causette, Aurélie Ledru, Nathalie et Quentin, toujours disponibles ; sans oublier Typhounette !

Je ne peux pas remercier Artimunne sans te remercier toi Dieudo, merci pour tous tes encouragements et tes conseils ils m'ont beaucoup servi et me serviront encore.

Merci aux « Immunos » que je n'ai pas encore remercié : à Claire, Chloé, Flora, Nadège et Caroline pour votre bonne humeur et votre disponibilité.

Merci également à Florence.A pour m'avoir aidé à utiliser EndNote.

J'adresse également un grand merci à l'équipe des « Neuneu », avec qui j'ai pu interagir et qui m'a beaucoup aidé pour tous mes protocoles de purification de protéines (merci Stéphane), de traitement de data de séquençage (merci Olivier) ; pour le tuyau de la plateforme de séquençage (merci à toi Maryvonne). Merci également à Anthony avec qui on pouvait passer de longs moments à discuter enseignement, merci pour tes encouragements. A Arnaud.M et Arnaud.P ainsi qu'à David.L, Justine, Vanessa et tous ceux que j'aurai malencontreusement oublié merci à vous.

J'adresse un merci à David Gosset qui a toujours été de bons conseils avec le tri, le facs de même que pour les IF.

Je n'oublie pas non plus les animaliers sans qui nous ne pourrions rien faire, merci à Tam avec qui j'ai géré les lignées dont j'étais responsable pendant ces 3 années. Merci à Dupon et Dupon pour votre bonne humeur et vos blagues !

Je tiens à remercier les copines de « nail-art » : Noria (encore !) merci pour l'organisation des soirées et ta constante bonne humeur, merci à Léa (tu m'as fait découvrir le banofi et ça, ça n'est pas rien !), à Popo, Typhounette, sans oublier ma Fanfan ! Qui a aussi été à mes côtés depuis mon arrivée au labo, Amandine et Nono. Merci à toutes.

Je remercie aussi tous mes amis pour leur soutien sans faille et leurs encouragements: un grand merci à Sidney, Anouchka, Thomas, Alexandra, Matt, Quentin (mon binôme de toujours), Damien, Julie, PB, Gilles, Willy, Françoise, et Noria (décidément tu es partout dic-donc !). CS merci de m'avoir écouté et fait rire pendant cette période qui n'était pas facile (certaines d'entre vous sont les prochaines, courage les filles !).

Enfin les derniers mais pas les moindres, j'adresse un immense merci à tous les membres de ma famille ; à Ginger, Marvin, David, Daniel et Catherine (merci pour vos encouragements). Merci à mon frère et ma sœur de m'avoir écouté, conseillés et fait tellement rigolé. Merci à mes tantes (Karine, Oumou, Fatou et Sylvaine) qui ont toujours su me soutenir à chaque étape ; merci à mes grands-parents qui ont toujours su trouver le petit mot pour me booster et faire repartir la machine de plus belle. Et enfin merci à toi maman pour avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui, de m'avoir soutenue quoiqu'il arrive et aidée à avancer (sans oublier la rigueur !)

A toute cette grande famille je dis : MERCI !

Production scientifique

Articles publiés :

- Francois A., A. Gombault, B. Villeret, G. Alsaleh, **M. Fanny**, P. Gasse, S. Marchand Adam, B. Crestani, J. Sibilia, P. Schneider, S. Bahram, V. Quesniaux, B. Ryffel, D. Wachsmann, J-E. Gottenberg, I. Couillin. B cell activating factor is central to bleomycin- and IL-17-mediated experimental pulmonary fibrosis. *J Autoimmun.* 56:1-11 (2015) PMID: 25441030
- Baron L, Gombault A, **Fanny M**, Villeret B, Savigny F, Guillou N, Panek C, Le Bert M, Lagente V, Rassendren F, Riteau N, Couillin I. The NLRP3 inflammasome is activated by nanoparticles through ATP, ADP and adenosine. *Cell Death Dis.* 6:e1629 (2015)

Articles soumis :

- **Manoussa Fanny**^{1*}, Ludivine Baron^{1*}, Fabien Bastaert², Marc Le Bert¹, David Cornu³, Valérie Quesniaux¹, François Erard¹, Jean-Michel Sallenave², Bernard Ryffel¹, Aurélie Gombault¹, Isabelle Couillin¹: Nuclear IL-33 promotes nanoparticles-induced pulmonary inflammation in absence of the IL-33 receptor ST2 (submitted to JEM).

Articles en préparation pour soumission :

- **Manoussa Fanny**¹, Mégane Nascimento¹, Corinne Panek¹, François Erard¹, Lionel Apetoh², Mathias Chamaillard³, Bernhard Ryffel¹, A. Gombault¹ and Isabelle Couillin¹: Nlrp6 regulates pulmonary inflammation to cigarette smoke exposure.
- **Manoussa Fanny**^{1*}, Ludivine Baron^{1*}, Aurélie Gombault¹, Isabelle Maillet¹, François Erard¹, Bernard Ryffel¹, Valérie Quesniaux¹, Sandra Mège and Isabelle Couillin¹: IL-33/ST2 axis regulates pulmonary inflammation and fibrosis to bleomycin.

Articles en cours :

- Mégane Nascimento^{1*}, **Manoussa Fanny**^{1*}, Corinne Panek¹, Aurélie Gombault¹, Bernhard Ryffel¹ and Isabelle Couillin¹: BAFF is involved in inflammation to cigarette smoke exposure.

Liste des abréviations

Soit **Y** pouvant être remplacé par des lettres ou nombres différents

α_1-AT	Alpha 1 antitrypsine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AP1	Activator protein-1
Areg	Amphiréguline
ARN	Acide ribonucléique
ASC	Apoptosis associated speck-like protein
ASC^{-/-}	Souris déficientes pour ASC
ATF4	Activateur de facteur de transcription 4
ATP	Adénosine triphosphate
BAFF	B cell activating factor
BALT	Bronchus associated lymphoid tissue
BCG	Bacille de Calmette et Guérin
BIR	Baculovirus inhibitor of apoptosis repeat
BPCO	Bronchopneumopathie chronique obstructive
CARD	Caspase activation and recruitment domain
CASP^{-/-}	Souris déficientes pour la caspase 1/11
CCLY	Chimiokine Y de la famille C-C
CCRY	Récepteur Y des chimiokines de la famille C-C
CDY	Cluster de différenciation
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	Cellules présentatrices d'antigène
CREB	cAMP responsive element binding protein
CSH	Cellules souches hématopoïétiques
CV	Capacité vitale
CXCLY	Chimiokine Y de la famille C-X-C
DAMP	Molécules associées aux signaux de dangers
DC	Cellules dendritiques
DC SIGN	Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing non-integrin
ECP	Protéine cationique éosinophilique
EGFR	Epidermal growth factor receptor
Elafin Tg	Souris transgéniques pour l'élafine
EPO	Peroxydase éosinophilique
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
FADD	FAS associated protein with death domain
G-CSF	Granulocyte colony stimulating factor
GOLD	Global initiative for chronic obstructive lung disease
HDAC2	Histone déacétylase 2
HDACY	Histone désacétylase Y
IBD	Maladie inflammatoire de Bowel
IFNARY	Récepteur à Interféron alpha/bêta de type Y
IFN-Y	Interféron Y
IgY	Immunoglobuline de type Y
ILC	Innate lymphoid cells
IL-Y	Interleukine Y
IL-Y R	Récepteur des interleukines Y
IPF	Fibrose pulmonaire idiopathique
IRFY	Interferon regulatory factor Y
ISG	Interferon stimulating genes
ISG	Interferon stimulating genes
JAK	Janus kinase
KC	Keratinocyte chemoattractant
LPS	Lipopolysaccharide
LRR	Leucine reach repeat
LTA	Acide lipoteichoïque

MAVS	Mitochondrial antiviral-signaling protein
MBP	Protéine basique majeure
M-CSF	Macrophage colony stimulating factor
mDC	Cellules dendritiques myéloïdes
MMPY	Métallo protéases Y
MUC5AY	Mucine 5A de type Y
MY	Macrophage de type Y
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
NAIP	NLR family apoptosis inhibitory protein
NBD	Nucleotide binding domain
NET	Neutrophil extracellular traps
NF-κB	Nuclear factor kappa bêta
NK	Natural killer
NKT	Cellules T « natural killer »
NLR	Nod like receptor
NLRP3^{-/-}	Souris déficientes pour NLRP3
NLRP6^{-/-}	Souris déficientes pour NLRP6
NLRPY	NLR family pyrin domain containing Y
NOD	NLR nucleotide oligomerization domain receptor
NOX-4	NADPH oxidase 4
NRF2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
PAMP	Molécules associées aux pathogènes
PD-1	Programmed cell death-1
pDC	Cellules dendritiques plasmacitoïdes
PD-L1	Programmed cell death ligand-1
PGM	Progéniteur granulo-monocytaire
PKC Y	Protéine kinase C Y
PLC	Progéniteurs lymphoïdes communs
PMC	Progéniteur myéloïde commun
PMD	Progéniteur macro-dendritique
PMP	Progéniteur multipotent
PRR	Pathogens recognition receptors
PTX	Toxine pertussique
PYD	Pyrin domain
RLR	RIG like helicase receptor
SIGLEC F	Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin F
siRNA	Petits ARN interférents
SIRPα	Signal-regulatory protein-α
SP	Protéines de surfactant
ST2^{-/-}	Souris déficientes pour ST2
STAT	Signal transducers and activators of transcription
STING	Stimulator of interferon genes
TACE	TNF alpha converting enzyme
TCR	Récepteur des cellules T
TGF-β	Transforming growth factor bêta
ThY	Lymphocyte T auxiliaire de type Y
TIMPY	Inhibiteurs de métallo protéases Y
TIR	Toll IL-1 receptor
TLR	Toll like receptor
TNF	Tumor necrosis factor
TNFRY	Tumor necrosis factor receptor Y
Treg	Lymphocyte T régulateur
TREM2	Triggering receptor expressed by myeloid cells 2
TSLP	Thymic stromal lympho protein
VEMS	Volume maximum expire en 1 seconde
VIH	Virus de l'immuno-déficience humaine
WT	Souris de type sauvage C57Bl/6

Table des figures

Figure 1 : Forme et structure des poumons humains.	2
Figure 2 : Composition de l'épithélium trachéale et bronchique.....	3
Figure 3 : Epithélium des alvéoles pulmonaires.	4
Figure 4 : Forme des poumons murins.	5
Figure 5 : Les 10 principales causes de mortalité dans le monde.	6
Figure 6 : Les frontières du nano-monde.....	9
Figure 7 : Surface d'échange des nanoparticules.....	10
Figure 8 : Les trois principales voies d'endocytose des nanoparticules.	11
Figure 9 : Classification de GOLD (global initiative for chronic obstructive lung disease)...	14
Figure 10 : Hétérogénéité des monocytes/macrophages.....	20
Figure 11 : Classification des macrophages de type 1 et 2.....	22
Figure 12 : La balance d'activation des macrophages alvéolaires.....	23
Figure 13 : Mécanismes effecteurs des neutrophiles.....	25
Figure 14 : La nétose.....	26
Figure 15 : Mécanismes impliqués dans l'inhibition (panel de gauche) et dans l'activation (panel de droite) des cellules T par les neutrophiles.....	27
Figure 16 : Différenciation des cellules hématopoïétiques.	29
Figure 17 : Les multiples formes du récepteur au TNF et de la signalisation intracellulaire.	30
Figure 18 : Résumé des effets immunostimulateurs et immunosuppresseurs du TNF.	31
Figure 19 : Ligands et récepteurs de la famille de l'IL-1.....	36
Figure 20 : L'IL-33 libérée par les cellules en apoptose ou suite à un dommage induit un signal via ST2.....	38
Figure 21 : Action de l'IL-33 en réaction aux helminths ou aux allergènes.	40
Figure 22 : Exemples de régulation de l'inflammation induite par l'IL-33.....	41
Figure 23 : IL-33 une alarmine nucléaire libérée lors de dommages cellulaires.	42
Figure 24 : Les TLR chez les mammifères et leur voie de signalisation.....	44
Figure 25 : Aperçu des stimuli qui peuvent être reconnus par les NLR et induire la formation d'un inflammasome.....	45
Figure 26 : Structure des NOD Like Recepteurs.	47
Figure 27 : Organisation des domaines constituant les NLR qui à leur tour peuvent constituer un inflammasome.....	48

Figure 28 : Mécanisme d'activation des inflammasomes.....	49
Figure 29 : Mécanisme d'activation de l'inflammasome NLRP3.....	51
Figure 30 : Différences entre l'inflammasome NLRP3 et NLRP6.	52
Figure 31 : Régulation par NLRP6 de façon inflammasome dépendent et inflammasome indépendant de : la clairance microbienne, la colite, la tumorigenèse et l'intégrité de la barrière épithéliale.....	53
Figure 32 : Inflammasome NLRP6, gardien de l'homéostasie intestinale.	54
Figure 33 : De multiples mécanismes impliqués dans la suppression de l'inflammation et de la tumorigenèse via NLRP6.	55
Figure 34 : Production de mucus par les cellules caliciformes de l'intestin dépendante de NLRP6.....	56
Figure 35 : Développement des cellules T.....	57
Figure 36 : Différenciation des lymphocytes TCD4 en Th1, Th2, Th17 ou Treg.	58
Figure 37 : Stades de développement des lymphocytes B.	60
Figure 38 : Présentation des cibles thérapeutiques en cours de développement contre la BPCO.	169

Introduction

1.1 Les poumons interface de libre échange

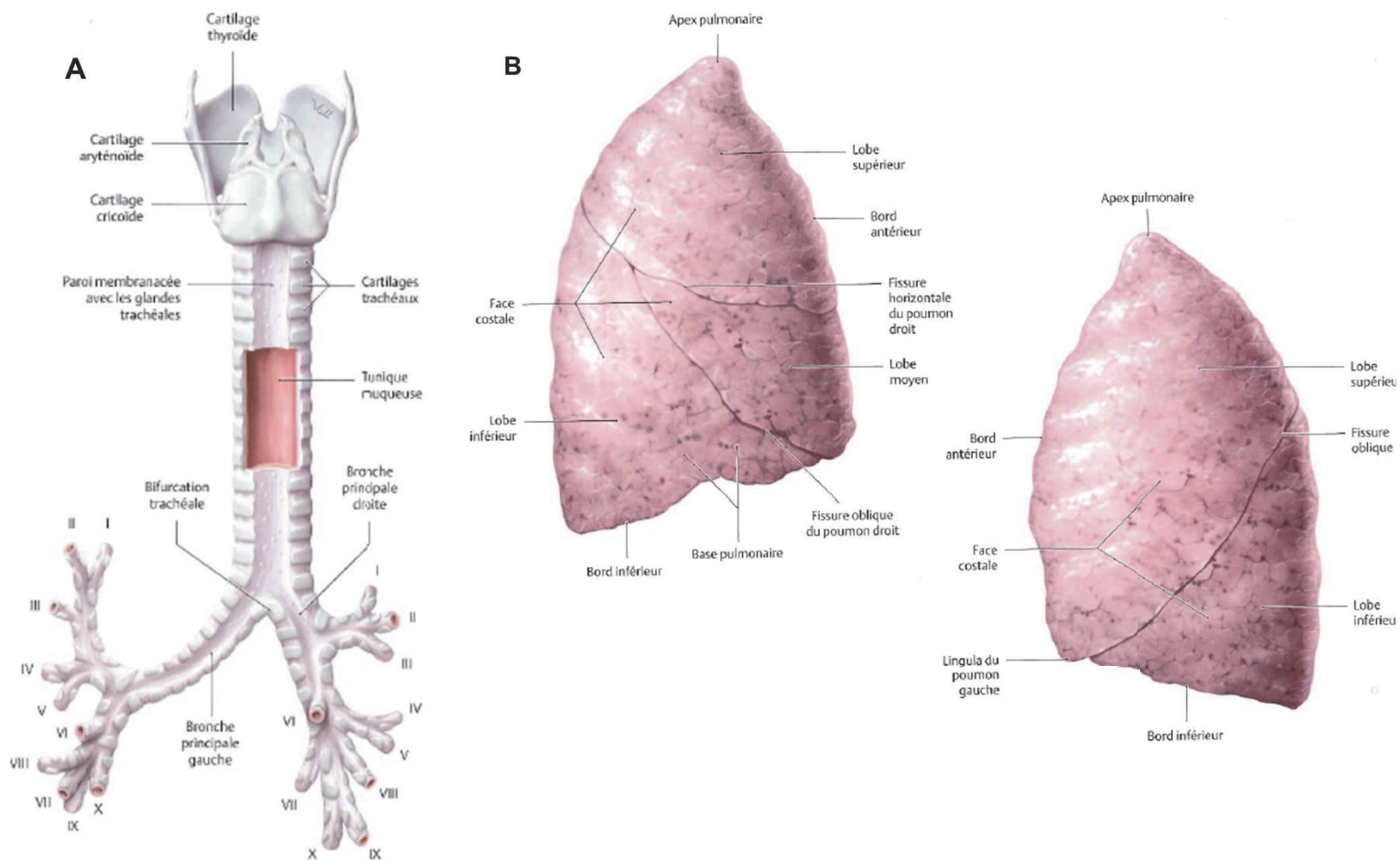
1.1.1 Qu'est-ce que le poumon

Le poumon, organe de la respiration permettant l'approvisionnement en oxygène du corps, et donc le bon fonctionnement des organes et des cellules de celui-ci, est indispensable à la survie de l'Homme. Le poumon puise l'oxygène dans notre environnement et y rejette le dioxyde de carbone. Il constitue donc une interface entre le monde extérieur et notre organisme qui est l'une des plus importantes du corps humain. Le poumon est alimenté par la circulation sanguine. La circulation systémique qui assure essentiellement la nutrition des organes, peut être distinguée de la circulation pulmonaire, qui joue un rôle dans la détoxification du sang et son oxygénation. Lors de la respiration, c'est en moyenne 4,3 Litres d'air par minute que l'on inspire et expire. ([Murray, 2010](#)).

1.1.2 Le poumon chez l'Homme

Le poumon humain est constitué de 5 lobes, 3 lobes sur le côté droit et 2 sur le côté gauche ([Schünke et al., 2007](#)). Le lien entre ces lobes se fait par l'intermédiaire des bronches et des bronchioles. En effet, au départ de la trachée, deux bronches principales cartilagineuses se subdivisent en plusieurs bronchioles plus petites et sans cartilage au sein desquelles s'effectue le passage d'air. Au bout de toutes ces ramifications qui composent l'arborescence pulmonaire, se trouvent les alvéoles pulmonaires qui constituent le lieu d'échange entre l'air et le sang. (**Figure 1**)

Ces différentes structures sont contenues par la plèvre et la cage thoracique au niveau du thorax.



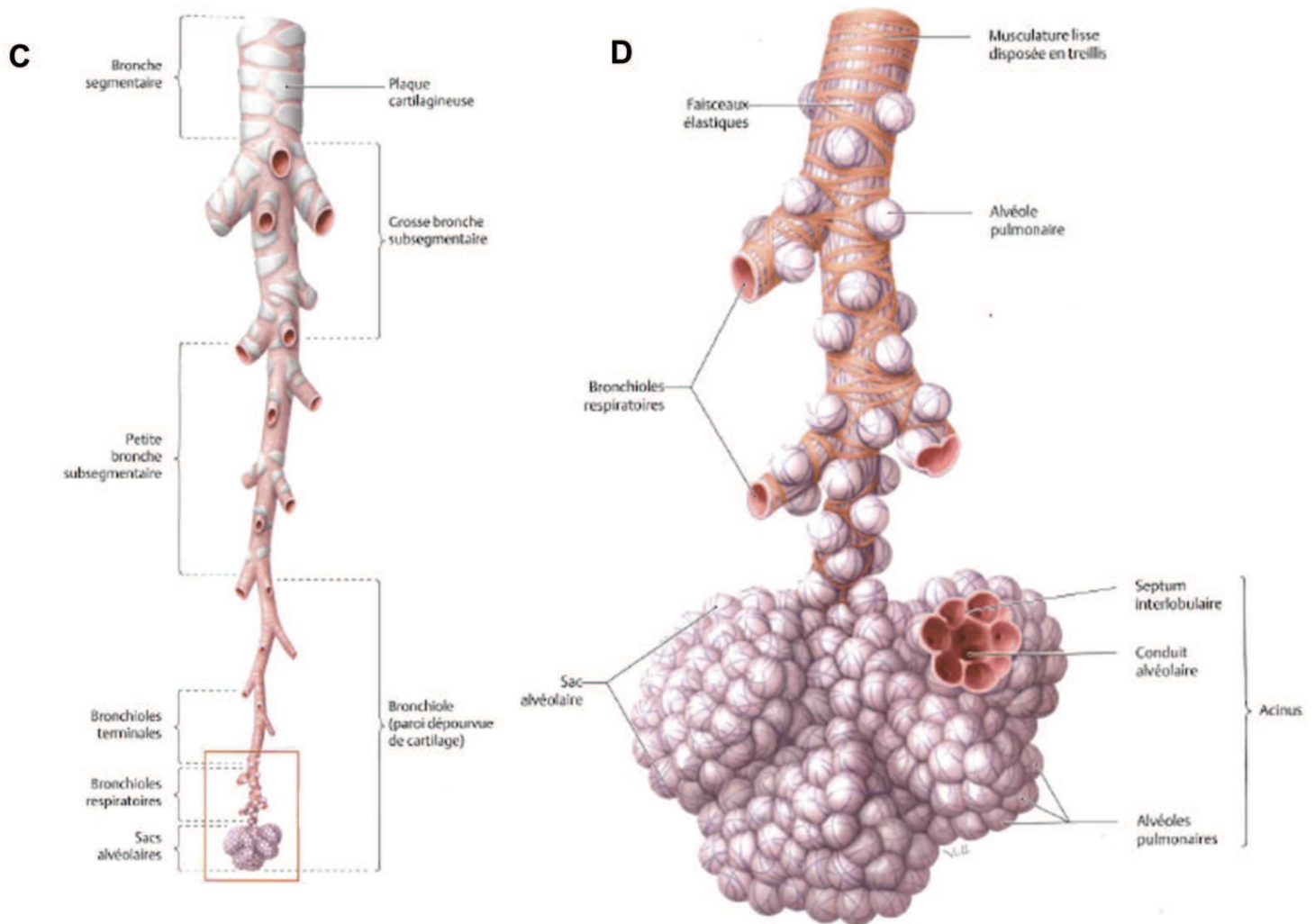


Figure 1 : Forme et structure des poumons humains.

A) Structure de la trachée et de l'arbre bronchique. B) Poumons gauche et droit, forme et structure macroscopique. C) Arborescence pulmonaire. D) Structure microscopique d'une bronchiole respiratoire. (Figures modifiées à partir de : ([Schünke et al., 2007](#)))

L'épithélium pulmonaire est pluristratifié et repose sur un tissu conjonctif : la *lamina propria*. Au niveau de la trachée, des bronches et des bronchioles, il se compose de cellules ciliées non sécrétrices et de cellules sécrétrices, lesquelles peuvent être divisées en deux catégories :

- Dans la muqueuse trachéo-bronchique : les cellules caliciformes qui possèdent de nombreuses vacuoles de sécrétion contenant des glycoprotéines pouvant être exocytées.
- Dans la muqueuse des bronchioles : les cellules Club qui possèdent des microvillosités et des grains de sécrétion qui contiennent des anti-protéases et des oxydases.

Ces deux types cellulaires coopèrent dans le phénomène de clairance muco-ciliaire qui se traduit d'une part par la capture des particules étrangères par le mucus, et d'autre part par l'évacuation de ces dernières via le mouvement mécanique des cils. L'épithélium compte également les cellules basales qui sont situées plus en profondeur, contre la lame basale. Ces cellules sont très importantes et entrent en jeu dans le renouvellement cellulaire. Enfin, des cellules neuroendocrines font également parties de cet épithélium ; bien que minoritaires, elles n'en demeurent pas moins indispensables car elles servent à détecter les variations d'oxygènes et de dioxyde de carbone dans l'air. (**Figure 2**)

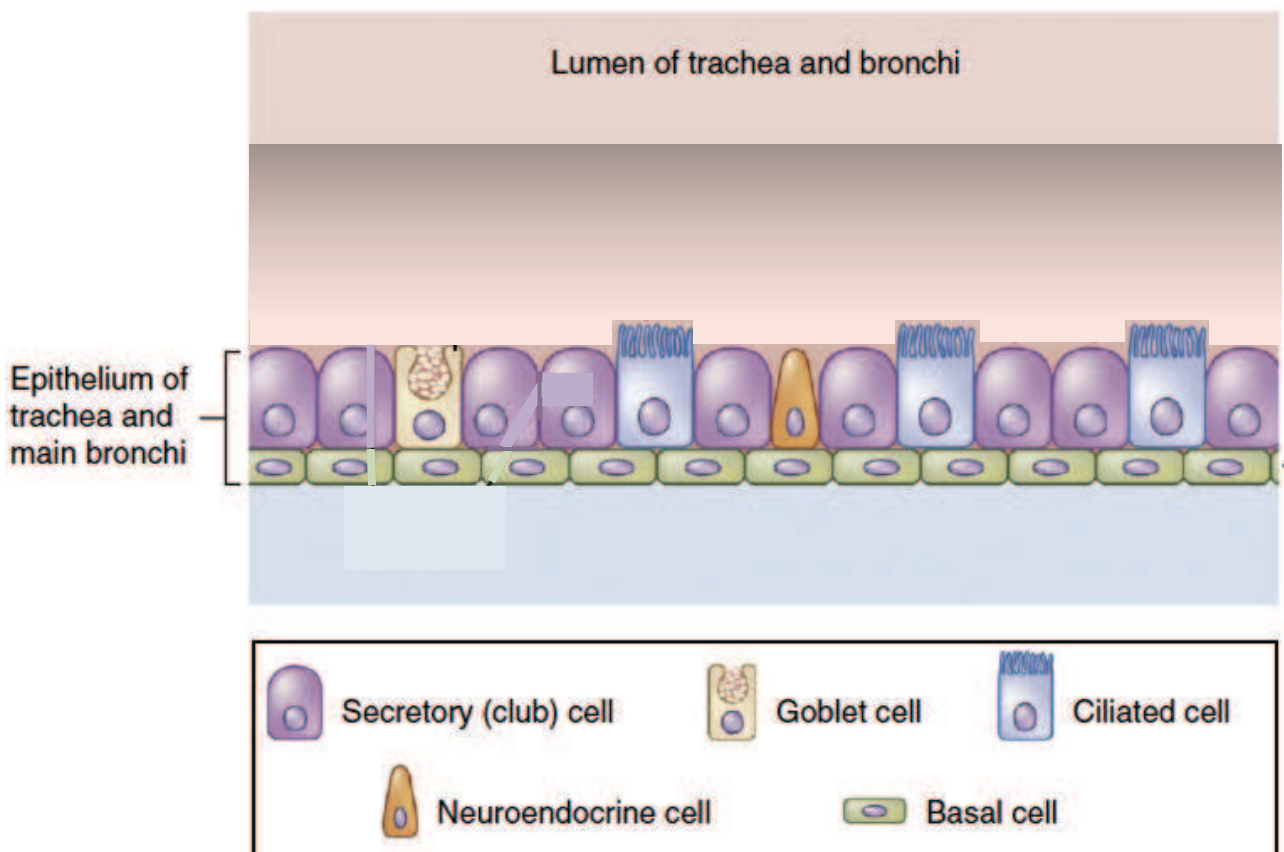


Figure 2 : Composition de l'épithélium trachéale et bronchique.

L'épithélium trachéal et bronchique est composé de cellules basales et de cellules ciliées non sécrétrices ; ainsi que de cellules sécrétrices qui sont les cellules caliciformes et les cellules Club. Enfin ces épithéliums comportent également des cellules neuroendocrines. (Figure modifiée à partir de ([Kotton and Morrissey, 2014](#)))

Au niveau des alvéoles pulmonaires on retrouve d'autres types cellulaires : les pneumocytes de type I d'une part qui sont de petites cellules plutôt aplaties qui constituent la paroi alvéolaire ; ils sont imperméables au liquide, perméables au gaz ; les pneumocytes de type II d'autre part qui sont des cellules cubiques, plus grosses que les pneumocytes de type I. Les pneumocytes de type II jouent un rôle important dans la maturation et la protection pulmonaire en sécrétant du surfactant qui a des propriétés tensioactives permettant d'éviter que les alvéoles ne se collapsent. Le surfactant est composé de phospholipides et de quatre protéines spécifiques ou protéines de surfactant (SP) A, SPB, SPC et SPD. Les pneumocytes de type II peuvent également présenter des antigènes et sécréter des cytokines. (**Figure 3**)

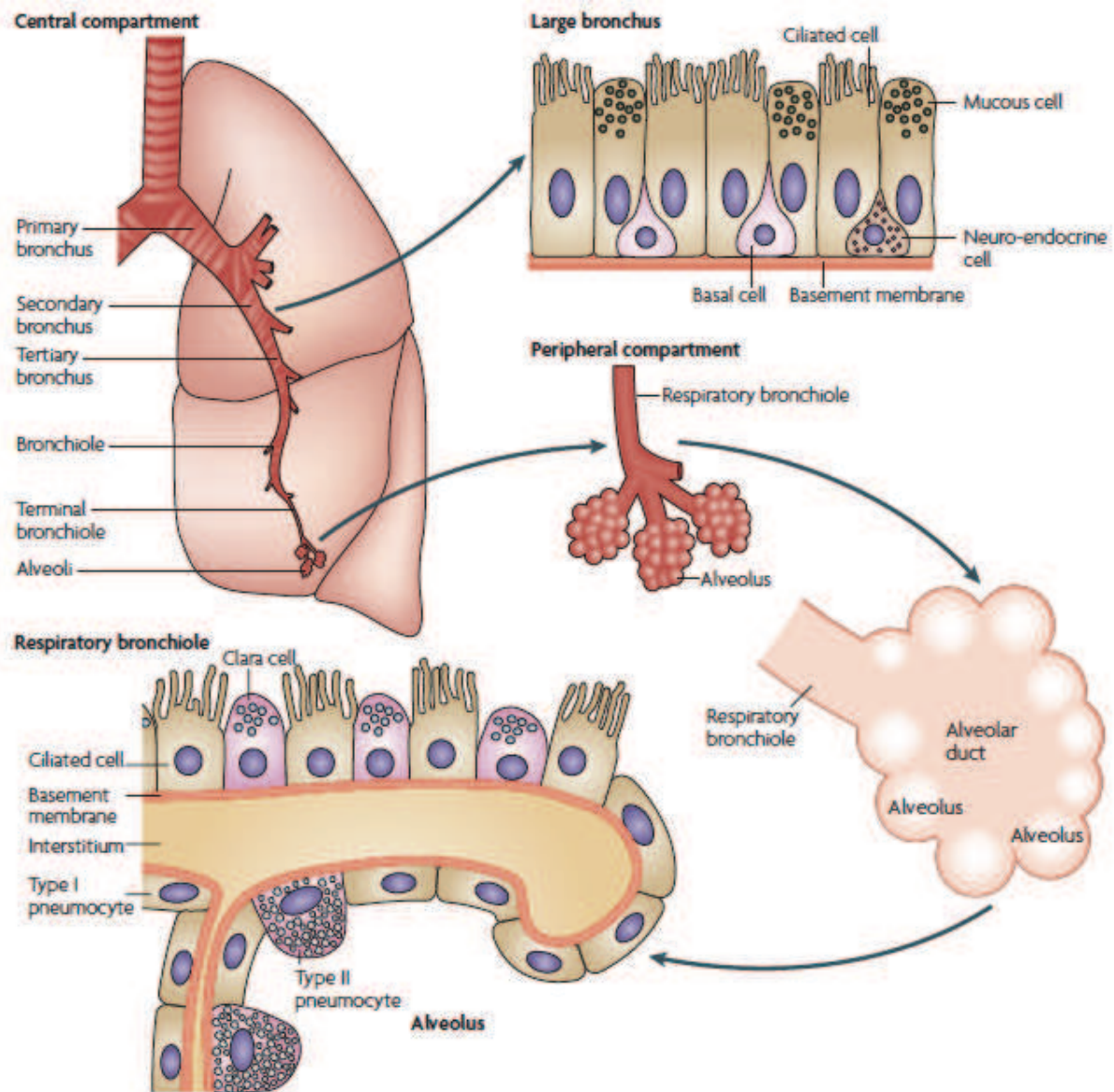


Figure 3 : Epithélium des alvéoles pulmonaires.

L'épithélium des alvéoles pulmonaire est composé de cellules Club, de cellules ciliées et de pneumocytes de type I et II ([Sun et al., 2007](#)).

1.1.3 Le poumon chez la souris

Chez la souris *Mus musculus*, le poumon est constitué également de 5 lobes, 4 lobes du côté droit et 1 unique lobe pour le côté gauche (**Figure 4**) ([Heusser and Dupuy, 2008](#)).

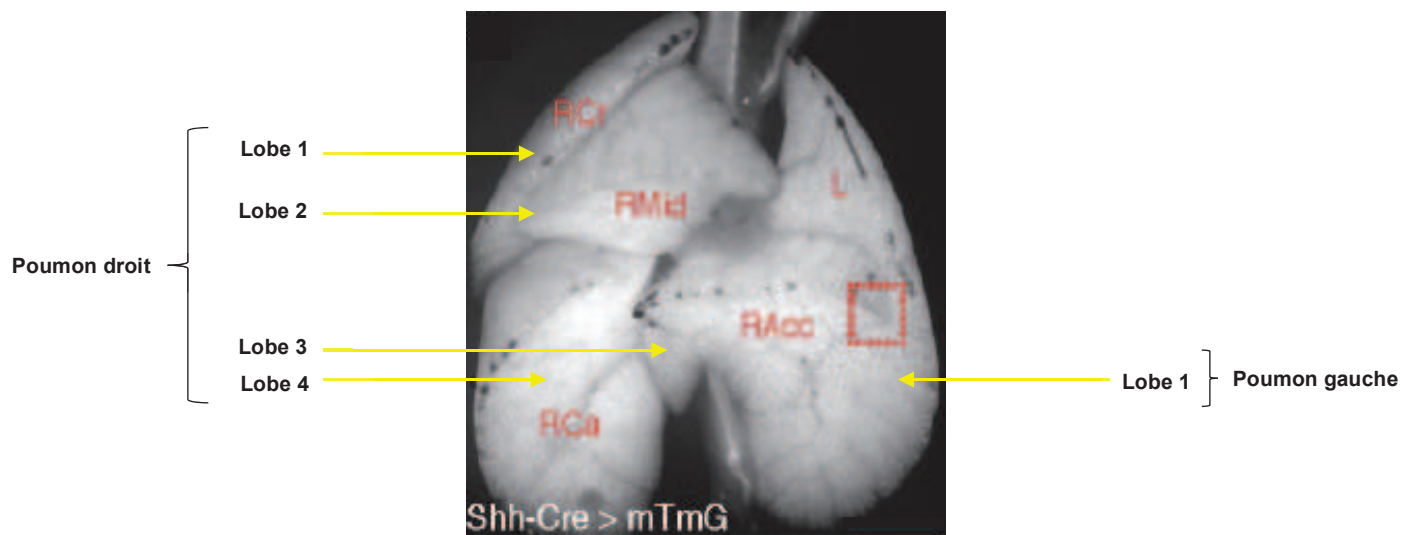


Figure 4 : Forme des poumons murins.

Poumon murin composé de quatre lobes au niveau du poumon droit et d'un seul et unique lobe au niveau du poumon gauche. Figure modifiée à partir de ([Desai et al., 2014](#))

La hiérarchie de l'arbre respiratoire est très similaire à celle de l'Homme avec une organisation en bronches, bronchioles puis alvéoles pulmonaires. Chez la souris, il y a également une similarité fonctionnelle de cet organe. De plus, l'épithélium pulmonaire murin se compose aussi des mêmes types cellulaires que ceux que l'on peut retrouver chez l'homme. C'est en partie pour cette raison que le modèle murin est très utilisé pour l'étude des maladies et inflammations pulmonaires.

1.2 Les maladies pulmonaires

1.2.1 Historique

En 2012, les affections des voies respiratoires représentaient à elles seules, 3,1 millions de décès dans le monde. Avec la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), elles représentent 6,2 millions de morts (**Figure 5**), soit tout autant que les morts causées par les accidents vasculaires cérébraux à travers le monde ([OMS, 2014](#)).

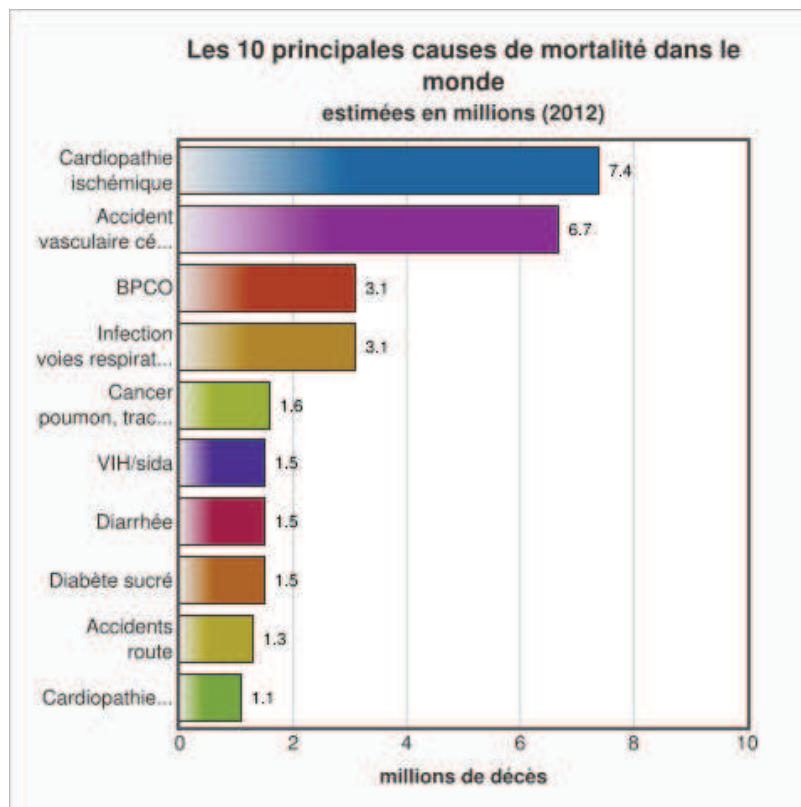


Figure 5 : Les 10 principales causes de mortalité dans le monde.

(OMS, 2014)

Différents types de maladies pulmonaires existent comme les infections pulmonaires induites par des agents pathogènes tels que les virus, les bactéries ou encore les champignons, mais d'autres maladies pulmonaires sont causées par des allergènes, des polluants ou agents toxiques, ou encore par des agents étiologiques inconnus. Dans ce dernier cas les maladies sont dites idiopathiques. De nos jours, lorsque nous consultons l'une des bases de données scientifiques « pubmed », le premier article sur les maladies pulmonaires fait état de constatations datant de 1874 ([Johnson, 1874](#)).

L'un des premiers faits constatés et publiés, était de voir que les habitants des montagnes souffraient de maladies inflammatoires qui touchaient pour beaucoup les poumons, telles que la bronchite, l'asthme, l'emphysème pulmonaire, la pneumonie, la pleuropneumonie ou encore la pleurésie ([Marcet, 1880](#)).

En 1881 « The British medical journal » publie un article proposant de soigner une affection pulmonaire par inhalation d'acide carbolique. L'idée apparaît donc, qu'une maladie pulmonaire peut être traitée par inhalation ; il faudra attendre 1946 pour la première proposition de traitement des maladies pulmonaires aiguës et chroniques par des antibiotiques avec des aérosols de pénicilline ([Fullerton and Shane, 1946](#)).

Les premières avancées dans le domaine de la pneumologie ont été faites grâce à l'identification des agents étiologiques comme par exemple *Streptococcus pneumoniae* ou encore *Mycobacterium tuberculosis*, en développant des outils tels que la microscopie. Cependant, beaucoup de ces maladies pulmonaires ne sont pas causées par un pathogène, d'où la difficulté de trouver des traitements adéquats encore aujourd'hui.

1.2.2 Les maladies pulmonaires infectieuses

1.2.2.1 La pneumonie

Cette pneumopathie était déjà présente dans l'antiquité gréco-romaine et dans le monde arabe ([Blasi et al., 2007](#)).

Comme son nom l'indique, elle se traduit par une infection pulmonaire qui entraîne les symptômes suivants : forte fièvre, toux sèche évoluant après quelques jours en toux grasse, douleur thoracique, douleurs musculaires, maux de tête et respiration sifflante ([CDC, 2015](#)).

Cette maladie est majoritairement causée par l'infection des poumons par *Streptococcus pneumoniae*, une bactérie Gram-positif. Elle peut être soignée grâce à la prise d'antibiotiques et peut également être prévenue par la vaccination ([Blasi et al., 2007](#)).

Cependant, cette pathologie reste un gros problème de santé publique qui touche essentiellement les enfants et les personnes âgées. En effet, dans les années 2000, environ 14,5 millions de cas sérieux de pneumonies ont été recensés conduisant à la mort dans les pays développés de 826000 enfants âgés de 1 à 59 mois ([WHO, 2011](#)).

1.2.2.2 La grippe

Autre infection pulmonaire transmise, cette fois par le virus *influenzae*, la grippe induit l'inflammation des voies respiratoires avec une atteinte des bronches, du pharynx et du larynx. Cette maladie pulmonaire représente un vrai problème de santé publique. En effet, chaque année les épidémies de grippe saisonnière touche entre 5 et 10% de la population adulte et 20 à 30% de la population infantile. Au niveau mondial, la grippe saisonnière représente 3 à 5 millions de cas sévères par an, causant entre 250000 et 500000 morts ([WHO, 2014](#)).

Un moyen de prévention existe : la vaccination. Chaque année, en prévention, des vaccins sont mis au point en fonction du sérotype viral qui va infecter le plus de personnes et suspecté de créer une épidémie de grippe saisonnière.

Cette méthode de vaccination reste aujourd'hui la méthode la plus sûre pour éviter la propagation du virus et éviter que l'épidémie annuelle ne se transforme en pandémie, comme lors de la grippe espagnole de 1918 ou encore la grippe porcine en 1976 ([WHO, 2014](#)).

1.2.2.3 Aspergillose

Contrairement à la pneumonie et à la grippe, l'aspergillose est une infection opportuniste causée par un champignon, *Aspergillus*. Ce champignon est détecté et neutralisé assez facilement par notre organisme. Cependant, il arrive que des patients soient atteints d'aspergillose quand ils sont immunodéprimés ou lorsqu'ils souffrent d'un dysfonctionnement mécanique au niveau du poumon. Le risque de développer une aspergillose augmente donc notamment après des épisodes infectieux tels que la tuberculose, la mucoviscidose, l'asthme ou encore l'infection du virus de l'immunodéficience humaine.

La pathologie se décline de deux manières : l'aspergillose pulmonaire invasive, qui survient en cas d'immunodépression sévère de l'individu et l'aspergillose pulmonaire chronique qui elle, touche des individus présentant un dysfonctionnement physiologique au niveau pulmonaire, tel qu'une altération du parenchyme pulmonaire.

Le traitement préconisé pour lutter contre ce type d'infection est un traitement antibiotique, ainsi qu'un traitement aux corticostéroïdes ([Pasteur, 2013](#)).

1.2.3 Les maladies pulmonaires inflammatoires

1.2.3.1 L'asthme allergique

C'est au début du 17^{ème} siècle que l'asthme est décrit par le grec Arétée de Cappadoce comme une crise d'étouffement, « une soif d'air inextinguible » avec une respiration soufflante, une toux fréquente et pénible qui induit une expectoration peu abondante. Il a aussi dès lors fait un parallèle entre ces crises d'étouffement et certains métiers tels que les ouvriers de la laine, les plâtriers et les travailleurs du bronze.

Arétée avait donc déjà soupçonné que l'inhalation de particules volatiles pouvait induire une irritation importante des voies respiratoires.

C'est Galien qui toujours au 17^{ème} siècle, met en exergue la nature nerveuse de la maladie, en la qualifiant « d'épilepsie du poumon ».

De nos jours, l'asthme est une affection respiratoire qui représente un vrai problème de santé publique. En effet selon l'OMS, 235 millions de personnes seraient atteintes d'asthme dans le monde. Cette maladie chronique se traduit par un rétrécissement des bronches induisant une difficulté respiratoire qui s'illustre par des spasmes ; l'apparition d'un œdème pulmonaire amplifie également la difficulté respiratoire ([WHO](#)).

La physiopathologie de cette maladie s'effectue en deux grandes phases. Une première phase d'immunisation qui fait appel au système immunitaire inné et qui est caractérisée par la reconnaissance de l'allergène par les cellules dendritiques, la différenciation des cellules T dans les ganglions en lymphocyte T auxiliaire de type 2 (Th2) et la production d'immunoglobuline (Ig) de type E (IgE) spécifiques qui vont aller se fixer sur les mastocytes et les activer ([Galli et al., 2008](#)).

Une seconde phase ou phase effectrice va se produire lors d'une nouvelle rencontre avec l'allergène et se caractérise par la production de cytokines pro-inflammatoires associées à la libération des IgE dans la circulation sanguine ainsi qu'au recrutement des leucocytes tels que les éosinophiles et des basophiles qui vont, entre autres, provoquer la libération de nombreux médiateurs tels que les histamines et les peroxidases ([Holgate, 2012](#)). Cette phase effectrice s'accompagne d'un remodelage bronchique avec un épaississement des bronches, d'un recrutement de cellules inflammatoires et d'une hypersécrétion de mucus.

Les enjeux thérapeutiques concernant cette maladie sont importants. En effet il existe aujourd'hui des traitements comme les antihistaminiques, les vasodilatateurs ou encore des anticorps monoclonaux humanisés, comme l'omaluzimab qui se fixe de manière sélective aux IgE humaines, inhibant leur action sur les mastocytes et la libération d'histamine, ainsi que la constriction des bronches. Cependant les réponses de type Th2 dans l'asthme ne sont mises en cause que pour une partie des individus asthmatiques : certains cas d'asthme seraient ainsi liés à d'autres mécanismes tels que les réponses nerveuses, renvoyant plus à la notion « d'épilepsie du poumon » évoquée auparavant ([Undem and Carr, 2002](#)). Tout l'enjeu reste donc de comprendre les différents mécanismes immunologiques et neurologiques mis en place lors de la pathologie pour trouver le traitement le plus efficace possible.

1.2.3.2 La fibrose pulmonaire

1.2.3.2.1 Généralités

La fibrose pulmonaire est une maladie incurable qui apparaît assez tardivement dans la vie d'une personne, suite à une agression des poumons par un agent toxique et ceci durant un certain nombre d'années. Elle est caractérisée par une réparation dérégulée des poumons associée à un déséquilibre entre des protéases qui dégradent la matrice extracellulaire (comme les métalloprotéinases) et les inhibiteurs de protéases, en faveur d'un excès d'inhibiteurs, conduisant à une accumulation de protéines de matrice comme le collagène. Cette réparation excessive se traduit donc par un important dépôt de collagène dans les poumons et une forte infiltration par les cellules pro inflammatoires, conduisant à une déstructuration des alvéoles pulmonaires et à l'insuffisance respiratoire sévère qui peut provoquer la mort du patient. Le seul moyen aujourd'hui pour éviter la mort certaine, c'est d'effectuer une transplantation pulmonaire. A ce jour on peut comptabiliser environ 200 types de substances qui sont connues pour initier une fibrose pulmonaire ([Karampitsakos et al.](#)). Sur 100 patients atteints de fibrose pulmonaire, 20 à 25 souffrent de fibroses pulmonaires idiopathiques (IPF) qui est la forme la plus grave de fibrose pulmonaire. L'IPF, dont l'origine est par définition inconnue, touche 5 millions de personnes dans le monde et en France, il y a 3000 à 5000 nouveaux cas d'IPF par an. Cependant, il s'avère que le tabagisme puisse être une des causes de l'IPF, les patients atteints d'IPF étant très souvent des fumeurs ou d'anciens fumeurs ([La Fondation du Souffle, 2014](#)).

Le diagnostic de cette pathologie est, la plupart du temps, établi très tardivement chez les patients et la durée moyenne de vie après le diagnostic s'étend de 3 à 5 ans.

Parmi les agents connus, responsables de la fibrose pulmonaire, les microparticules d'asbeste ou de silice provoquent respectivement l'asbestose et la silicose. Les nanotubes de carbone peuvent également induire une fibrose pulmonaire ([Vietti et al., 2015](#)). De même, la bléomycine,

antibiotique utilisé en traitement de certains cancers, peut être responsable de cas de fibroses pulmonaires chez les patients traités avec cette molécule.

Tout au long de ce manuscrit, nous allons nous intéresser plus particulièrement aux effets des nanoparticules de silice, de la fumée de cigarette et de la bléomycine au niveau des poumons.

1.2.3.2.2 Les agents responsables de la fibrose pulmonaire idiopathique

i Les nanoparticules

Les nanoparticules sont par définition des molécules inertes qui font entre 1 et 100nm.

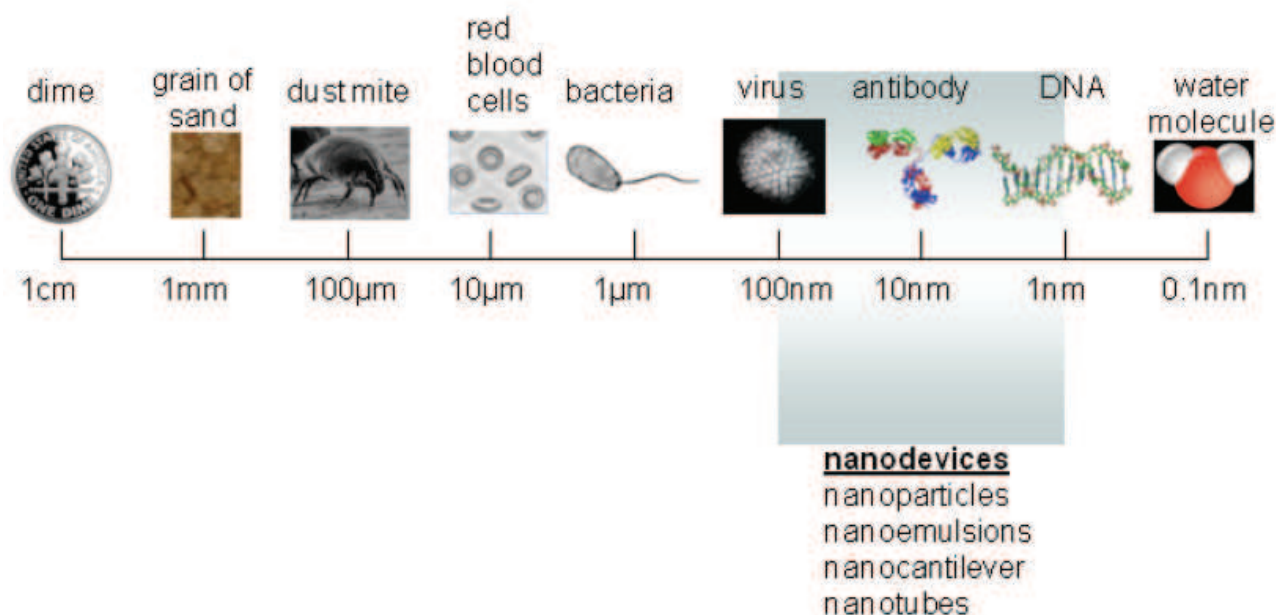


Figure 6 : Les frontières du nano-monde.

Répertoriées selon la taille, les nanostructures se situent entre l'acide désoxyribonucléique (ADN) et les virus et font entre 1 et 100 nm. Parmi elles, sont classées les nanoparticules, les nano-émulsions, les nano-films et les nanotubes ([Food and Agriculture Organisation, 2010](#)).

Ces particules ont pour spécificité de s'agréger très rapidement et d'avoir des propriétés magnétiques, optiques, biologiques très spécifiques. Les nanoparticules possèdent une réactivité bien plus importante que les microparticules ; cela s'explique par l'augmentation du ratio surface sur volume total (**Figure 7**).

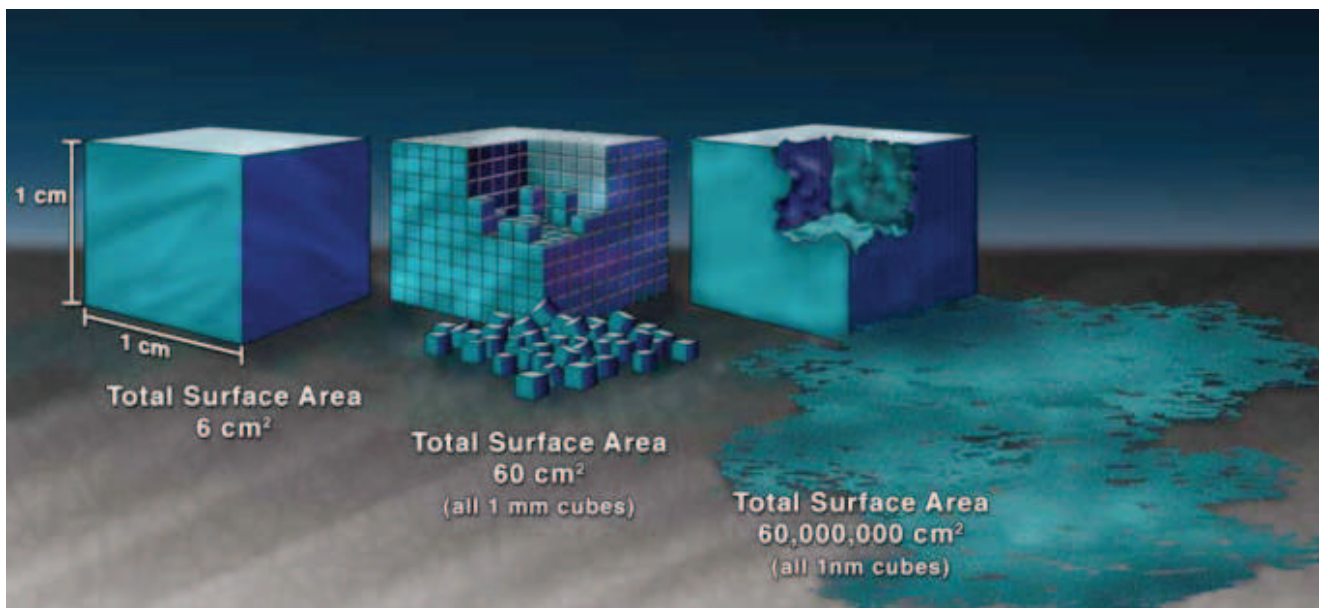


Figure 7 : Surface d'échange des nanoparticules.

Plus les nanoparticules sont petites, plus elles augmentent le ratio surface sur volume total, et donc augmentent considérablement leur surface d'échange ([Nantional Nanotechnology Initiative](#)).

Cette réactivité est donc *de facto* fonction du type de nanoparticule et de leur capacité d'agrégation ([Dan et al., 2014](#)).

Les nanoparticules se retrouvent partout dans notre environnement et dans nos produits du quotidien. Elles peuvent avoir pour source le milieu naturel qui nous entoure comme dans le panache de volcans en éruptions.

Mais elles peuvent aussi être manufacturées pour répondre à un besoin particulier ([Food and Agriculture Organisation and World Health Organisation, 2010](#)) :

- Dans l'industrie agro-alimentaire où elles entrent en jeu dans la fabrication de produits alimentaires tel que le cacao en poudre afin de faciliter sa dissolution.
- Dans le processus qui consiste à cacher le goût des exhausteurs dans les conserves et autres plat cuisinés.
- Dans le processus de purification de l'eau qui consiste à se servir des nanoparticules métalliques pour la traiter et l'assainir.
- Dans la cosmétique on s'en sert dans la fabrication de crèmes solaires ou de maquillage.
- Dans le bâtiment elles sont également utilisées dans la peinture ou encore lors de la confection de produits informatiques ou automobiles.

Tout ceci implique une exposition constante ainsi qu'une application quotidienne de ces particules sur la peau pouvant passer au travers des pores de la peau et l'appareil respiratoire.

La manufacture des nanoparticules répond également au besoin médical. En effet les nanoparticules peuvent être utilisées :

- En thérapie anticancéreuse dans le cadre d'un système de libération protégée, ou par exemple dans celui de la maladie de Parkinson où les nanoparticules sont utilisées pour restaurer un défaut d'acidification des lysosomes afin d'atténuer la mort neuronale *in vivo*, dans un modèle murin ([Bourdenx et al., 2016](#)).

- Dans l'industrie pharmaceutique comme adjuvant pour certains vaccins ou encore dans l'imagerie médicale ([Gregory et al., 2013](#)).
- Les nanoparticules peuvent également être le résultat de la combustion de soudures ou de moteurs de voitures diesel, libérées par le pot d'échappement et constituer ainsi des agents polluants que nous respirons tous les jours ([Lighty et al., 2000](#)).

Ainsi, le développement des nanotechnologies constitue un enjeu économique certain dans l'industrie agro-alimentaire et médicale. Etant donné que nous sommes d'ores et déjà soumis à une exposition quotidienne de ces nanoparticules, il devient primordial d'en comprendre les effets sur notre organisme et d'identifier les dégâts éventuels que pourraient causer ces particules pour pouvoir les utiliser à bon escient.

A ce jour, quelques avancées ont été faites en ce qui concerne le danger que peuvent constituer les nanoparticules. Comme dit précédemment, les nanoparticules sont beaucoup plus réactives que des particules plus grosses comme les microparticules, mais leurs effets sur notre organisme sont mal connus et donc de plus en plus étudiés.

Il est maintenant établi que les nanoparticules ont la capacité, une fois inhalées, d'entrer de façon passive directement dans les cellules, ou de façon active par endocytose classique ou celle induite via la voie des clathrines (dont clathrine/flotilline chez les macrophages), ou via la voie des caveolines (cellules épithéliales) ([Kuhn et al., 2014](#)).

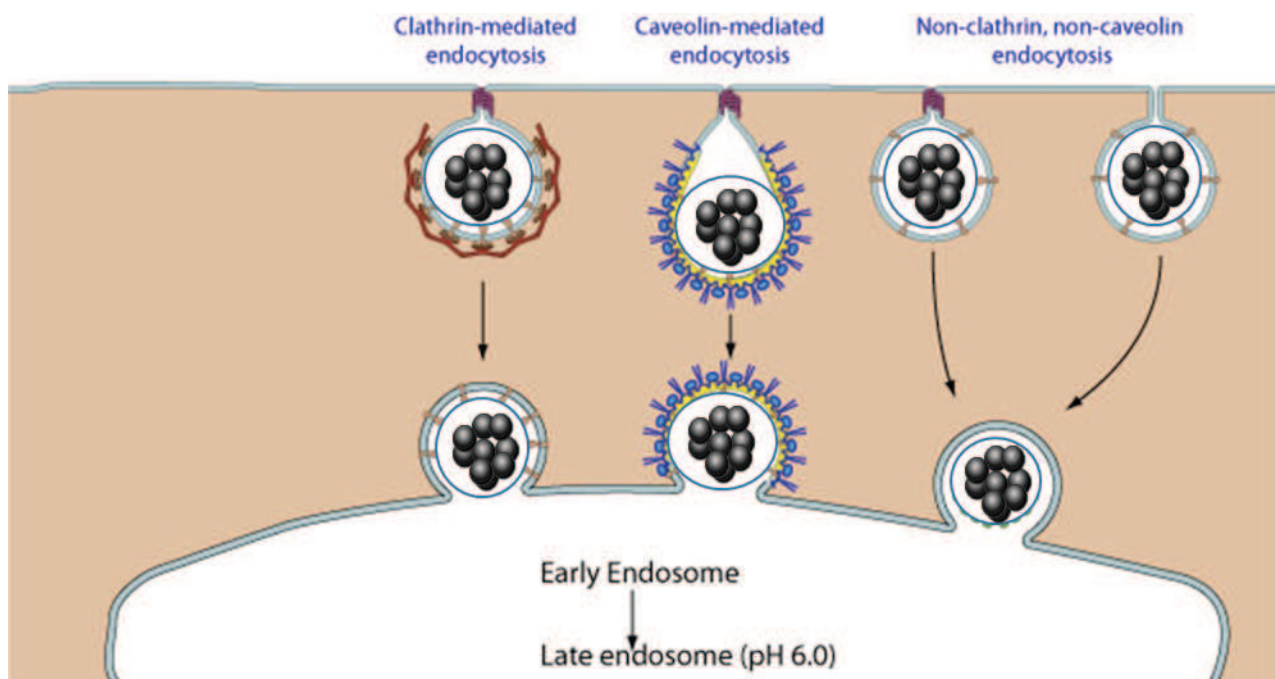


Figure 8 : Les trois principales voies d'endocytose des nanoparticules.

La voie des clathrines, de la calvéoline et la voie indépendante de la clathrine et de la caléoline. (figure modifiée à partir de : ([ExPASy and ViralZone](#)))

Ces particules induisent très rapidement une inflammation cellulaire induisant la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) par les kératinocytes ([Nabeshi et al., 2011](#)). Très vite elles induisent également une inflammation pulmonaire et sur le long terme pourraient induire une fibrose pulmonaire.

Les nanoparticules peuvent également entrer dans l'organisme par les pores de la peau, migrer via la circulation sanguine et se retrouver à différents endroits du corps et ce, plusieurs jours après administration. Elles sont retrouvées entre autres dans le cerveau, les reins ou encore le foie

([Zane et al., 2015](#)) ; où elles induisent notamment une cytotoxicité, favorisant la production de ROS, la nécrose cellulaire et l'autophagie. Cette cytotoxicité peut engendrer une fibrose hépatique.

La toxicité de ces particules pour l'organisme est toujours à l'étude ; ainsi de récentes investigations ont montré une toxicité cellulaire et par extension de l'organe. Cette toxicité des nanoparticules serait fonction de leur capacité d'agrégation, de leur taille, de leur stabilité mais aussi de leur porosité. De plus les nanoparticules existent sous plusieurs formes : cristalline ou amorphe et celles-ci ne présentent pas le même pouvoir toxique ; il est par exemple décrit que la forme cristalline de la silice induit une toxicité importante alors que celle de la forme amorphe est encore peu connue, mais semble également induire une certaine cytotoxicité ([Kim et al., 2015](#)). Lorsqu'elles sont manufacturées le rajout d'autres nano-groupements peut également influencer leur degré de toxicité ([Zhu et al., 2016](#)).

Au vu de l'enjeu économique, médical et technologique que représentent les nanoparticules, il est donc très important de pouvoir évaluer leurs effets sur l'organisme.

ii La bléomycine

Il s'agit d'un antibiotique produit par *Streptomyces verticillus* et qui été découvert en 1966 pour avoir des propriétés anticancéreuses. C'est en interagissant avec l'ADN, provoquant sa destruction et créant des radicaux libres, que la bléomycine agit de façon délétère. Elle est généralement utilisée en combinaison avec d'autres médicaments contre différents types de carcinomes tels que : les carcinomes épidermoïdes, lymphomes hodgkiniens et non hodgkiniens, et les carcinomes testiculaires. Le traitement peut s'effectuer par voie veineuse, sous cutanée ou intramusculaire ; la posologie est généralement située entre 10 à 20 mg/m² par jour. L'utilisation de la bléomycine dans le traitement contre le cancer est connue aujourd'hui pour avoir de potentiels effets secondaires chez certains patients, pouvant mettre leur vie en danger. En effet, la bléomycine peut entraîner une toxicité artérielle en induisant le syndrome de Raynaud, des lésions cutanéomuqueuses qui disparaissent dès l'arrêt du traitement, de l'hyperthermie généralement bien prise en charge, et de façon beaucoup plus grave, une fibrose pulmonaire. La fibrose pulmonaire s'établit en général pendant le traitement ou 6 mois plus tard suite à une accumulation de la bléomycine à une valeur seuil de 300mg. Jusqu'à 10% des patients traités avec cet antibiotique développent une fibrose pulmonaire([Agence National de sécurité du médicament, 2013](#)). Il peut également arriver que cette fibrose pulmonaire puisse aussi évoluer en sclérodémie systémique. Il est donc essentiel de comprendre pourquoi ces patients développent une fibrose pulmonaire et quels sont les mécanismes immunologiques qui sont mis en jeu.

1.2.3.2.3 La physiopathologie de la fibrose pulmonaire idiopathique

i La phase d'inflammation aiguë

La fibrose pulmonaire idiopathique débute par une phase inflammatoire aiguë. En effet, la bléomycine tout comme les nanoparticules vont pénétrer dans notre organisme et respectivement provoquer la destruction de nos cellules ou entrer dans les cellules comme les macrophages. Cette mort cellulaire induite par la bléomycine ou l'entrée des nanoparticules va notamment induire des lésions au niveau de l'épithélium pulmonaire et entraîner la libération de signaux de dangers dans la matrice extracellulaire causant ainsi l'inflammation aiguë.

Il a aussi été montré que dans le cas de la fibrose pulmonaire, lors de la phase aiguë, des signaux de dangers comme l'adénosine triphosphate (ATP), reconnus par le système immunitaire, induisent le recrutement de cellules pro-inflammatoires comme les macrophages et les neutrophiles dans les poumons et la sécrétion de chimiokines attractantes des neutrophiles comme la « keratinocyte chemoattractant »(KC), et de cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine 33 (IL-33) et l'interleukine 1 β (IL-1 β). On note également l'activation de facteurs de transcriptions comme le « nuclear factor kappa bêta » (NF- κ B) pouvant activer les gènes proinflammatoires. Ce processus se traduit aussi par le dérèglement de la balance métallo protéases (MMP) et inhibiteurs de métallo protéases (TIMP) qui influe sur le remodelage pulmonaire. L'ATP va induire l'activation de récepteurs « NOD-like » et plus particulièrement de l'inflammasome « NLR family pyrin domain containing-3 » (NLRP3), lequel va par l'intermédiaire de la caspase 1, transformer l'IL-1 β immature en l'IL-1 β mature et actif ([Riteau et al., 2010a](#)).

ii La phase d'inflammation chronique

Cette phase chronique est celle qui correspond à la fibrose pulmonaire à proprement parlé. Au cours de cette phase, les lésions induites lors de la phase aiguë et le dérèglement de la balance des facteurs de remodelage tissulaire entraînent la réparation excessive du tissu pulmonaire. Cette phase est aussi caractérisée par le recrutement de cellules pro inflammatoires comme les neutrophiles et les macrophages. On peut noter également un recrutement de lymphocytes qui atteste de l'établissement d'une réponse adaptative.

Suite à la phase aiguë, lors de la phase chronique, la sécrétion de cytokines (IL-1 β , l'IL-33) et de chimiokines pro inflammatoires (KC, « Thymic Stromal Lympho Protein » TSLP) est aussi observée. D'un point de vue histologique, on peut non seulement constater l'infiltration cellulaire mais aussi l'épaississement des bronches avec un dépôt de collagène participant à la perte de la fonction respiratoire.

1.2.3.3 La broncho pneumopathie obstructive chronique (BPCO)

La broncho pneumopathie obstructive chronique est une pathologie pulmonaire qui se traduit par le développement d'une inflammation chronique, de la production de mucus et d'un remodelage tissulaire au niveau des bronches, tout cela conduisant à l'obstruction de celles-ci. L'inflammation chronique aboutit dans certains cas à l'emphysème pulmonaire, à savoir une dégradation anormale du tissu pulmonaire engendré par le déséquilibre de la balance métallo protéases (MMP) et inhibiteur des métallo-protéases (TIMP). Histologiquement les parois des alvéoles sont détruites, suite à la digestion par les protéases produites par les cellules inflammatoires. Un élargissement des voies respiratoires est alors observé, correspondant à la fusion de plusieurs alvéoles en une grosse alvéole du fait de la destruction des parois alvéolaires. Tout cela se traduit par une diminution de la capacité à effectuer les échanges gazeux et donc une diminution de la capacité respiratoire qui évolue jusqu'à la mort du patient. Selon l'OMS, 64 millions de personnes souffrent de BPCO modérée à sévère. En 2005, il y a eu 3 millions de décès lié à cette maladie, ce qui représente 5% de l'ensemble des décès survenus cette année-là. En 2030 la BPCO pourrait être la 3^{ème} cause de mortalité dans le monde ([Organisation mondiale de la santé](#)).

1.2.3.3.1 Les agents responsables de la BPCO

Plusieurs facteurs peuvent être impliqués dans la mise en place de la BPCO :

- La génétique comme une déficience au niveau du gène de l'alpha 1-antitrypsine (α_1 -AT) ([Silverman and Sandhaus 2009](#))
- La poussière qui contient des particules irritantes pour les poumons
- Les produits chimiques qui constituent des agents agressifs pour les poumons et qui peuvent être générés par la pollution comme le noir de carbone
- Et enfin le tabagisme

De tous ces agents étiologiques, la fumée de cigarette demeure, parmi tous les autres, le principal facteur de risque. Le tabagisme représente ainsi à lui seul la cause de 90% des cas de BPCO dans les pays de l'Ouest ([Caramori et al., 2016](#)).

1.2.3.3.2 La physiopathologie de la BPCO

Il existe 4 stades de BPCO selon la classification de GOLD (« Global initiative for chronic Obstructive Lung Disease »), établie en 2004. Cette classification s'établit par mesure spirométrique, qui fait référence au rapport de Tiffenau, représentant le rapport entre le Volume Maximum Expiré en 1sec (VEMS) et la Capacité Vitale (CV).

Ainsi, les patients à risque sont ceux qui ont des symptômes chroniques comme la toux et l'expectoration et dont le rapport de Tiffenau est inférieur ou égal à 70%.

- Le stade 1 est la BPCO débutante ; le rapport de Tiffenau est inférieur à 70% avec une VEMS supérieure ou égale à 80% de la valeur prédite.
- Le stade 2 correspond à une BPCO modérée ; le rapport de Tiffenau est également inférieur à 70% et la VEMS est comprise entre 50 et 80% de la valeur prédite.
- Le stade 3 est le stade de BPCO sévère ; le rapport de Tiffenau reste inférieur à 70% mais la VEMS est comprise entre 30 et 50% de la valeur prédite.
- Enfin le stade 4 est le stade de BPCO très sévère ; le rapport de Tiffenau reste inférieur à 70% mais la VEMS est inférieure à 30% de la valeur prédite ; cela peut aussi s'accompagner d'insuffisance respiratoire chronique (pression partielle d'oxygène inférieure à 60mm de mercure) ou de signes cliniques d'insuffisance cardiaque droite ([Global initiative for chronic obstructive lung disease, 2016](#)).

Classification of Severity of Airflow Limitation in COPD (Based on Post-Bronchodilator FEV₁)		
In patients with FEV ₁ /FVC < 0.70:		
GOLD 1:	Mild	FEV ₁ ≥ 80% predicted
GOLD 2:	Moderate	50% ≤ FEV ₁ < 80% predicted
GOLD 3:	Severe	30% ≤ FEV ₁ < 50% predicted
GOLD 4:	Very Severe	FEV ₁ < 30% predicted

Figure 9 : Classification de GOLD (global initiative for chronic obstructive lung disease).

La sévérité de la BPCO est classée en quatre catégories selon le rapport de Tiffenau (ici FEV₁/FVC) et de la VEMS (ici FEV₁). ([Global initiative for chronic obstructive lung disease, 2016](#))

i La phase de remodelage pulmonaire

Cette phase correspond au stade aigu de l'inflammation d'un point de vue immunitaire. A ce stade, les substances toxiques émises par la fumée de cigarette sont détectées par notre organisme, déclenchant une infiltration de cellules pro-inflammatoires comme les macrophages et les neutrophiles. Ces cellules inflammatoires vont produire des cytokines pro-inflammatoires et des protéases qui vont digérer le tissu pulmonaire, permettant une meilleure migration des cellules et provoquant la destruction du tissu pulmonaire. Par exemple l'élastase des neutrophiles, la MMP9, la cathepsine G et la protéinase 3 sont produites par les neutrophiles alors que la MMP12 est produite par les macrophages. A ce jour, peu de choses sont connues dans la littérature sur les différents mécanismes impliqués dans cette phase.

ii La phase emphysemateuse

Cette phase correspond à la phase chronique de la maladie. Elle se traduit, en plus de tout ce qui est observé dans la phase précédente, par une destruction du parenchyme pulmonaire avec une hyper sécrétion de mucus et une infiltration de lymphocytes, ce qui montre le rôle prépondérant joué par le système immunitaire adaptatif lors de cette phase.

Il est reconnu que le stress oxydatif induit par la fumée de cigarette induit la sécrétion de cytokines qui jouent un rôle important : Par exemple l'IL-12 qui, en se fixant sur son récepteur IL-12R à la

surface des lymphocytes Th0, polarise la réponse immune vers une réponse de type Th1 avec l'activation du récepteur des cellules T (TCR) des lymphocytes et de l'IL-18R ([Lucas et al., 2003](#)).

L'IL-27 cytokine membre de la famille de l'IL-12, active également l'expression de l'interféron- γ . En plus de l'action des cytokines, l'activation des cellules de type Th1 est régulée par des chimiokines de la famille C-C et C-X-C comme CCL5, CXCL9, CXCL10 et CXCL11 ([Caramori et al., 2016](#)).

Augmenté chez les patients emphysémateux, le « B cell-activating factor » (BAFF) est un facteur faisant partie de la grande famille du « Tumor Necrosis Factor » (TNF) ([Faner et al., 2016](#)) et est lui aussi responsable du développement de la réponse inflammatoire vers une réponse de type Th1, ceci en promouvant la maturation et la survie des cellules B ([Seys et al., 2015](#)).

Cette phase de polarisation cellulaire est aussi traduite par la diminution des cellules T régulatrices (Treg) chez les patients atteints de BPCO. Cependant, cette diminution tout comme celle des cellules dendritiques dans les poumons, restent toujours controversée.

Dans un article paru en janvier 2014, Di Stefano montre l'implication de l'inflammasome NLRP7, mais pas de NLRP3, dans la sévérité de la maladie de patients atteints de BPCO sans exacerbation ([Di Stefano et al., 2014b](#)).

Il a été montré que l'auto-immunité pourrait être impliquée dans la pathologie. En effet, les taux d'IgG1 sériques sont inversement proportionnels à la sévérité de la BPCO. Les molécules du complément sont également mesurées dans le sérum des patients afin de vérifier ce paramètre d'auto-immunité ([Bhat et al., 2015](#)) ; ([Cosio et al., 2009](#)) ; ([Kirkham et al., 2011](#)).

L'hypersécrétion de mucus est décrite dans la littérature comme étant la résultante entre autre de l'activation de la voie NF κ B et de l'augmentation de la sécrétion de mucine 5AB (MUC5AB) et de mucine 5AC (MUC5AC), ainsi que l'augmentation de l'expression de MUC5AC au niveau de l'épithélium bronchique au niveau pulmonaire ([Hovenberg et al., 1996](#)), ([Kirkham et al., 2002](#)), ([Caramori et al., 2009](#)).

Certains articles mettent en cause la participation du système neuroendocrinien dans l'établissement de la maladie. En effet des neuromédiateurs, neurotransmetteurs et autres neuropeptides sont sécrétés dans le cadre d'une BPCO par les cellules immunitaires. Il a par exemple été montré *in vitro* que l'acétylcholine pouvait induire une différenciation des cellules en Th17 ([Di Comite et al., 2007](#)), ([Profita et al., 2014](#)).

Chez les patients atteints de BPCO, une dérégulation des neuropeptides présents dans les poumons pourrait également être impliquée dans le développement de la pathologie. Cette question reste encore à explorer.

Il est également démontré que la fumée de cigarette induit la production de ROS, reconnues comme un signal de danger par notre organisme : ainsi, le stress oxydatif va induire des cassures d'ADN qui peuvent favoriser l'établissement de la maladie. Autre exemple, il a récemment démontré que l'expression de la NADPH oxydase (NOX)-4 est augmentée au niveau des muscles lisses des voies aériennes. Cette enzyme régule alors la production de ROS chez les patients atteints de BPCO ([Hollins et al., 2016](#)).

La BPCO est une maladie qui peut également être caractérisée par des phases d'exacerbation. Cette exacerbation de la maladie peut être induite par différentes choses comme une surinfection bactérienne ou virale. Cet état est corrélé avec une importante neutrophilie et éosinophilie au niveau pulmonaire. Lors de cette phase de surinfection, il a pu être établi que l'inflammasome NLRP3 était activé et jouait un rôle prépondérant dans l'inflammation en aidant à la maturation de l'IL-1 β .

iii Les traitements de la BPCO

Plusieurs traitements ont été envisagés pour cette maladie. Malheureusement, parmi les solutions essayées, les anti-inflammatoires comme les glucocorticoïdes (budesonide et

fluticasone), aggravent la pathologie en favorisant la surinfection bactérienne ([Kew and Seniukovich, 2014](#)).

Il n'existe toujours pas de traitement efficace contre cette maladie, seuls les symptômes peuvent être pris en compte afin de soulager les patients.

L'enjeu thérapeutique de cette maladie reste entier. Il demeure très important de pouvoir comprendre quels sont les mécanismes mis en jeu dans les différentes phases afin d'identifier des cibles thérapeutiques intermédiaires pour diminuer la réponse inflammatoire et la digestion excessive du parenchyme pulmonaire, et ainsi peut-être établir un traitement curatif pour les patients.

1.3 Les modèles expérimentaux utilisés

1.3.1 Le modèle nanoparticule

Il s'agit ici d'un modèle murin d'instillation de nanoparticules de silice. Cette procédure nous permet de modéliser dès 24h une inflammation pulmonaire qui serait induite chez l'homme après inhalation de ces particules. Ces nanoparticules sont également utilisables *in vitro* sur des cellules en tant que stimulus.

Ce modèle est celui qui est utilisé pour l'étude des nanoparticules et notamment de leurs atteintes au niveau pulmonaire.

Il est reconnu depuis 1997 que la forme cristalline des nanoparticules de silice est toxique et cancérogène ([World Health Organisation, 1997](#)). Ainsi nous utilisons donc une forme amorphe des nanoparticules de silice. Cependant leur toxicité et leurs effets sur la santé humaine reste encore à explorer.

Nous nous sommes donc demandé si, de par leurs propriétés physicochimiques, les nanoparticules de silices seraient plus réactives et plus dangereuses pour la santé que les microparticules.

1.3.2 Le modèle bléomycine

Ce modèle est utilisé chez la souris pour l'étude de la fibrose pulmonaire en induisant une inflammation pulmonaire 24h après l'instillation ou encore une fibrose pulmonaire, 14 jours après l'instillation. Nous utilisons ce modèle car nous étudions la fibrose pulmonaire au travers des effets néfastes que peut avoir la bléomycine sur les poumons et nous disséquons les mécanismes mis en cause.

1.3.3 Le modèle de fumée de cigarette

Nous avons établi un modèle aigu d'exposition de souris à la fumée de cigarette pour étudier le stade précoce de la BPCO. Ce modèle correspond à 3 expositions de 4 cigarettes par jour pendant 4 jours donc à 12 cigarettes par jour et 48 cigarettes au total. Les souris sont euthanasiées le 5^{ème} jour. A ce stade, nous observons l'inflammation pulmonaire et le début de remodelage bronchique. Dans l'optique d'étudier la BPCO, il faudrait de plus longues expositions pour atteindre le stade de l'emphysème pulmonaire.

1.4 Le système immunitaire

Le système immunitaire est une importante machinerie de détection et de défense qui est mise en place pour protéger le corps contre les attaques de pathogènes mais aussi pour réponse aux signaux de dangers que peuvent produire du matériel étranger ou des dommages aux tissus. Lors d'une attaque de l'organisme, deux grandes étapes caractérisent la réponse du système immunitaire : tout d'abord la phase de détection, qui induit une réaction rapide de l'organisme. Cette étape met en jeu ce que l'on appelle le système immunitaire inné. Ce dernier possède toute une cohorte de cellules, de peptides de défenses et d'enzymes qui servent à déclencher une réponse rapide face à l'agression et ainsi par exemple à se débarrasser de l'intrus ou à réguler l'homéostasie tissulaire.

Si le système immunitaire inné est insuffisant, une seconde phase beaucoup plus longue se met en place, faisant intervenir le système immunitaire adaptatif. C'est notamment lors de cette phase que l'organisme va garder en mémoire l'attaque qu'il vient de subir, afin que la réponse effectrice se fasse plus rapidement en cas de nouvelle attaque identique. C'est aussi durant cette phase que peut s'établir une réponse chronique, lorsqu'elle ne permet pas le rétablissement d'une situation saine.

1.4.1 Le système immunitaire inné

1.4.1.1 La notion de danger

Le système immunitaire est le système de surveillance et de protection du corps humain. Il est capable de détecter les agents pathogènes ou molécules qui représentent un danger pour notre corps et de s'en débarrasser. Il est donc en mesure de détecter le « Soi » du « Non Soi ».

Cette notion développée par Burnet en 1969 suggère que notre organisme ne réagit naturellement pas contre lui-même. Deux grands principes ressortent de cette théorie ; le premier est que l'organisme déclenche une réponse immunitaire de rejet contre toute entité étrangère à lui-même : « le Non Soi ». Par opposition, le deuxième principe est que le système immunitaire ne déclenche pas de réponse de rejet contre ses propres constituants : « le Soi ».

Les principes véhiculés par la notion du Soi ont été modifiés en 1994 par Polly Matzinger et sa théorie du danger. Cette notion met l'accent sur le fait que le corps peut également prendre comme signaux de dangers des molécules du Soi. Plus précisément, le corps peut réagir face à l'émission de signaux de dangers émis par des cellules endommagées du Soi.

En effet en suivant *stricto sensu* la notion du Soi et du Non Soi, il devient difficile d'expliquer non seulement la réaction immunologique du corps face aux cancers ou aux maladies auto-immunes, mais également l'absence de réaction face aux pathogènes commensaux.

Après ce descriptif, une autre notion importante de l'immunologie apparaît, celle de la tolérance immunitaire. Il s'agit d'un état de non réponse face à des molécules ou agents pathogènes qui déclenchent naturellement une réaction immunologique. Les bactéries commensales sont l'illustration même de ce phénomène de tolérance immunologique.

1.4.1.2 Les cellules immunitaires et peptides de défense

Pour arriver à se défendre contre le Non Soi et autres signaux de dangers, l'organisme possède un certains nombres de mécanismes de défenses dont des cellules immunitaires spécialisées qui entrent en action dès le début de l'intrusion ou de la détection du signal de danger.

Avant cette étape de reconnaissance il faut déjà que le pathogène puisse passer au travers de structures très protectrices qui constituent nos premières bases de défense, à savoir les épithéliums.

Les épithéliums, il en existe pléthore, et tous constituent une première barrière de protection et de défense (la peau, les muqueuses de la paroi intestinale ou encore de l'épithélium pulmonaire). Les épithéliums ont la particularité d'être composés de cellules accolées les unes aux autres, liées entre elles par un système de jonction serrées et reposant sur une lame basale.

Lors de la détection de molécules associées aux pathogènes (PAMP) ou signaux de dangers (DAMP), par des récepteurs membranaires tels que les récepteurs des lectines, les récepteurs du complément, les « Toll Like Receptor » (TLR), aussi bien que par des récepteurs cytoplasmiques comme les « Nod Like Receptor » (NLR), « RIG-like helicase Receptor » (RLR), « Stimulator of Interferon Genes » (STING) et d'autres. Les cellules, qu'elles soient d'origine stromale ou hématopoïétique vont pouvoir sécréter notamment des cytokines des chimiokines, des lipides appartenant à la famille des eicosanoïdes, de l'oxyde nitrique et des ROS. La mise en place de l'immunité innée fait également intervenir d'autres systèmes de défense incluant notamment l'activation du système du complément. Tout cela va entraîner un recrutement de cellules pro inflammatoires, c'est le début de l'inflammation.

Parmi les cellules de l'immunité innée, on retrouve les phagocytes (monocytes, macrophages, les neutrophiles et cellules dendritiques) qui sont capables de capturer les agents pathogènes, les antigènes et les débris cellulaires à l'intérieur d'un phagosome. Le phagosome va ensuite fusionner avec un lysosome et donner naissance au phagolysosome qui va détruire ce qui a été phagocyté. On identifie également les granulocytes qui se composent des neutrophiles, des éosinophiles, des basophiles et des mastocytes, mais aussi des « inate lymphoïde cells » (ILC). Les ILC sont une lignée cellulaire qui dérive de la lignée des cellules T et qui jouent un rôle très important dans l'homéostasie tissulaire et la réponse immunitaire innée envers un pathogène ou alors dans le cadre de maladies non infectieuses. Présents au sein de différents organes comme les intestins, deux membres de cette famille sont exprimés dans les poumons : les ILC2 et les ILC3. En effet les ILC2 possèdent entre autre le récepteur à l'interleukine 33. Cette cytokine va alors permettre l'expansion des ILC2 et promouvoir l'inflammation.

Enfin on compte également parmi les cellules de l'immunité innée, les cellules stromales : en particulier les cellules endothéliales et épithéliales qui vont aussi participer à la réponse innée, notamment en libérant des substances actives telles que les défensines, les cytokines et les chimiokines.

1.4.1.2.1 Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques ont été découvertes en 1868 par Langerhans. Elles font parties de la famille des phagocytes. Elles se retrouvent aussi bien dans les tissus lymphoïdes que non lymphoïdes, dans le sang, la peau et les muqueuses. Au niveau de l'épiderme, les cellules dendritiques sont également connues sous le nom de cellules de Langerhans.

Les cellules dendritiques sont également qualifiées de cellules présentatrices d'antigène : elles vont non seulement reconnaître les antigènes, mais aussi les présenter aux cellules T via le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Il existe deux formes différentes de CMH, le CMH de classe I et celui de classe II ([Kenneth Murphy, 8th edition](#)).

Le CMH I permet de présenter les antigènes d'origines cytosoliques c'est-à-dire intra cellulaires aux lymphocytes T via le récepteur du cluster de différenciation 8 (CD8).

Le CMH II quant à lui permet de présenter les antigènes issus d'une endocytose (mécanisme d'internalisation cellulaire), aux lymphocytes T présentant le récepteur CD4.

La migration des cellules dendritiques vers les ganglions médiastinaux, active les cellules T et induit la production de cytokines, et de la mise en place de la mémoire immunitaire ; ils peuvent ainsi diriger la pathologie vers un stade chronique.

Les cellules dendritiques sont donc vraiment à l'interface entre le système immunitaire inné et le système immunitaire adaptatif.

Les cellules dendritiques présentent plusieurs stades de développement : un stade immature en tant que précurseur et un stade mature. Elles possèdent deux types de précurseurs, des précurseurs myéloïdes ou encore monocytaires, et les précurseurs lymphoïdes. Ces deux types de précurseurs donnent respectivement naissance aux cellules dendritiques myéloïdes (mDC) anciennement appelées CD1, et les cellules dendritiques plasmacytoïdes anciennement appelées CD2, nouvellement appelées pDC.

Les cellules dendritiques myéloïdes immatures se trouvent dans les tissus périphériques avant de migrer une fois activées, vers les ganglions lymphatiques par chimiotactisme grâce au gradient de chimiokines comme CCL21 qui induisent un « homing », pour présenter l'antigène aux cellules T et permettre leur expansion ainsi que la production de cytokines.

Les cellules dendritiques expriment aussi bien le CMHI que le CMHII et peuvent donc, en fonction du mode de présentation, diriger la réponse immune vers une réponse de type CD8 (cytotoxique) ou CD4 (auxiliaire).

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes se trouvent dans les ganglions, le sang, la moelle osseuse et le thymus. Elles expriment le CMH II et vont migrer vers les organes lymphoïdes

secondaires pour présenter l'antigène aux cellules T via le CD4 et permettre ainsi la production de cytokines immunosuppressives et anti-inflammatoires comme l'IL-10.

C'est en migrant vers le lieu de l'infection et en produisant de l'interféron- α (IFN- α) en réponse à une infection virale, que les pDC permettent également la survie des cellules dendritiques myéloïdes.

Tandis que les premières orientent plus la réponse immunitaire vers une réponse favorisant le développement de cellules T de type Th1, les secondes l'orientent plutôt vers une différenciation de cellules T en cellules de type Th2 ([Liu et al., 2001](#)).

Les cellules dendritiques sont des cellules très importantes de l'inflammation pulmonaire. Certaines cytokines (IL-25, IL-33 et TSLP) et autres signaux de dangers libérés par les cellules épithéliales (l'adénosine triphosphate (ATP) et l'acide urique) conditionnent particulièrement l'activation et la fonction des cellules dendritiques ([Lambrecht and Hammad, 2014](#)), ([Idzko et al., 2007](#)), ([Kool et al., 2011](#)). Dans le contexte des cellules tumorales, il a aussi été montré que les mucines, plus particulièrement MUC5AC, pouvait induire la maturation des cellules dendritiques. Cependant ce mécanisme de maturation reste encore peu connu.

Dans le cadre des maladies pulmonaires allergiques, les cellules dendritiques peuvent orienter la réponse immunitaire soit vers un type Th2, soit vers un type Th17.

Ainsi, en interagissant avec les ILC3, les cellules dendritiques induisent une réponse de type Th17, et donc une pathologie de type neutrophilique. En revanche, une interaction des cellules dendritiques avec les ILC2, conduit plutôt à une réponse de type Th2 ; la pathologie est alors caractérisée par une infiltration éosinophilique.

Les cellules dendritiques peuvent aussi produire des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-12, le TNF et l'IL-6, ce qui va accroître l'état inflammatoire du tissu et donc aggraver la pathologie ([Cook and MacDonald, 2016](#)).

Les cellules dendritiques semblent aussi impliquées dans la BPCO, mais leur rôle exact est encore très controversé.

Les chercheurs ont pu montrer que :

- Le recrutement des cellules dendritiques au sein du tissu pulmonaire pouvait augmenter suite à l'exposition à la fumée de cigarette, et être positivement corrélé avec la sévérité de la maladie ([Lommatzsch et al., 2010](#)).
- La maturation des cellules dendritiques d'origine myéloïde se retrouve diminuée après exposition à la fumée de cigarette ([Arellano-Orden et al., 2016](#)).
- Le nombre de cellules de Langerhans est également diminué chez les fumeurs atteints de BPCO.
- Un taux plus faible de cellules dendritiques dans les alvéoles des patients atteint de BPCO a pu être constaté.
- La baisse de l'expression du « C-C chemokine receptor type 5 » (CCR5) sur les cellules dendritiques myéloïdes chez les patients atteints de BPCO, atteste de la faible interaction entre les mDC et les agents microbiens ([Stoll et al., 2014](#)). On peut donc penser que cela pourrait favoriser l'étape de surinfection que l'on peut avoir dans certains cas de BPCO.
- Le nombre et la maturation des cellules dendritiques ne change pas entre un patient atteint de BPCO et un patient sain ; en revanche, les marqueurs de maturations seraient réduits chez les mDC et le nombre de cellules de Langerhans serait notablement diminué ([Arellano-Orden et al., 2016](#)).

- Chez les patients atteints de BPCO les cellules dendritiques sur-expriment les marqueurs CD80 et CD86, et produisent de façon importante de l'IFN- α . Un médicament, le resveratrol permet d'inhiber ces petits dysfonctionnements des cellules dendritiques ([Wang et al., 2015b](#)).

1.4.1.2.2 Les monocytes et macrophages

Les macrophages font également partie de la famille des phagocytes ; ils peuvent aussi tout comme les cellules dendritiques, jouer le rôle de cellules présentatrices d'antigène.

Ces leucocytes sont produits à partir de progéniteurs myéloïdes dans la moelle osseuse. Avec l'aide de facteurs de croissances les progéniteurs myéloïdes vont évoluer en monocytes, que l'on retrouve ensuite dans la circulation sanguine.

Il faudra l'action d'un facteur de croissance comme le « macrophage colony stimulating factor » (M-CSF) pour induire la différenciation du monocyte en macrophage mature (**Figure 15**).

Il existe deux grands types de macrophages :

Les macrophages résidents, qui se trouvent au sein même du tissu, et dont le phénotype varie en fonction de leur localisation (**Figure 10**):

- Dans les os, les ostéoclastes
- Dans le système nerveux central, il s'agit de la microglie
- Dans les poumons, les macrophages alvéolaires
- Dans le foie, les cellules de Kupffer
- Dans le tissu conjonctif, ils sont appelés histiocytes
- Dans la rate, ils portent plusieurs noms en fonction de leur localisation : les macrophages de la pulpe blanche, ceux de la pulpe rouge, ceux de la zone marginale et enfin les macrophages métallophiliques.

Les macrophages recrutés sur le lieu de l'inflammation.

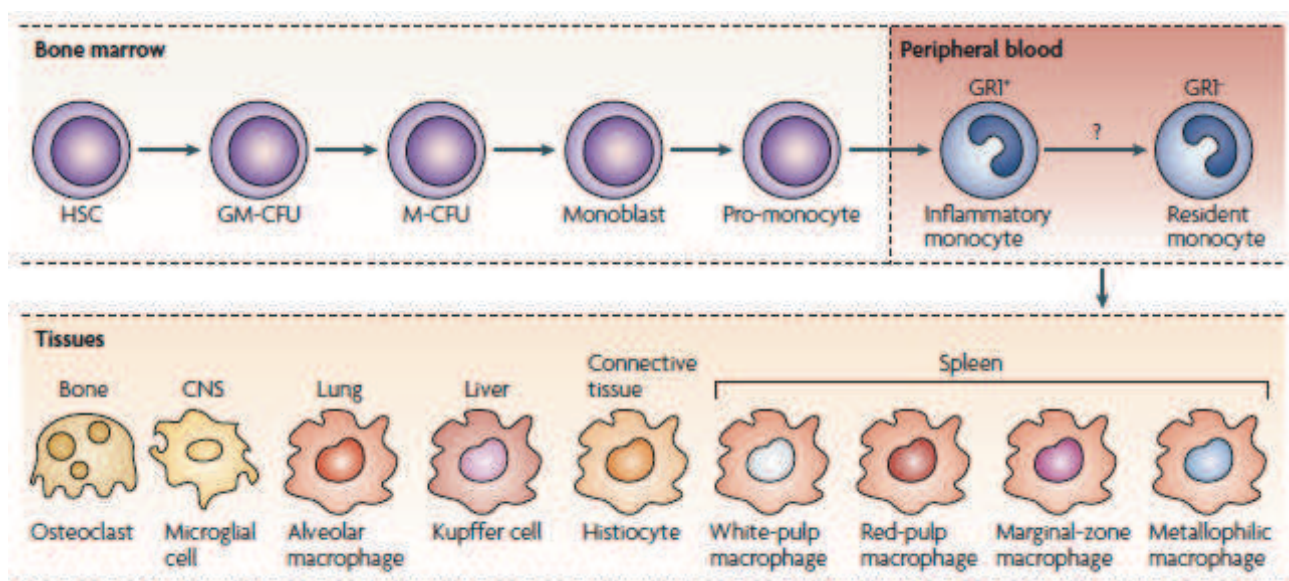


Figure 10 : Hétérogénéité des monocytes/macrophages.

Les monocytes sont originaires des cellules souches hématopoïétiques. Elles se différencient ensuite en pro-monocytes puis migrent dans la circulation sanguine pour atteindre les de tissus cibles où ils vont se différencier des macrophages ([Mosser and Edwards, 2008](#)).

L'activation des macrophages est très complexe, on peut cependant la dichotomiser en deux : les macrophages de type 1 (M1), et ceux de type 2 (M2).

En ce qui concerne la différenciation en M1 que l'on nomme aussi activation classique (**Figure 11**) :

- Elle est induite par le lipopolysaccharide (LPS) que l'on trouve sur la membrane bactérienne, et par l'IFN- γ ou le TNF, molécules de la famille des cytokines (cette notion sera expliquée un peu plus tard dans le manuscrit). Une fois activés, ces macrophages induisent une réponse de type Th1, tuent les pathogènes intracellulaires et sont impliqués dans la résistance tumorale.

La différenciation en M2 est impliquée dans une réponse de type Th2, et plusieurs sous-types de macrophages ont été identifiés (**Figure 11**) :

- Les macrophages M2a (ou activation alternative) : on obtient leur différenciation grâce à deux cytokines, les interleukines 4 et 13. Ces macrophages sont impliqués dans l'allergie, ils servent également à capturer et tuer les parasites.
- Les macrophages M2b (ou de type II) : leur différenciation est déclenchée par la reconnaissance du complexe immunitaire (IC sur le dessin ci dessous), la fixation de ligands sur les TLR ou encore par l'association du récepteur à la cytokine IL-1 (IL-1R), à cette dernière. Ces macrophages sont impliqués dans l'immunorégulation de l'inflammation.
- Enfin les macrophages M2c (ou macrophages désactivés) : leur différenciation est induite par l'IL 10. Ils jouent un rôle dans l'immunorégulation, le remodelage tissulaire ainsi qu'au niveau de la matrice tissulaire.

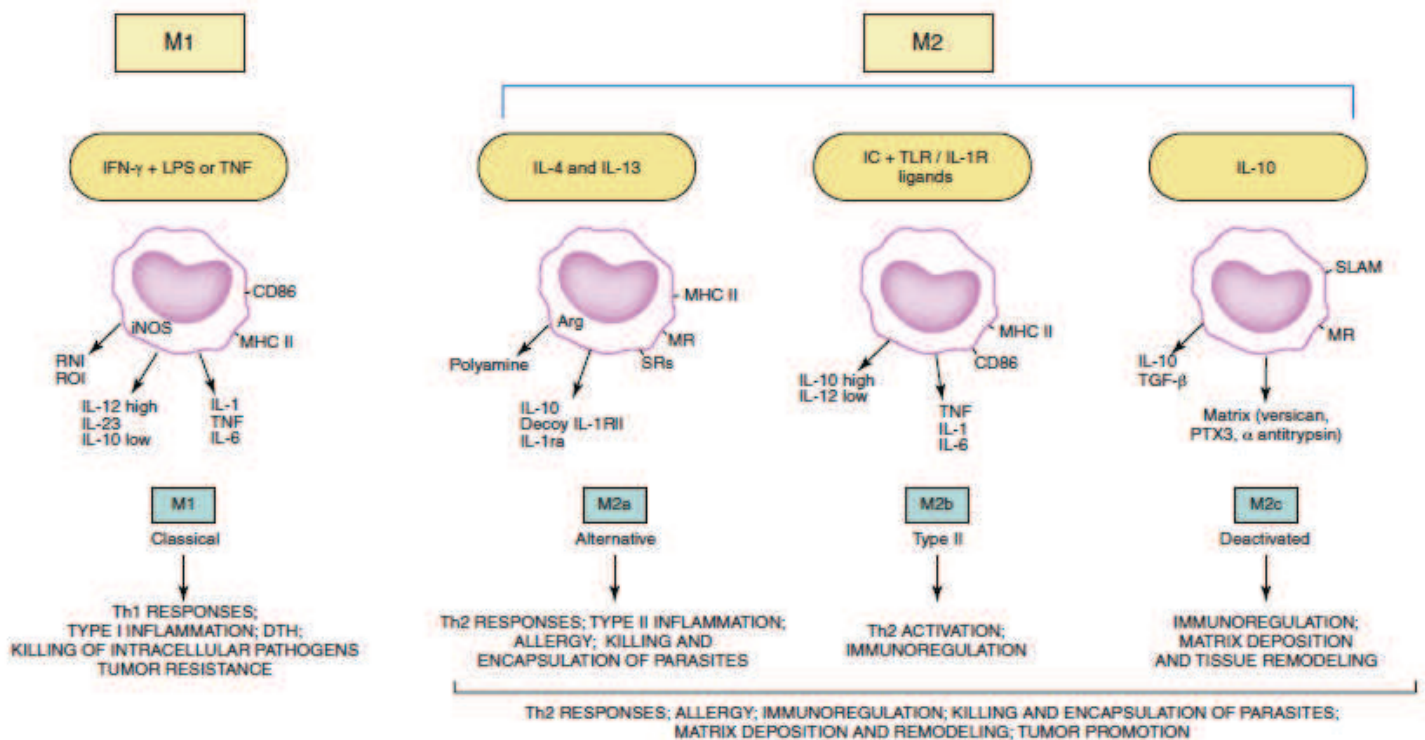


Figure 11 : Classification des macrophages de type 1 et 2.

Les macrophages M1 polarisent la réponse immune vers une réponse de type Th1. Subdivisés en trois sous classes, les macrophages M2 quant à eux orientent la réponse immune vers une réponse de type Th2 (Martinez and Gordon, 2014).

Pour toutes les raisons ci-dessus, les macrophages sont des cellules jouant un rôle très important dans un grand nombre de pathologies inflammatoires, dont la BPCO.

En effet, chez un patient atteint de BPCO, la production des chimiokines CCL2 (ou MCP-1) et CXCL1 (ou GRO-α) vont induire un recrutement important de monocytes dans les poumons. Ces monocytes vont être activés par la fumée de cigarettes et se différencier en macrophages (Traves et al., 2002).

Parmi la population de macrophages mis en jeu dans les pathologies pulmonaires il existe ce que l'on appelle les macrophages alvéolaires. Ces macrophages se développent au sein des alvéoles pulmonaires où elles sont soumises à un microenvironnement particulier contrôlé par les variations de pression partielle en oxygène et l'expression de marqueurs spécifiques à la surface des cellules.

On peut aisément discriminer les macrophages alvéolaires des autres populations de macrophages. En effet, les macrophages alvéolaires n'expriment pas à leur surface le CD11b mais expriment de façon importante le CD11c, le CD200R, le récepteur au mannose, et le « sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin F » (SIGLEC-F). Tous comme les autres populations de macrophages, les macrophages alvéolaires peuvent dans un contexte cytokinique particulier, être polarisés en M1 ou M2. Par exemple, dans le modèle de BPCO induit par la fumée de cigarette, les chercheurs ont constatés que la population de macrophages alvéolaires M2-like (qui produit de l'IL-13) augmente (Shaykhiev et al., 2009). Ainsi les macrophages alvéolaires peuvent aussi bien amplifier la réponse inflammatoire que l'inhiber :

L'activation de la réponse inflammatoire chez les macrophages alvéolaires se fait par l'expression

Figure 12 :

- Du récepteur à l'IL-1 qui une fois activé va induire une réponse pro-inflammatoire en activant la translocation nucléaire de NF-κB.

- De la même manière l'activation du TLR2 induit également sur les macrophages alvéolaires une réponse pro-inflammatoire.
- Du récepteur au TNF
- Du récepteur aux interférons

Par opposition, l'induction de signaux répresseurs de l'inflammation passe par l'activation des récepteurs suivant **Figure 12** :

- Le récepteur au mannose
- Le récepteur à l'IL-10
- Le récepteur au TGF β
- Les récepteurs CD200R, TREM2 (« triggering receptor expressed by myeloid cells 2 ») et SIRP α (« signal-regulatory protein- α ») sont généralement activé par un contact direct (cellule/cellule) entre les macrophages alvéolaires et les cellules épithéliales alvéolaires.

Les macrophages alvéolaires sont également impliqués dans la BPCO. Chez des patients atteints de BPCO, les macrophages alvéolaires expriment moins le TLR2, ce qui réduit la translocation nucléaire de NF- κ B et donc empêche la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β ([Droemann et al., 2005](#)). Cette répression du TLR2 induit chez le rat, une susceptibilité à contracter une infection de type *Aspergillus* ([Wu et al., 2016](#)).

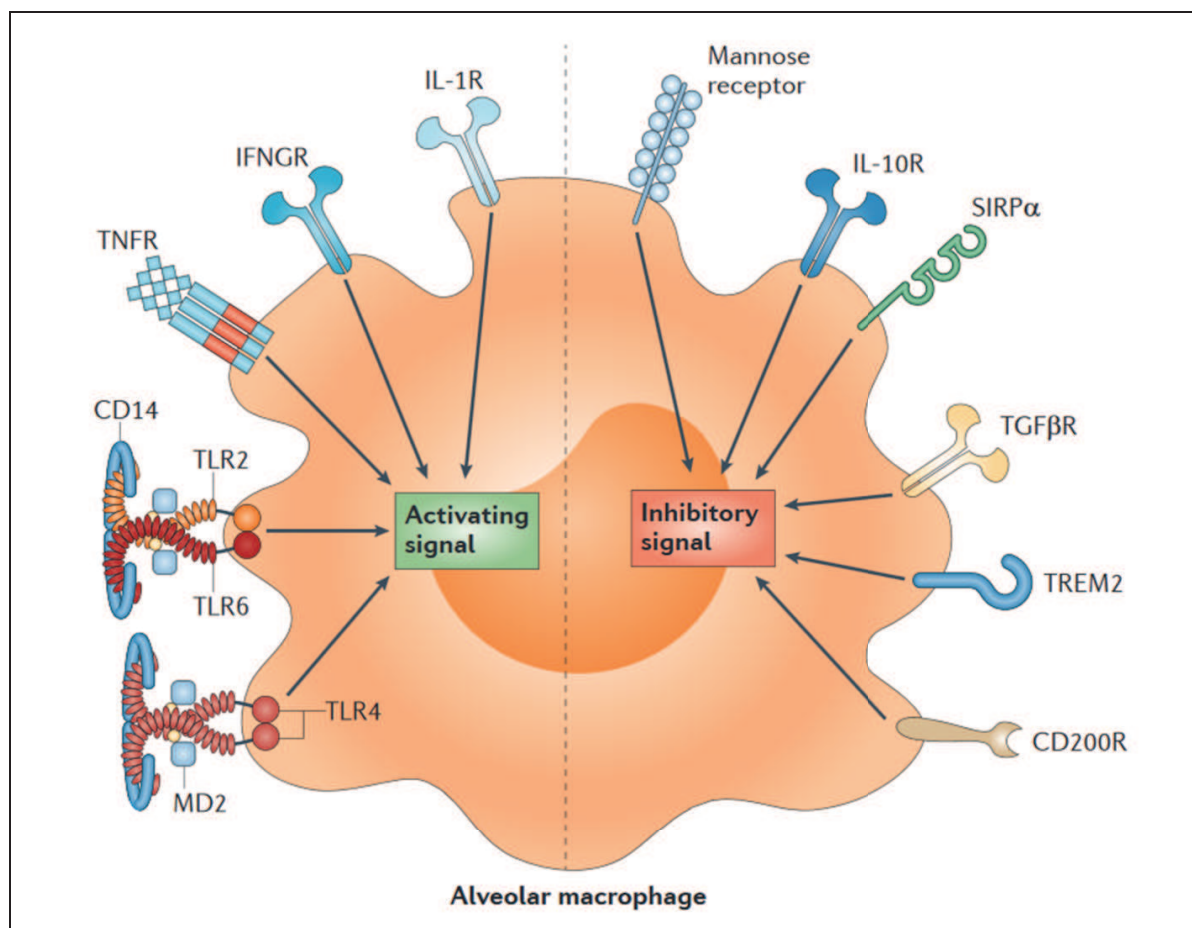


Figure 12 : La balance d'activation des macrophages alvéolaires.

Les macrophages alvéolaires peuvent amplifier la réponse inflammatoire ou au contraire l'endiguer. Ce contrôle de la réponse inflammatoire est fonction de l'activation de leur récepteur de surface ([Hussell and Bell, 2014](#)).

Les macrophages font partie des cellules que l'on retrouve en grand nombre dans les lavages broncho alvéolaires des patients qui souffrent de BPCO ; leur nombre au sein du parenchyme pulmonaire corrèle tout à fait avec le degré de sévérité de l'emphysème.

In vitro, les macrophages peuvent être activés par de l'extrait de fumée de cigarette, et ainsi produire des médiateurs de l'inflammation comme le TNF- α , CXCL1, CXCL8, et CCL2 (dont le rôle est d'attirer les monocytes) et les ROS ([Barnes, 2016](#)).

Chez les patients atteints de BPCO, les macrophages alvéolaires sécrètent davantage d'enzymes telles que des métalloprotéases, des cathepsines, et des protéines inflammatoires. Cette forte production induite par la fumée de cigarette, s'explique par une surexpression de NF-kB chez les macrophages alvéolaires de ces patients ([Caramori et al., 2003](#)). Les macrophages sont également capables de produire des chimiokines (CXCL9, CXCL10, CXCL11) qui vont attirer les lymphocytes TCD8 et TCD4 dans les poumons en se fixant sur leur récepteur CXCR3 ([Grumelli et al., 2004](#)).

Enfin les macrophages des patients atteints de BPCO ont une capacité phagocytaire qui est fortement réduite ; ils pourront donc moins bien phagocyter les microorganismes ou encore prendre en charge les cellules en apoptose. Observé chez 50% des patients atteints de BPCO, ce défaut de phagocytose peut entraîner une colonisation bactérienne au niveau pulmonaire ([Taylor et al., 2010](#)).

1.4.1.2.3 Les polynucléaires neutrophiles

Les neutrophiles sont des leucocytes polynucléés de la famille des granulocytes, capables de phagocyter des microorganismes ou des particules étrangères. Leur noyau est polylobé et leur cytoplasme présente des granules qui contiennent eux-mêmes plus de 700 protéines indispensables pour venir à bout des pathogènes.

Les neutrophiles constituent la plus importante population de cellules immunitaires dans le sang chez l'homme. Ces cellules sont issues de précurseurs dans la moelle osseuse, les cellules souches hématopoïétiques. Ce phénomène de maturation qui se fait grâce à un facteur de croissance le « granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), s'appelle la granulopoïèse (**Figure 16**). Une fois la granulopoïèse terminée, les neutrophiles matures vont migrer dans la circulation sanguine ([Kruger et al., 2015](#)).

Les neutrophiles circulants du sang sont attirés sur le lieu de l'inflammation dans les tissus par chimiotactisme. En effet, la fixation de la chimiokine CXCL12 sur son récepteur CXCR4 va induire une rétention des neutrophiles dans la moelle osseuse tandis que leur migration dans le sang est orchestrée par la fixation de différents ligands sur le récepteur CXCR2 ([Martin et al., 2003](#)). Ils sont également attirés par chimiotactisme par d'autres chimiokines comme CXCL1 (KC), CXCL5 (LIX) et CXCL15 (lungine) ([Kolaczowska and Kubes, 2013](#)).

Les neutrophiles sont des cellules très importantes dans l'établissement de l'inflammation et dans la clairance des microbes pathogènes. Tout comme les cellules dendritiques et les macrophages, ils sont capables à moindre mesure de jouer le rôle de cellules présentatrices d'antigène. Ils jouent principalement leur rôle en utilisant le mécanisme de dégranulation, qui consiste à déverser leurs granules sur le site infectieux pour se débarrasser de l'agent pathogène.

Les granules contiennent de la myéloperoxydase. Cette enzyme qui stimule la dégranulation des neutrophiles, possède des capacités oxydantes, des protéases à sérine comme l'élastase, la protéinase 3 et la neutrophile élastase, ainsi que des peptides antimicrobiens comme la lactoferrine, l' α -défensine et la cathélicidine.

Les protéases des neutrophiles sont directement capables de tuer les micro-organismes et d'inactiver certaines toxines bactériennes. Elles participent au processus inflammatoire. Leurs effets sont régulés notamment par un inhibiteur de protéases à sérines : la serpine ([Korkmaz et al., 2010](#)).

Les peptides anti microbiens participent également à ce phénomène en créant des pores dans la paroi du micro-organisme.

Les neutrophiles peuvent avoir d'autres modes d'action pour se débarrasser des pathogènes, comme :

- La phagocytose de microorganismes par la reconnaissance de complexes immuns, ces micro-organismes ayant été préalablement opsonisés ou via des récepteurs de l'immunité, les « pathogens recognition receptors » (PRR). Contrairement aux macrophages, cette phagocytose se fait par l'intermédiaire de pseudopodes qui vont entourer l'agent pathogène afin de constituer le phagosome. Une fois fusionné avec le lysosome, créant ainsi un phagolysosome dont le pH est acide, le microorganisme est détruit (**Figure 13**) ([Lee et al., 2003](#)).
- La production et la libération de ROS notamment lors de la phagocytose (**Figure 13**) ([Chen and Junger, 2012](#)).

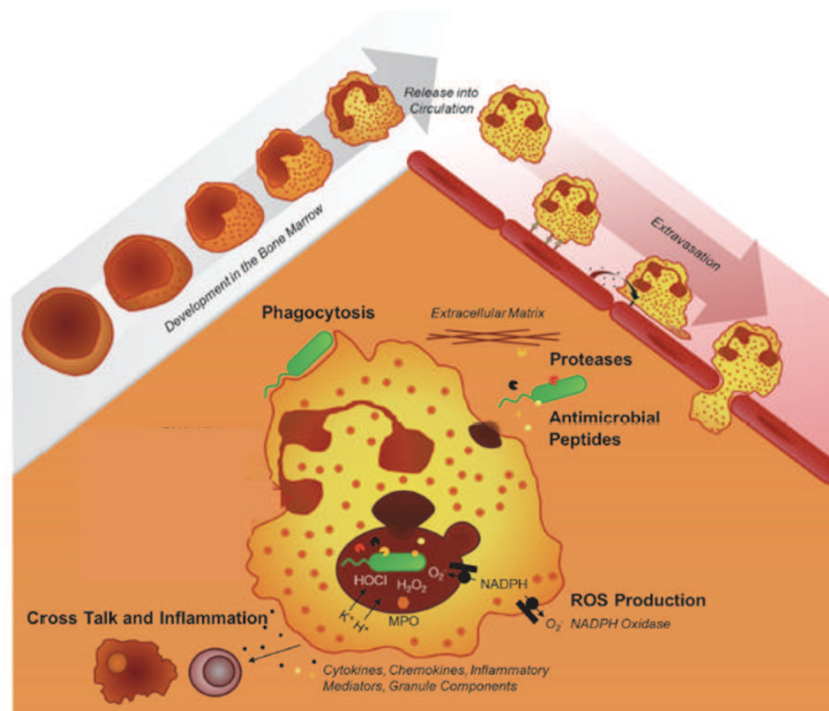


Figure 13 : Mécanismes effecteurs des neutrophiles.

Les neutrophiles se développent dans la moelle osseuse et migrent ensuite vers la circulation sanguine. Du sang les neutrophiles vont ensuite atteindre le site inflammatoire par roulement sur l'endothélium. Les neutrophiles sont capables de phagocyter les pathogènes, de produire des ROS, et dégranuler pour se débarrasser des micro-organismes pathogènes ([Kruger et al., 2015](#)).

- Création de « neutrophils extracellular traps » (NET). Les NET représentent un moyen de destruction des agents pathogènes par la colocalisation de la chromatine et des granules. La nétose ou mort du neutrophile lors de la formation de NET, provoquée par les pathogènes et régulé par la neutrophile élastase et la MPO ; elle se traduit donc par la libération dans la matrice extracellulaire des granules du neutrophile ainsi qu'un filet de chromatine qui va piéger le microorganisme. Celui-ci va se retrouver entouré par le contenu cytotoxique des granules du neutrophile et mourir. En outre, il existe aussi ce que l'on appelle la nétose auto-immune qui libère notre propre ADN dans le milieu extracellulaire, entraînant une réponse du système immunitaire ([Papayannopoulos et al., 2010](#)). (**Figure 14**)

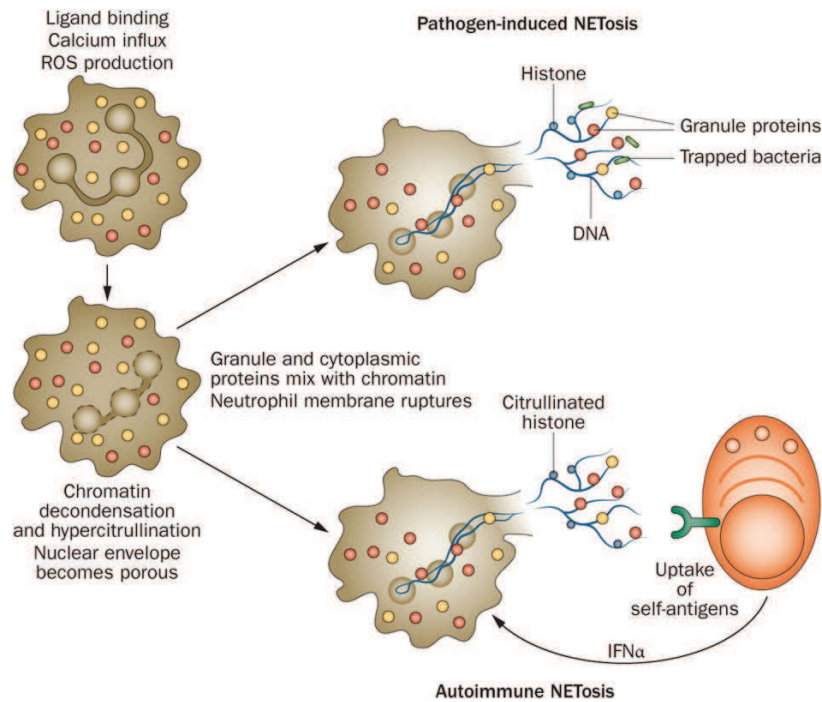


Figure 14 : La nétose.

Les neutrophiles sont capables d'induire deux formes de n toses. La nétose induite par les pathogènes qui entraîne la capture ainsi que la destruction du pathogène et la nétose dite auto-immune qui aboutit à une inflammation auto-immune ([Wright et al., 2014](#)).

Outre leur rôle direct dans l'établissement de l'inflammation via la phagocytose, nétose et les cytokines et chimiokines qu'ils produisent, les neutrophiles participent à la régulation d'un grand nombre de cellules inflammatoires comme :

Les cellules dendritiques :

- Par la production de CCL3 vont permettre d'augmenter le recrutement de ces cellules et ainsi favoriser le contact entre les cellules dendritiques et les neutrophiles. En effet une interaction via le récepteur « dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing non-integrin » DC SIGN entre les cellules dendritiques (DC) et les neutrophiles permet la maturation des DC et l'expansion des cellules T ([van Gisbergen et al., 2005](#)).

Les neutrophiles peuvent agir sur les cellules T de différentes manières :

- Activer les cellules T (lors d'une infection virale par exemple) : l'expression du CMH I par les neutrophiles va leur permettre de directement présenter les antigènes aux cellules T et induire une réponse cytotoxique via le CD8. Elles peuvent également présenter un antigène de façon indirect lorsqu'elles sont en apoptose, le peptide va alors se retrouver à la surface de la cellule et pouvoir être présenté. Les neutrophiles peuvent aussi sécréter des métabolites microbiens qui vont directement activer les cellules T gamma/delta ([Lukens et al., 2010](#)). (**Figure 15**)
- Inhiber l'activation des cellules T : l'interaction entre le neutrophile et la cellule T via le « programmed cell death-1 » (PD-1) / « programmed cell death ligand-1 » (PD-L1), rend la cellule T inopérante. Le taux d'expression des intégrines (PDL-1), la libération de ROS et d'arginase, permet l'inhibition de la prolifération des cellules T. Enfin, la libération de protéases va inhiber l'activation des cellules T ([Pillay et al., 2012](#)). (**Figure 15**)

Les cellules B :

- Via la production de BAFF par les neutrophiles, provoquant une forte activation des cellules B et la production d'anticorps ([Scapini et al., 2008](#)).

Les macrophages :

- En contribuant à l'afflux de macrophages aux sites de l'inflammation en les attirant grâce à la production des chimiokines CCL2, CCL3, CCL19 et CCL20 ([Mayadas et al., 2014](#)), et de protéines de granules qui vont augmenter l'activité antimicrobienne des macrophages en favorisant la phagocytose et la sécrétion de cytokines.

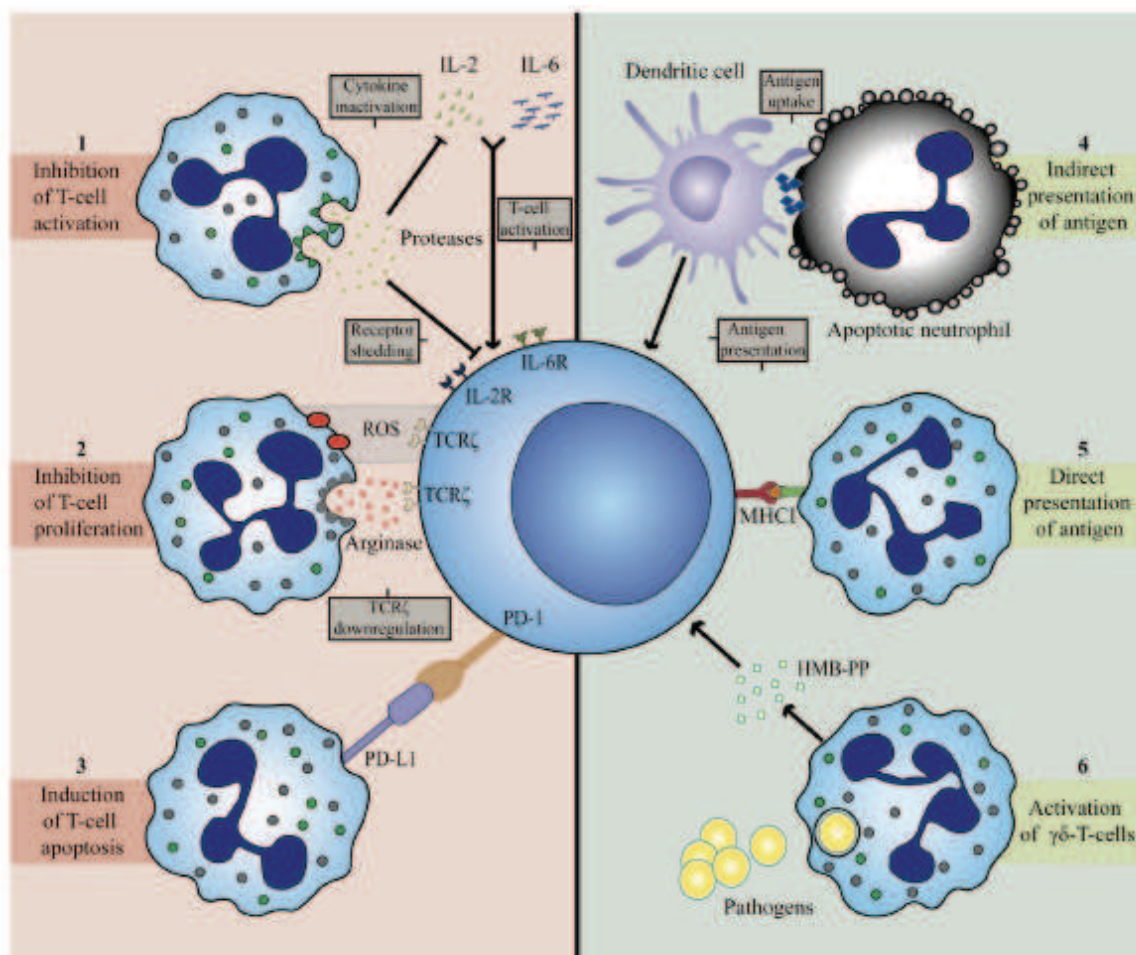


Figure 15 : Mécanismes impliqués dans l'inhibition (panel de gauche) et dans l'activation (panel de droite) des cellules T par les neutrophiles.

Les neutrophiles sont responsables de l'apoptose des cellules T, de l'inhibition de l'activation et de la prolifération des cellules T. Ils sont également capables de présenter de façon directe ou indirecte les antigènes aux cellules T, et de permettre l'activation des cellules T gamma delta ([Leliefeld et al., 2015](#)).

Les neutrophiles sont des cellules qui ont une durée de vie plus courte que la plupart des cellules pro-inflammatoires. Le temps de demi-vie d'un neutrophile ayant quitté la moelle osseuse étant de 4 à 10h ([Revillard](#)).

La mort des neutrophiles est la plupart du temps non inflammatoire. En effet, suite à leur recrutement dans les tissus, ils sont rapidement phagocytés par les macrophages ou meurent par autophagie. Ils peuvent dans certains cas mourir par nérose ou nécrose et générer alors un processus inflammatoire.

Ce type cellulaire est impliqué dans les phases inflammatoires de la BPCO et de la fibrose pulmonaire.

Tout comme les macrophages, les neutrophiles sont retrouvés en grand nombre dans le lavage bronchoalvéolaire des patients atteints de BPCO, et sont associés à la sévérité de la pathologie.

Chez les patients atteints de BPCO, les neutrophiles arrivent aux poumons en suivant un gradient de chimiokines (CXCL1, CXCL5, produit par les macrophages et les cellules épithéliales et CXCL8 produit en grande majorité par les neutrophiles eux même). Ensuite, pour pouvoir entrer dans les poumons les neutrophiles vont interagir avec les cellules endothéliales via la E-sélectine qui est surexprimée chez les patients atteints de BPCO ([Blidberg et al., 2013](#)).

Les neutrophiles recrutés sont activés et la libération de leurs protéines granulaires dans l'espace extracellulaire va contribuer, d'une part à la destruction des alvéoles pulmonaires et d'autre part à l'hypersécrétion de mucus en stimulant les cellules caliciformes.

Chez les patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique, les neutrophiles représentent, avec les macrophages le premier type cellulaire recruté et qui permet la mise en place de l'inflammation. Les protéases des neutrophiles sont mises en jeu dans le clivage de cytokines pro-inflammatoires. Leur rôle dans la pathologie sera développé dans la partie consacrée à l'IL-33.

1.4.1.2.4 Les éosinophiles, basophiles et mastocytes

Il s'agit, tout comme les neutrophiles, de leucocytes granulocytes et polynucléés. Moins abondants, ils sont également produits à partir de progéniteurs hématopoïétiques et sont ensuite libérés dans le sang. (**Figure 16**)

Les éosinophiles sont des cellules mises en cause lors de réactions allergiques ou de réactions immunitaires contre les parasites. Leurs granules contiennent ([Hogan et al., 2008](#)) :

- La protéine basique majeure (MBP) : il s'agit d'une protéine cytotoxique qui induit la libération de l'histamine par les mastocytes et les basophiles par exemple.
- La peroxydase éosinophilique (EPO) : cytotoxique en présence d'H₂O₂, elle sert à induire la libération d'histamines.
- La protéine cationique éosinophilique (ECP) : également cytotoxique, elle sert aussi à la libération d'histamines et inhibe la prolifération lymphocytaire.

Les éosinophiles peuvent également provoquer un mécanisme assez similaire à celui de la nérose des neutrophiles, qui est appelé l'ETose (« ETosis ») ([Ueki et al., 2016](#)).

Les basophiles et les mastocytes possèdent dans leurs granules des protéases à sérines, des métalloprotéïnases et des carboxypeptidases. Lors de leur dégranulation, ils libèrent dans le milieu extracellulaire de l'histamine, de la sérotonine et de l'héparine. Cette étape dégranulation peut être induite par les IgE et IgG1 ([Voehringer, 2013](#)).

Le rôle des éosinophiles dans la BPCO est controversé : tandis que certains observent une augmentation de ce type cellulaire dans le lavage broncho-alvéolaire des patients, d'autres en revanche ne notent aucune différence entre les patients contrôles et ceux atteints de BPCO ([Barnes, 2016](#)).

La BPCO (tout comme la fibrose pulmonaire) n'est pas connue pour être une maladie à éosinophiles ; leur présence dans le lavage broncho-alvéolaire indique donc que le patient pourrait avoir de l'asthme en même temps que sa BPCO : c'est le cas pour environ 15% des cas de BPCO ([Cosio et al., 2016](#)).

Les protéases des mastocytes sont également impliquées dans la BPCO en agissant sur les interleukines. Leur rôle sera abordé dans la partie IL-33.

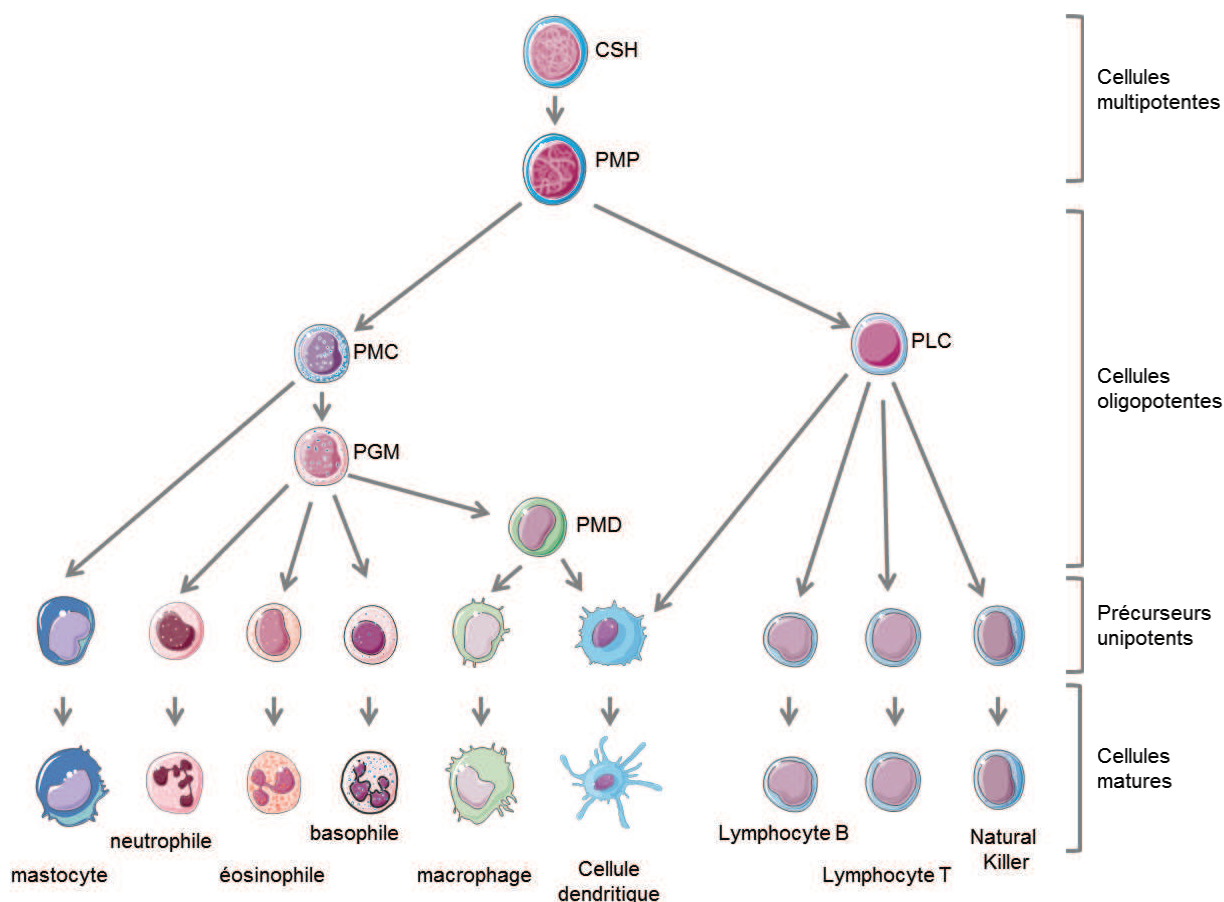


Figure 16 : Différenciation des cellules hématopoïétiques.

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) se différencient en progéniteurs multipotents (PMP). Par la suite, ces PMP vont se différencier d'une part en progéniteurs myéloïdes communs (PMC) afin de produire des progéniteurs granulo-monocytaires (PGM) et des progéniteurs macro-dendritiques (PMD). D'autre part, les PMP vont également pouvoir donner des progéniteurs lymphoïdes communs (PLC). (Utilisation de la banque d'image Servier Medical Art. Figure modifiée à partir de : ([Fiedler and Brunner, 2012](#)))

1.4.1.3 Les cytokines

Les cytokines sont des protéines pléiotropiques produites très vite après l'inflammation des tissus par les cellules immunitaires. Elles conditionnent la réponse immunitaire et jouent un grand rôle dans l'établissement de la réponse immunitaire innée ainsi que dans le choix du type de réponse adaptative qui va être mis en place.

1.4.1.3.1 Le « tumor necrosis factor » (TNF)

Le TNF fait partie de la superfamille du TNF, qui est constituée de 19 ligands et de 29 récepteurs. C'est une cytokine importante qui intervient dans l'immunorégulation de la réponse pro-inflammatoire, dans la communication, la différenciation et la mort cellulaire. ([Aggarwal, 2003](#)) Cette cytokine transmembranaire, et exprimée sous forme trimérique, peut être clivée par la métalloprotéinase « TNF-Alpha-converting enzyme » (TACE). Sous sa forme soluble, le TNF va pouvoir aller se fixer sur ces récepteurs. (**Figure 17**)

Le TNF possède deux récepteurs transmembranaires, les récepteurs TNFR1 et TNFR2 qui ont des fonctions différentes ([Hehlhans and Pfeffer, 2005](#)). Ces deux récepteurs existent également sous forme soluble et vont pouvoir réguler les effets du TNF, en entrant en compétition avec les récepteurs membranaires. ([Black et al., 1997](#))

Le TNFR1, exprimé par quasiment tous les types cellulaires ([Kalliolias and Ivashkiv, 2016](#)), va permettre l'activation de la voie NF- κ B, l'apoptose par la voie « FAS associated protein with death domain » (FADD)/caspase 8, la nécroptose (mort cellulaire par nécrose via la formation d'un nécrosome) ou la survie cellulaire.

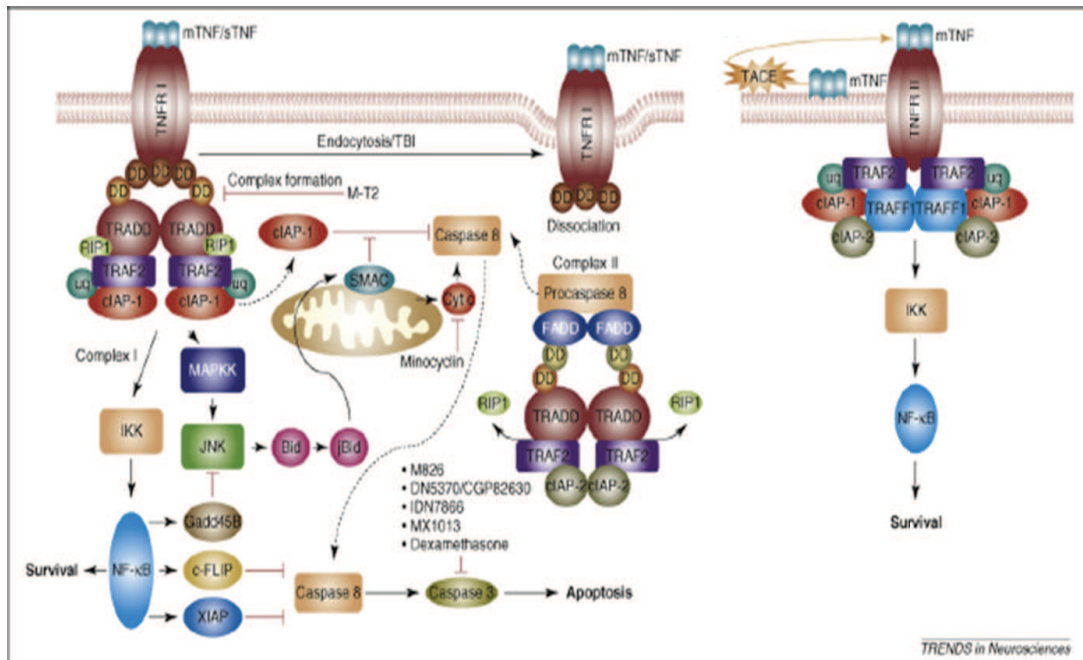


Figure 17 : Les multiples formes du récepteur au TNF et de la signalisation intracellulaire.

Le récepteur TNFR1 lie aussi bien le TNF membranaire que le TNF soluble pour induire la survie cellulaire (via la voie des MAP kinase) d'une part ou l'apoptose (via la voie FADD/TRADD) d'autre part. Le TNFR2 quand à lui induit exclusivement la survie cellulaire suite à l'interaction entre le récepteur et le TNF membranaire ([Chadwick et al., 2008](#)).

Le TNF peut donc avoir un rôle immunostimulateur, mais aussi être immunosuppresseur et ainsi orienter la réponse immunitaire de différentes façons selon les types cellulaires touchés. Il peut (**Figure 18**) :

- Activer les cellules présentatrices d'antigènes en augmentant l'expression du CMH et des molécules d'adhésions sur les macrophages par exemple.
- Activer les cellules endothéliales.
- Activer la production des ROS et des leucotriènes par les neutrophiles
- Induire la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 et l'IL-1 β .
- Inhiber la voie de signalisation médiée par les cellules T.
- Induire l'apoptose.
- Inhiber la prolifération des cellules T et induire de ce fait, une lymphopénie.
- Inhiber l'action des cellules dendritiques en diminuant l'expression des molécules de costimulations.
- Induire la sécrétion de cytokines immunosuppressives par les lymphocytes Th2, comme l'IL-10 et le « transforming growth factor β » (TGF- β).

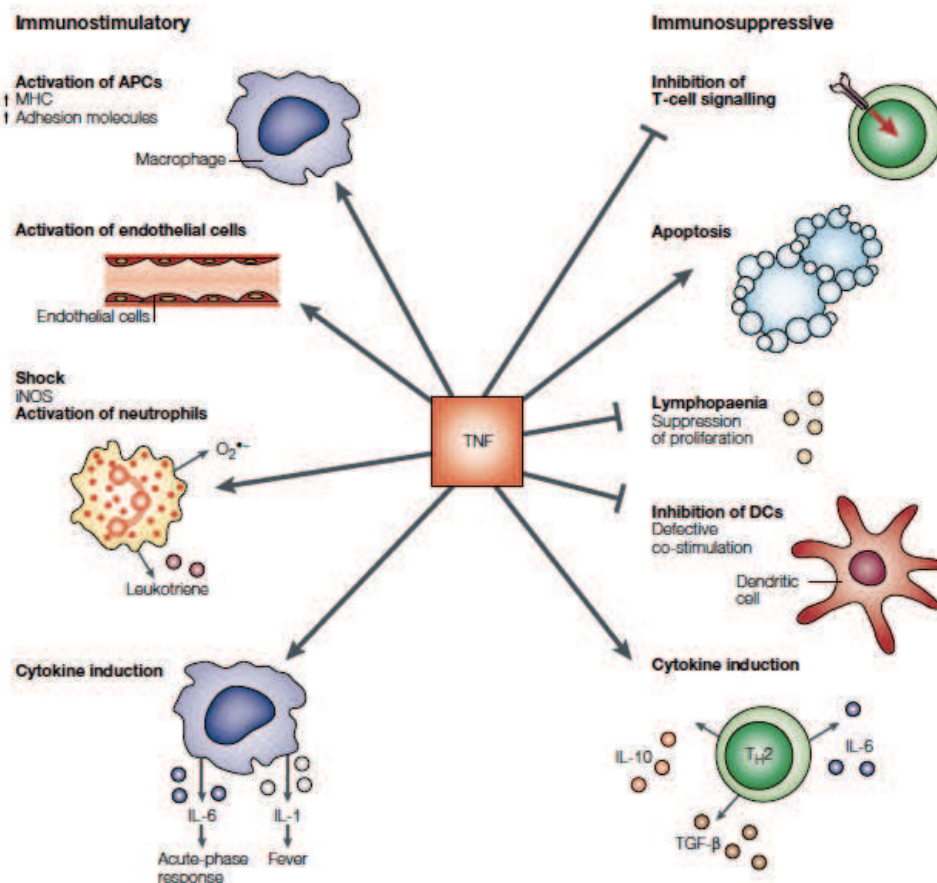


Figure 18 : Résumé des effets immunostimulateurs et immunosuppresseurs du TNF.

Le TNF est capable d'agir à la fois en tant qu'immunostimulateur mais également comme immunosuppresseur. Il permet alors d'une part d'activer les cellules présentatrices d'antigène, les cellules endothéliales, la production de ROS par les neutrophiles, la production de cytokines et d'autre part d'induire l'apoptose, et l'inhibition du signal médié par les cellules T, la prolifération cellulaire, et inactive les cellules dendritiques en bloquant l'expression des molécules de co-stimulations ([O'Shea et al., 2002](#)).

Le TNF régule aussi l'expression de nombreux gènes et est impliqué dans plusieurs types de pathologies :

Le cancer : Découvert comme un sérum qui pouvait induire la nécrose des tumeurs en empêchant la vascularisation tumorale ([Carswell et al., 1975](#)), le potentiel cytolytique du TNF a été mis en évidence grâce à sa capacité d'induire la mort cellulaire.

Les maladies inflammatoires et maladies auto-immunes tels que l'arthrite rhumatoïde, la maladie inflammatoire de Bowel (IBD) et le psoriasis.

Les maladies cardiovasculaires : De nombreuses études montrent que le TNF est à la fois un agent cardiotoxique et un cardioprotecteur ; il peut aussi bien induire l'apoptose des cardiomyocytes, que permettre leur protection en favorisant l'expression des kératines 8 et 18 sur ces cellules([Papathanasiou et al., 2015](#)).

L'hyper nociception : Il a été montré qu'une inhibition du TNF réduisait considérablement la nociception neuronale et inverse les effets de l'hyper nociception ([Hess et al., 2011](#)).

Les maladies pulmonaires :

- La Tuberculose : La tuberculose est une maladie causée par *Mycobacterium tuberculosis* ; de façon générale la tuberculose est contrôlée par les individus infectés. Cependant un individu immunodéficient ou étant déjà atteint du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ou encore d'une arthrite rhumatoïde traitée par des anti-TNF, peut réactiver la tuberculose. Après l'infection, le TNF soluble va se fixer sur le TNFR1 et induire l'activation des cellules dendritiques, et diriger la réponse inflammatoire vers une réponse de type Th1 avec la production des cytokines IL-12 et IFN- γ . Tout ceci va permettre la formation de granulomes au niveau pulmonaire qui vont permettre à l'hôte de contrôler l'infection. Par contre la voie d'activation du TNFR2 est faiblement impliquée dans ce contrôle. En revanche, le TNFR2 est d'avantage impliqué dans la régulation. En effet, des souris déficientes pour TNFR2 survivent plus longtemps car il y a plus de TNF bio-disponible ([Keeton et al., 2014](#)). Dans ce cas, bloquer le TNFR2 pourrait être un procédé intéressant à développer pour un éventuel traitement anti-tuberculose.

Le microenvironnement du TNF reste très important dans cette pathologie, car le simple fait d'inactiver le TNFR1 sur les cellules myéloïdes, empêche le contrôle de l'infection de la même façon qu'une délétion totale du TNFR1 dans un modèle souris. On retrouve alors une importante prolifération bactérienne, et une exacerbation de l'inflammation pulmonaire qui conduit rapidement à la mort des animaux ([Segueni et al., 2016](#)).

- La BPCO : Parmi les cytokines produites en grandes quantités lors de la BPCO, l'augmentation de la production de TNF est observée chez des patients stables, et est plus importante chez les patients en phase d'exacerbation. Le TNF est produit par les monocytes, et en tant qu'activateur de la voie NF- κ B, il va exacerber la réponse inflammatoire. Malheureusement les anti-TNF ne sont pas efficaces chez les patients atteints de BPCO car d'autres cytokines pro-inflammatoires sont également impliquées dans le processus ([Barnes, 2016](#)).

Plusieurs agents thérapeutiques ciblent le TNF dans différentes maladies pour pouvoir résoudre le problème. Parce que l'administration d'anti-TNF peut conduire à la réactivation de la tuberculose ou n'est pas suffisante pour guérir les patients, il est essentiel :

- D'associer les-anti-TNF à d'autres médicaments pour traiter les différentes pathologies.
- Réduire l'immunogénicité du TNF en évitant la production d'anticorps dirigés contre les anti-TNF.
- Contrôler la synthèse du TNF pour éviter par exemple une fixation excessive sur ces récepteurs.
- Inhiber la réponse intracellulaire en bloquant des intermédiaires de la voie de signalisation du TNF.

1.4.1.3.2 Les interférons (IFNs)

Les IFNs constituent une famille importante des cytokines du système immunitaire. De manière générale, ils sont induits le plus souvent lors de la mise en place de défenses contre les infections virales, bactériennes ou encore lors de cancer.

Il existe trois types d'interférons : les interférons de types I (parmi lesquels l'IFN- α et l'IFN- β), de types II (l'IFN- γ , IL-28, IL-29) et de type III (l'IFN- λ). ([Levy et al., 2011](#)) ([Pestka et al., 2004](#)) ([Kotenko, 2011](#))

Les IFN de type I sont produits en réponse aux virus, bactéries et parasites.

Les cellules hématopoïétiques, plus particulièrement les pDC représentent la source principale d'IFN- α , alors que quasiment tous les types cellulaires sont capables de produire de l'IFN- β .

Suite à la reconnaissance de l'agent pathogène, l'IFN- α et l'IFN- β vont être produits en grandes quantités. Ils vont aller se lier à leur récepteur hétérodimérique constitué des chaînes IFNAR1 et IFNAR2 et activer la voie de signalisation « Janus kinase / signal transducers and activators of transcription » (JAK/STAT) pour permettre la stimulation « d'interferon stimulating genes » (ISG) chez les cellules infectées avoisinantes pour qu'elles puissent à leur tour produire de l'IFN.

Contrairement aux IFN de type II, les IFN de type I peuvent avoir l'effet inverse selon l'agent étiologique de l'infection. Par exemple ils sont capables d'induire une immunosuppression et de ce fait, accroître la susceptibilité de l'hôte pour l'agent infectieux (par exemple : *Lysteria monocytogenes*, ([Auerbuch et al., 2004](#)) *Salmonella enterica* etc...).

Les IFN de type I peuvent également augmenter la présentation des antigènes, induire la production de cytokines et de chimiokines par les cellules de l'immunité innée, permettre d'induire la production d'anticorps et augmenter la réponse effectrice des cellules T.

Ils peuvent enfin induire l'apoptose, l'autophagie, la différenciation et la migration cellulaire, inhiber la prolifération, l'angiogenèse, réguler l'auto-immunité, et l'inflammation, selon l'agent pathogène mis en cause ([Bekisz et al., 2010](#)) ([Dussurget et al., 2014](#)).

Les IFN de type I entrent en jeu dans certaines maladies auto-immunes comme le lupus, qui est associé à une production chronique d'IFN de type I. Cette surproduction est également remarquée chez les patients atteints d'une hépatite C chronique ou encore du VIH ([Hardy et al., 2013](#)).

Les IFN de type II sont essentiels à notre défense contre les attaques virales et bactériennes. Par exemple une souris inactivée pour le gène codant pour l'IFN- γ est beaucoup plus susceptible à l'infection par *Mycobacterium bovis*, Bacille de Calmette et Guérin (BCG) ([1993](#)). De même, les patients porteurs d'une mutation invalidant l'IFN- γ (en invalidant le récepteur ou induisant un défaut de production de la cytokine) contractent davantage d'infections virales et bactériennes. Ils sont produits par les cellules dendritiques, les lymphocytes et les cellules épithéliales, la source principale d'IFN- γ restant les « natural killer » (NK) et les cellules T et « natural killer T » (NKT). ([Mammette, 2002](#))

Dans le but de se débarrasser de l'agent pathogène, l'IFN- γ active les macrophages, augmente leur capacité phagocytaire et la production de cytokines pro-inflammatoires. Il favorise également la différenciation des cellules T en cellules de type Th1 et à la production de ROS et d'oxyde nitrique.

L'IFN- γ est aussi utilisé en thérapie, par exemple chez les patients atteints de granulomatose chronique, afin de réduire l'infection.

Les IFN de type III sont les derniers à avoir été découverts (2003) ; de ce fait, cette sous-famille est actuellement moins bien caractérisée que les précédentes ([Kotenko et al., 2003](#)).

Néanmoins il a été démontré que les IFN de type III répondaient à des stimuli différents et utilisaient des récepteurs différents des IFN de type I et II.

Les IFN de type III peuvent être impliqués dans la réponse antivirale et empêcher la prolifération ([Hamming et al., 2013](#)). Ils sont également produits en réponse aux bactéries mais la voie de signalisation mise en place reste encore peu connue.

Lors de la BPCO, il a été montré que les IFN- β et $\lambda 1$ étaient détectés chez les patients et que leur expression pouvait être corrélée avec le pourcentage de neutrophiles dans les expectorations des patients. Par contre les ISGs (« interferon stimulated genes ») sont diminués chez les patients atteints de forme sévère de BPCO et il semblerait que cette diminution soit mise en cause dans l'exacerbation de la maladie, en altérant la réponse des poumons aux agents infectieux ([Hilzendegeer et al., 2016](#)).

1.4.1.3.3 Les chimiokines

Responsables de la migration des leucocytes vers le lieu de l'inflammation, les chimiokines sont des acteurs essentiels de la réponse inflammatoire. Dans cette famille, à ce jour environ 50 chimiokines (CXCL ou CCL) et 20 récepteurs (CXCR ou CCR) ont été identifiés. Ces derniers sont

différemment exprimés sur les leucocytes et peuvent être rangés en deux catégories ([Griffith et al., 2014](#)) :

- Les récepteurs couplés aux protéines G qui transmettent le signal par l'intermédiaire de la toxine pertussis (PTX)
- Les récepteurs atypiques qui créent un gradient de chimiokines et qui servent aussi à atténuer l'inflammation en piégeant les chimiokines.

Les chimiokines entrent en jeu dans :

Le développement et la différenciation des précurseurs de cellules immunes :

- Par exemple, le développement des cellules T dans le thymus dépend de l'interaction entre CCL21, CCL25 et CXCL12, avec leurs récepteurs respectifs CCR7, CCR9 et CXCR4. Les progéniteurs des cellules T vont entrer dans le thymus en réponse au CCL21, CCL25 et CXCL12, qui sont produits par l'épithélium thymique. Les thymocytes doubles négatifs vont alors être dirigés vers la zone corticomédullaire grâce au CCR7 et au CXCR4. Enfin le CCR9 dirige les précurseurs vers la zone subcapsulaire ([Love and Bhandoola, 2011](#)).
- Dans la moelle osseuse, le développement des cellules immunitaires dépend essentiellement de l'interaction entre CXCL12 et CXCR4. Les cellules souches hématopoïétiques sont d'abord situées où il y a des cellules « CXCL12 abondant reticular cells » ; ces cellules produisent une grosse quantité de CXCL12 qui va se fixer au CXCR4 des cellules souches hématopoïétiques. Cette interaction permet le maintien des cellules souches dans leur niche au sein de la moelle osseuse. Suite à un stress ou une infection, le blocage du CXCR4 sur les cellules souche hématopoïétique, est suffisant pour mobiliser les cellules comme les neutrophiles par exemple vers la circulation sanguine. Par contre, au fur et à mesure de leur maturation dans la moelle osseuse, les neutrophiles vont progressivement perdre l'expression du CXCR4 ce qui va permettre leur migration. A l'inverse des granulocytes, la libération de la moelle osseuse des monocytes est dépendante à la fois de CXCR4 et de CCR2. L'expression de CCR2 varie selon la maturité du monocyte, mais immature, ils expriment à la fois et de façon équivalente, aussi bien le CXCR4 que le CCR2. L'interaction entre CXCL12 et CXCR4 retient les monocytes dans la moelle ([Ara et al.](#)) ([Omatsu et al.](#)).

La localisation des cellules immunes dans les organes lymphoïdes secondaires ([Griffith et al., 2014](#)):

- CCL19, CCL21 et CXCL13 permettent l'entrée des cellules immunitaires dans les ganglions.
- CXCL13, via CXCR5, permet d'assurer la localisation des cellules B au sein des follicules.

Contrôle de la localisation des cellules immunitaires dans la périphérie :

- Dans les poumons, il existe des neutrophiles sentinelles, retenus dans les poumons via le CXCR4, qui permettent de rapidement « donner l'alerte » en cas d'infection. Un antagoniste de CXCR4 induit la fuite de ces neutrophiles des poumons ; le CXCR4 contrôle aussi le temps de vie des neutrophiles, de sorte que lors de la sénescence, les neutrophiles subissent une augmentation de l'expression de CXCR4, ce qui induit leur retour dans la moelle osseuse où elles vont entrer en apoptose ([Devi et al., 2013](#)) ([Martin et al., 2003](#)).
- Pour les éosinophiles et les basophiles : la migration et la rétention des éosinophiles dans les tissus périphériques comme le tractus gastro-intestinal sont induits par la production de

CCL11 par les cellules stromales et les cellules immunes ([Mishra et al., 1999](#)) ([Palframan et al., 1998](#)).

- Pour les mastocytes : les précurseurs des mastocytes expriment CXCR2, CXCR4, CCR3 et CCR5, ce qui leur permet de migrer de l'endothélium vers les tissus périphériques comme les intestins. De plus, le phénomène de « homing » des mastocytes dépend de CXCR2 et de l'intégrine $\alpha 4 \beta 7$ ([Abonia et al., 2005](#)).
- Pour les monocytes : la catégorisation des monocytes pro-inflammatoires et anti-inflammatoires se fait respectivement par l'augmentation d'expression de CCR2 et du récepteur à la fractalkine CX3CR1 ([Griffith et al., 2014](#)).
- Pour les cellules dendritiques, le mécanisme exact de transfert des cellules dendritiques vers les tissus périphériques comme la peau et l'intestin est peu connu ; En revanche, ce mécanisme implique CCL2, CXCL14 et CCL20. On sait aussi que les cellules dendritiques utilisent le CCR7 pour migrer des ganglions afférents vers les ganglions drainant qui peuvent se trouver dans la peau par exemple.
- Le « homing » des cellules T ne se fait qu'en l'absence d'expression de CCR7, une fois dans les ganglions, les cellules T suivent un gradient de CCL19 et de CCL21 pour aller à la rencontre des cellules dendritiques.

Les chimiokines sont donc particulièrement essentielles dans le processus inflammatoire. Ainsi, lors de l'inflammation, la production par les mastocytes de CXCL1 et CXCL2 induit très rapidement le recrutement des neutrophiles, la production de ces mêmes chimiokines par les macrophages permettant également de recruter les neutrophiles. Les chimiokines sont produites en masse en réponse à l'attaque des pathogènes afin de provoquer le recrutement d'autres cellules immunitaires, d'activer des cellules résidentes comme les cellules épithéliales, d'opérer un phénomène de « homing » (de retour des cellules dans les organes hématopoïétiques) et d'augmenter la réponse inflammatoire.

Les chimiokines contrôlent également la réponse adaptative : par exemple, les lymphocytes T CD8 sont guidés vers les cellules dendritiques qui n'ont pas déjà interagit avec les lymphocytes T CD4. Les cellules dendritiques produisent du CCL3, CCL4, CCL5 et CCL17 pour attirer les TCD8 via CCR5 et CCR4 ([Griffith et al., 2014](#)).

Dans notre modèle, lors de la phase d'exacerbation de la BPCO, les fibrocytes sont recrutés de la circulation sanguine vers les poumons grâce au CXCR4 ([Dupin et al.](#)). Le CCR5 et le CCR6 protège de l'emphysème et atténuent l'inflammation. Ils peuvent également diminuer l'apoptose et le remodelage cellulaire ([Ken et al., 2007](#)) ([Bracke et al., 2006](#)).

Lors de la fibrose pulmonaire expérimentale, plus particulièrement dans le modèle bléomycine, le CCR2 protège de la fibrose alors que le CCR4 permet la différenciation des macrophages en M2 et l'atténuation de l'inflammation. Le CXCR3 par contre aggrave la fibrose en jouant sur les neutrophiles et le "priming" des cellules T ([Pignatti et al., 2006](#)) ([Trujillo et al., 2008](#)).

1.4.1.3.4 Les interleukines (IL)

i La superfamille de l'IL-1

Parmi les interleukines qui constituent la famille de l'IL-1, sont présentent l'IL-1 α , l'IL-1 β , l'IL-1Ra, l'IL-18, l'IL-33, l'IL-36 α , l'IL-36 β , l'IL-36 γ et l'IL37. La grande majorité de ces interleukines sont pro-inflammatoires, mis à part certaines comme l'IL-1Ra (antagoniste du récepteur à l'IL-1 ou encore connu sous le nom d'inhibiteur de l'IL-1) et l'IL-37 qui ont un rôle anti-inflammatoire. Par exemple en ce qui concerne l'IL-1ra, une compétition récepteur-ligand va s'établir entre l'IL1ra/IL1 β et le récepteur à l'IL-1 (IL-1R1/IL-1RAcP).

Il faut noter que certaines cytokines en relation avec les pathologies pulmonaires comme l'IL-1 et l'IL-18 sont soit activées par l'inflammasome grâce à un clivage enzymatique.

Cette famille contient également 11 molécules qui constituent les récepteurs de ces interleukines. Ces récepteurs possèdent, pour la plupart d'entre eux une partie intracellulaire et une partie extracellulaire. Cette dernière, hormis pour l'IL-18, est composée de trois domaines très similaires à ceux des immunoglobulines. La partie intracellulaire en revanche possède un domaine Toll/IL-1 récepteur (TIR) (**Figure 19**). Cette région est très importante car elle permet une signalisation intracellulaire via la molécule adaptatrice MyD88 (« myeloid differentiation primary response gene 88 ») conduisant à l'activation de la synthèse de gènes codant des cytokines pro-inflammatoires.

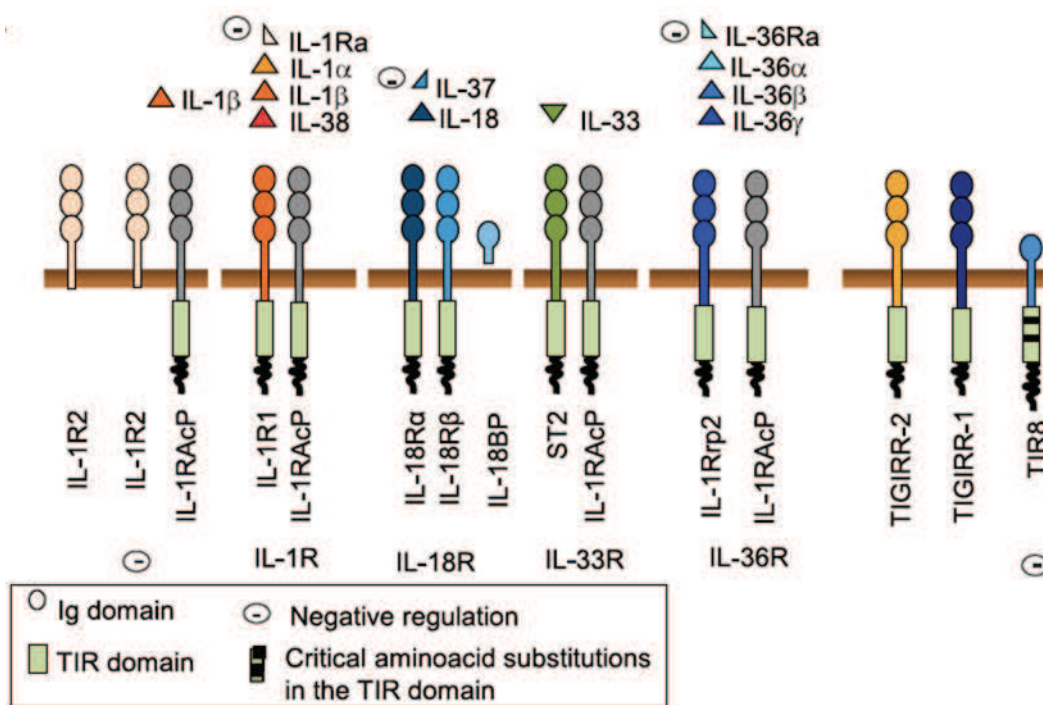


Figure 19 : Ligands et récepteurs de la famille de l'IL-1.

Représentation schématique des ligands et des chaînes des récepteurs associés. Le signe moins indique une inhibition. Figure modifiée à partir de ([Garlanda et al., 2013](#)).

ii IL-1β/IL-1F2

Cette interleukine, responsable de l'hyperthermie, existe sous forme soluble et se fixe sur la partie extracellulaire de ses récepteurs, l'IL-1R2 et l'IL-1R1 ; ce dernier est généralement présent sous forme de dimère avec l'IL-1RAcP pour « IL-1 receptor accessory protein » qui est un corécepteur. Cette chaîne accessoire est partagée par les autres interleukines de cette famille qui ont un effet agoniste.

IL-1R2 seul ou couplé à IL-1RAcP existent également sous forme soluble.

Produite par les cellules hématopoïétiques ainsi que par les cellules endothéliales et les fibroblastes, l'IL-1β est d'abord synthétisée sous forme inactive (proIL-1β) et nécessite une maturation par clivage enzymatique de la caspase-1. Une fois sous sa forme active, l'IL-1β va pouvoir être sécrétée et se retrouver dans le milieu extracellulaire.

La caspase 1 existe elle aussi sous une forme inactive que l'on appelle pro-caspase, et elle nécessite également un clivage pour devenir active. Ce clivage s'effectue après formation d'un complexe protéique entre la pro-caspase, un récepteur cytosolique ou NLRP3 et une molécule adaptatrice « apoptosis associated speck-like protein » (ASC), complexe appelé inflammasome dont la description sera faite plus tard dans le manuscrit.

Cependant la pro IL-1 β peut aussi être sécrétée puis clivée par l'élastase et la protéinase 3 des neutrophiles, initiant ainsi une inflammation complètement indépendante de la caspase 1 et de l'inflammasome NLRP3.

Cette cytokine est impliquée dans :

- Maladies auto-inflammatoires : une mutation gain de fonction de la cryopyrine (ou récepteur NLRP3) induit de façon importante la sécrétion de l'IL-1 β . En effet, cette mutation provoque la formation constitutive de l'inflammasome et donc de la maturation et sécrétion de l'IL-1 β . Ceci a pour conséquence d'induire une inflammation constitutive et donc d'installer la maladie auto-inflammatoire. ([Garlanda et al., 2013](#))
- Favorise la carcinogenèse en induisant l'angiogenèse des tumeurs ([Carmi et al., 2013](#)).
- Favorise la clairance bactérienne en augmentant par exemple la température corporelle de l'individu infecté.
- L'exacerbation de l'inflammation ; par exemple dans la fibrose pulmonaire induite par les microparticules ou la bléomycine, il a été montré que l'IL-1 β est activée par la caspase 1 via la voie de l'inflammasome. Il a aussi été montré que cette voie est dépendante de la production d'ATP et de sa fixation sur son récepteur purinergique P2X7 ([Riteau et al., 2010a](#)).

L'activation de la voie de l'IL-1 β médiée par la fixation de ce dernier sur son récepteur, (IL-1R1/IL-1RaCP) peut être régulée par l'IL-1Ra. En allant se lier sur l'IL-1R1, l'IL-1Ra va créer une compétition pour le récepteur à l'IL-1 β , et ainsi diminuer voir bloquer l'activation de la voie.

iii L'Interleukine 33

Cette cytokine de la famille de l'IL-1 est retrouvée à la fois dans le cytoplasme et le noyau des cellules, l'IL-33 est exprimée de façon constitutive par un grand nombre de cellules telles que les macrophages, les cellules épithéliales, les cellules endothéliales et au sein des organes lymphoïdes. D'autres cellules en revanche sont incapables, d'après les connaissances actuelles, de produire l'IL-33 mais peuvent capturer et stocker la cytokine, c'est le cas pour les hématies et les plaquettes ([Wei et al., 2015](#)) ([Takeda et al.](#)).

Cette cytokine se trouve donc dans le milieu intracellulaire et peut être sécrétée ou libérée passivement dans le milieu extra cellulaire. Elle possède un récepteur transmembranaire nommé ST2, qui doit former un dimère avec la chaîne IL-1RaCP afin de provoquer une signalisation intracellulaire. La chaîne ST2 existe aussi sous forme soluble dans le milieu extracellulaire, où elle va pouvoir bloquer l'action de l'IL-33 en la capturant, diminuant ainsi biodisponibilité. (**Figure 20**)

Une fois activée, la voie de signalisation conduit au recrutement de la molécule adaptatrice MyD88, et induit la synthèse de facteurs de transcription comme NF- κ B, lequel va induire l'expression de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-13 et l'IL-5 (**Figure 20**).

L'IL-33 est également capable d'orienter la réponse inflammatoire aussi bien vers une réponse de type Th2, que de type Th1 (**Figure 20**).

De plus, le degré d'oxydation de l'IL-33 permet de contrôler l'inflammation dépendante de ST2. En effet lorsque l'IL-33 se retrouve dans la matrice extra cellulaire, il peut subir de par son environnement, un changement conformationnel qui se traduit par l'apparition de 2 ponts disulfures bloquant ainsi l'interaction entre l'IL-33 et son récepteur ST2. L'IL-33 sous sa forme oxydée, devient alors inactive tandis que sa forme réduite reste active. ([Cohen et al., 2015](#))

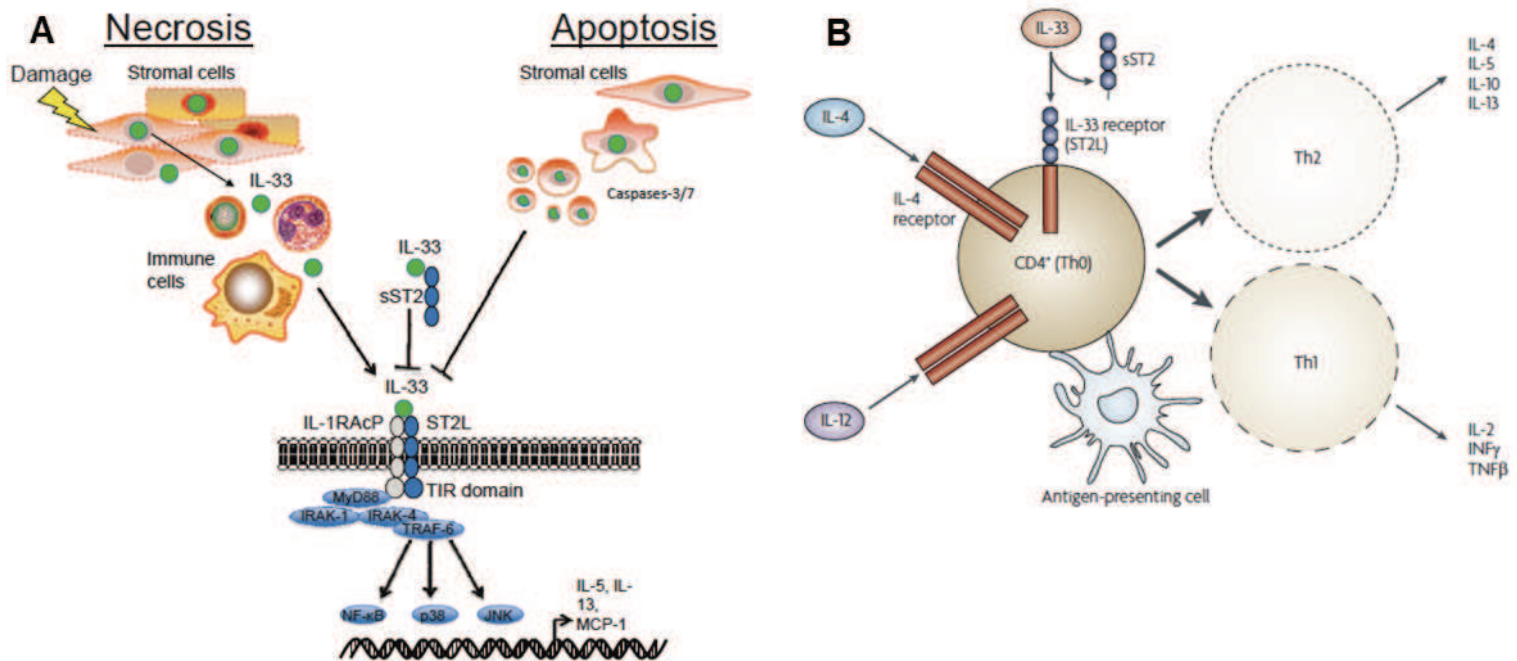


Figure 20 : L'IL-33 libérée par les cellules en apoptose ou suite à un dommage induit un signal via ST2.

A) l'IL-33 peut se fixer à son récepteur ST2 et induire la synthèse de cytokines comme l'IL-13 et l'IL-5. L'action de l'IL-33 peut aussi être neutralisée par la forme soluble de son récepteur, ST2 soluble. B) l'IL-33 en interagissant avec ST2 peut aussi bien orienter la réponse immune vers une réponse de type Th2 mais également vers une réponse de type Th1 ; cela se traduit par la production de cytokines associées à ces deux orientations. Figures provenant de : ([Miller, 2011](#)) et ([Kakkar and Lee, 2008](#))

L'IL-33 possède différents rôles :

- Alarmine, car libérée par des cellules en stress et/ou endommagées comme par exemple lors de la nécrose ; l'IL-33 va pouvoir « alerter » d'autres types cellulaires et agir comme un signal de danger. Ainsi, la présence d'IL-33 extracellulaire induit, entre autres, la production d'IL-5 et d'IL-13 par les « innate lymphoid cells » ou ILC2, ou encore d'IL-2 par les cellules dendritiques (**Figure 21**) ([Price et al., 2010](#)) ([Matta et al., 2014](#)).
- Cytokines, car une production importante de cette protéine va être induite en réponse à une agression par une particule exogène comme les allergènes et permettre l'expansion d'un certain nombre de cellules comme les ILC2 et les cellules T régulatrices (Treg).
- Facteur de transcription dans le noyau, l'IL-33 va pouvoir notamment réguler l'activation de gènes NF-κB, et ainsi par extension, réguler la production de cytokines pro-inflammatoires ([Ali et al., 2011b](#)).
- Egalement connue pour son rôle pro-inflammatoire, cette interleukine est impliquée dans un grand nombre de mécanismes de défense, en réponses aux pathogènes et autres signaux de dangers.
- Contre les parasites tels que les helminthes, l'IL-33 libérée et/ou sécrétée par les cellules épithéliales intestinales, va stimuler la prolifération des ILC2, ainsi que la production d'IL-5 et d'IL-13 par ces cellules. Tandis que l'IL-5 va stimuler le recrutement des éosinophiles, l'IL-13 va induire l'hyperplasie des cellules caliciformes au niveau intestinal, pour se

débarrasser du parasite, tout ceci avant que la réponse adaptative ne soit mise en place. **(Figure 21)**

- Lors d'une réponse asthmatique allergique, l'IL-33 va orienter la réponse immune en stimulant la prolifération des ILC2 et des mastocytes, qui vont sécréter de l'IL-13 et de l'IL-5 afin de provoquer le recrutement des éosinophiles et ainsi permettre la différenciation des cellules T en cellules Th2. Lors de la réponse immunitaire face à un allergène comme *Alternaria*, une importante production d'IL-33 va être induite. La cytokine va ensuite se retrouver dans le milieu extracellulaire via une nécrose cellulaire ou une sécrétion orchestrée par des signaux de dangers tels que l'ATP ou l'acide urique, et ce 1h après exposition **(Figure 21)** ([Snelgrove et al., 2014](#)).
- Que ce soit dans l'allergie alimentaire ou la dermatite atopique, les cellules cibles de l'IL-33 vont être les mastocytes. Grands producteurs d'IL-33, une fois activés ils vont produire davantage de cette interleukine, des cytokines pro-inflammatoires et des IgE. Ce processus participe à l'établissement du choc anaphylactique dans l'allergie alimentaire au beurre de cacahuète par exemple ([Galli and Tsai, 2012](#)).
- Dans les maladies inflammatoires intestinales, l'inflammation induit une production d'IL-23 qui inhibe l'action de l'IL-33. Dans ce cas, l'IL-33 permet l'expansion et l'activation des lymphocytes Treg pour contrôler l'inflammation ([Schiering et al., 2014](#)).
- Dans la polyarthrite rhumatoïde, l'IL-33 libérée par les fibroblastes induit la production d'IL5 et d'IL-6 par les mastocytes provoquant la stimulation ces lymphocytes B avec la production d'auto-anticorps d'une part et la polarisation de la réponse immune de type Th17. **(Figure 22)**
- Dans le contexte d'une allogreffe suivi d'un traitement par de l'IL-33 recombinant, celle-ci va permettre l'activation des cellules dendritiques et l'induction de la production d'IL-2. L'IL-2 va provoquer le développement et la maturation des Treg, lesquels sont très importants car ils contrôlent l'inflammation et sont aussi essentiels pour induire la tolérance. Ce rôle joué par les Treg est complété par une diminution du taux d'allo-anticorps ([Brunner et al., 2011](#)).
- En réponse aux virus : par exemple suite à une infection par le virus influenza, la voie IL-33/ST2 est indispensable au rétablissement de l'intégrité de l'épithélium de façon dépendante des ILC2 ([Monticelli et al., 2011](#)).
- Lors de l'inflammation induite par les nanoparticules administrées par voie intraveineuse, nous savons qu'il y a une production d'IL-33 au niveau pulmonaire mais le rôle et le mode d'action précis de cette interleukine reste à explorer ([Wang et al., 2013](#)).
- L'IL-33 permet également d'établir une tolérance immunitaire. Les cellules dendritiques vont ainsi empêcher le développement de l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale ([Milovanovic et al., 2012](#)) **(Figure 22)**.
- L'IL-33 va aussi induire une hépato-protection dans le modèle d'ischémie-reperfusion. ([Sakai et al., 2012](#)) **(Figure 22)**.

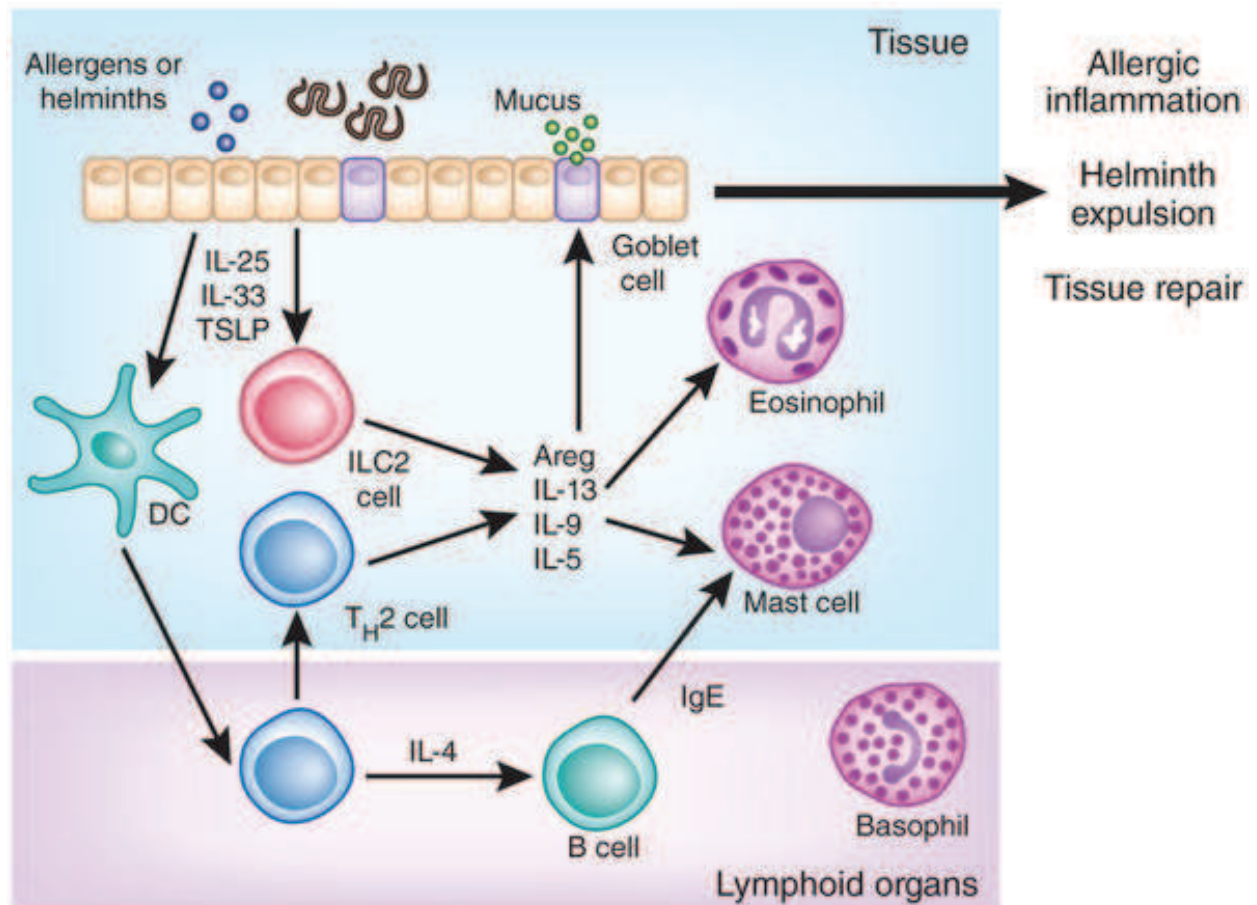


Figure 21 : Action de l'IL-33 en réaction aux helminths ou aux allergènes.

Face à un allergène ou un parasite, l'IL-33 contenue dans les cellules épithéliales et endothéliales va être libérée par un phénomène de nécrose cellulaire. L'IL-33 va ensuite activer les cellules dendritiques, les ILC2 et les lymphocytes Th2 qui vont ainsi se mettre à produire de l'amphiréguline (Areg), de l'IL-13 et de l'IL-5. Ces cytokines vont être impliquées dans le recrutement de cellules proinflammatoires comme les éosinophiles et les mastocytes et dans le mécanisme de réparation tissulaire ([Licona-Limon et al., 2013](#)).

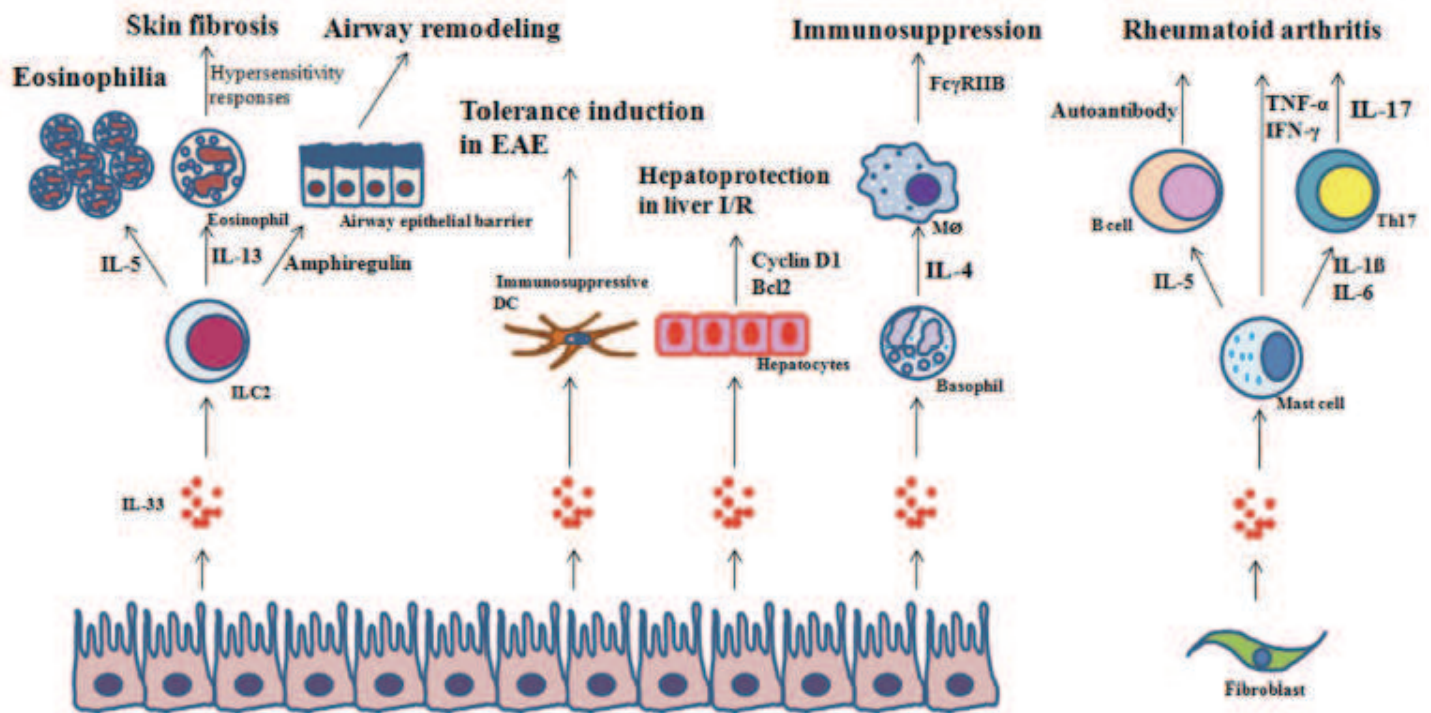


Figure 22 : Exemples de régulation de l'inflammation induite par l'IL-33.

L'IL-33 est impliquée dans un grand nombre de mécanismes inflammatoires comme la réponse allergique entraînant une éosinophilie, la fibrose de la peau, le remodelage pulmonaire, la tolérance, l'hépatoprotection, l'immunosuppression et la polyarthrite rhumatoïde ([Le et al., 2013](#)).

L'activité de l'IL-33 peut être augmentée par l'activité protéasique des granulocytes, notamment celle des neutrophiles et des mastocytes. En effet l'IL-33 existe sous plusieurs formes, une forme entière et plusieurs formes clivées. La forme entière de l'IL-33 est biologiquement active et est constituée de 270 acides aminés. Elle possède trois grands domaines d'interactions :

- Un domaine nucléaire qui se situe entre le 1^{er} et le 65^{ème} acide aminé, permettant non seulement la localisation nucléaire mais aussi l'interaction avec la séquence nucléaire de NF-κB. (**Figure 23**)
- Un domaine central qui va du 66^{ème} acide aminé au 111^{ème}. Ce domaine va faire l'objet de clivages par les protéases des neutrophiles et des mastocytes. (**Figure 23**)
- Enfin un domaine « IL-1 like cytokine ». Cette dernière partie de la cytokine est structuralement identique à celui des cytokines de la famille de l'IL-1 et va être clivée par des protéases cellulaires. (**Figure 23**)

Lors de la mort cellulaire programmée (apoptose), qui est une mort cellulaire non inflammatoire, l'IL-33 doit être contrôlée afin d'éviter son action pro-inflammatoire ; l'IL-33 sous sa forme entière est en effet inactivée suite à son clivage par la caspase 3 et 7. Ces caspases sont impliquées dans l'apoptose et vont cliver l'IL-33 au niveau de son domaine « IL-1 like cytokine » et ainsi générer 2 peptides : un premier peptide de 178 acides aminés et un second de 91 acides aminés. Ces deux formes clivées de l'IL-33 sont biologiquement inactives, et n'induisent donc aucun processus inflammatoire ([Luthi et al., 2009a](#)).

L'IL-33 sous sa forme entière peut également être clivée par les protéases des neutrophiles (la neutrophile élastase, la cathepsin G, le Granzyme B et la tryptase), des ILC2 et des mastocytes (la tryptase et la chymase). Les clivages effectués au niveau du domaine central sont à l'origine de trois peptides biologiquement actifs de 161, 171, et 175 acides aminés. Ces formes clivées, plus

actives que la forme entière, sont connues pour avoir un rôle pro-inflammatoire dans un grand nombre de pathologies comme l'asthme allergique et la BPCO. En effet les formes clivées générées par les protéases des neutrophiles sont retrouvées dans le lavage broncho-alvéolaire des patients atteints de BPCO et leur quantité est corrélée à l'infiltration neutrophilique. Les formes clivées générées par les mastocytes sont capables d'activer les ILC2 et d'orienter la réponse inflammatoire (Lefrancais et al., 2012) (Lefrancais et al., 2014).

Cependant le rôle de ces formes clivées dans la fibrose pulmonaire est peu connu jusqu'à présent.

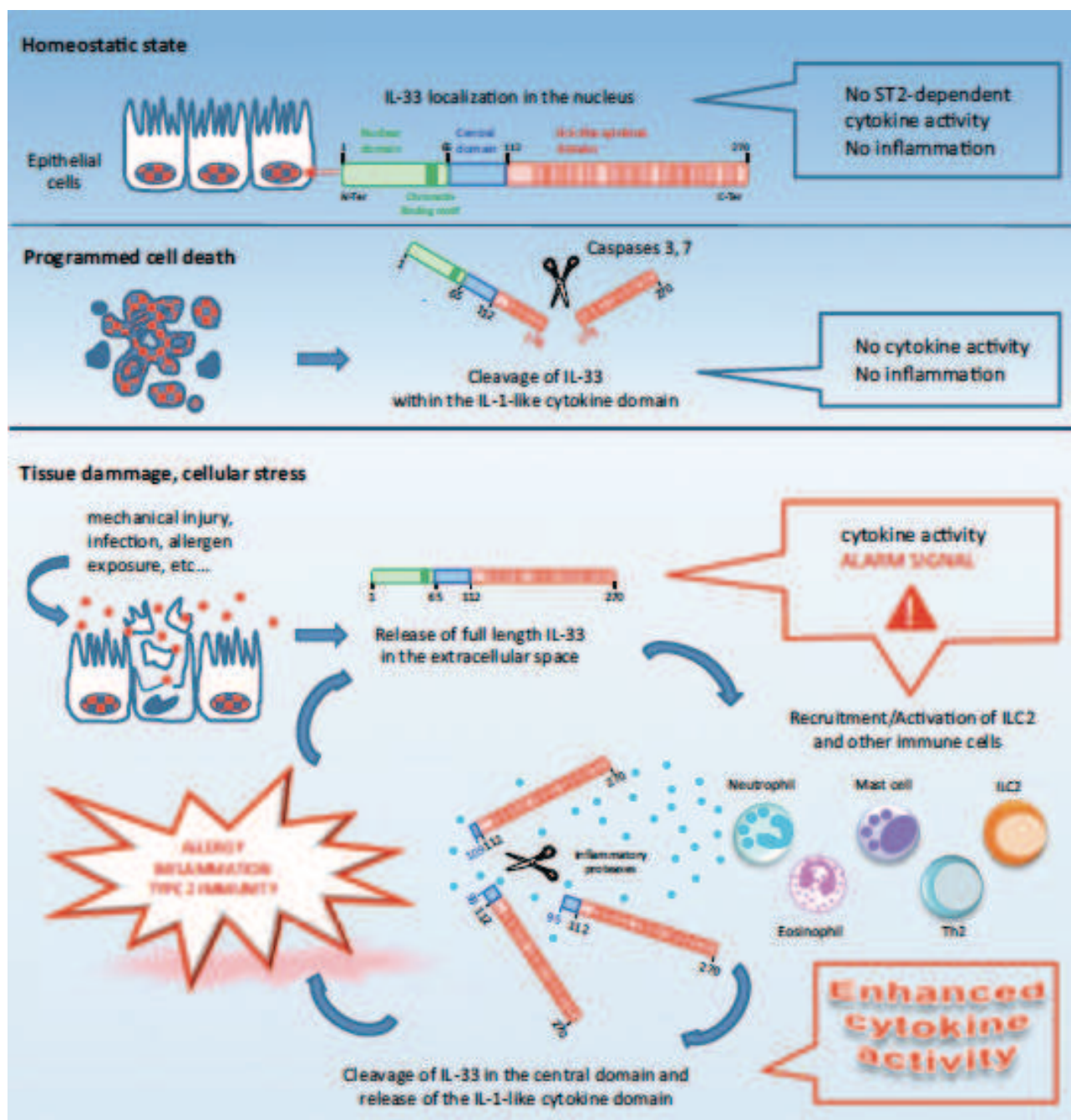


Figure 23 : IL-33 une alarmine nucléaire libérée lors de dommages cellulaires.

L'IL-33 est une cytokine nucléaire qui est libérée dans la matrice extracellulaire lors de dommages cellulaires importants induits par des allergènes ou lors de la mort cellulaire programmée. Cette cytokine peut subir des clivages qui la rendent inactive au niveau du domaine IL-1 « like » (par la caspase 3 et 7) et des clivages donnant lieu à des formes actives au niveau du domaine central (par les protéases des neutrophiles et des mastocytes). L'IL-33 est aussi impliquée dans le recrutement des ILC2 (Cayrol and Girard, 2014).

Bien que controversé pendant plusieurs années, il est maintenant accepté par le plus grand nombre que l'IL-33 peut être clivée par la caspase-1, générant ainsi une forme biologiquement inactive conduisant à la perte de sa fonction proinflammatoire.

1.4.1.4 Les senseurs de l'immunité innée

Tout au long de cette introduction, il a été fait mention d'un système mis en place par notre organisme pour détecter les agents pathogènes. C'est en 1989 que l'immunologiste Charles Janeway propose la notion de PRR. Ce concept met en évidence la reconnaissance, par le système immunitaire inné, de pathogènes par l'intermédiaire de motifs bien précis. Les PRR reconnaîtraient alors des PAMP, et c'est la reconnaissance de ces PAMP par les PRR qui est à l'origine de la réponse innée.

Les PRR sont constitués de deux grandes familles : les TLR et les NLR.

1.4.1.4.1 Les Toll-like receptors (TLR)

Les TLR ont été découverts chez la drosophile en 1996 par Jules Hoffman. Cette découverte lui a valu le prix Nobel en 2011.

Les TLR chez l'Homme sont au nombre de 10 ; ils sont tous transmembranaires, mais tandis que certains sont situés au niveau de la membrane plasmique, avec une partie extracellulaire et une autre intracellulaire, d'autres en revanche, sont situés à la membrane des endosomes et possèdent une partie dans le milieu intracellulaire et l'autre partie à l'intérieur de l'endosome. Ces senseurs de l'immunité peuvent donc aussi bien détecter des PAMP extracellulaires qu'intracellulaires. La reconnaissance par les TLR peut alors induire la phagocytose des agents pathogènes, le recrutement de cellules pro-inflammatoires comme les leucocytes et la synthèse de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires afin d'éliminer le microorganisme. Les TLR sont capables de reconnaître aussi bien les bactéries, les champignons, les virus et les parasites. Chaque PAMP peut être reconnu par un ou plusieurs TLR ; nous pouvons distinguer **(Figure 24)**

Les TLR qui se situent à la membrane plasmique :

- Le TLR5 qui reconnaît la flagelline qui constitue le flagelle de grands nombres de bactéries.
- Le TLR2, qui peut reconnaître aussi bien la porine des bactéries comme *nisseria*, que l'acide lipoteichoïque (LTA) des bactéries Gram positives.
- Le TLR2 formant un hétérodimère avec le TLR1 reconnaît les lipopeptides triacétylés des bactéries et notamment des mycobactéries.
- Le TLR2 en hétérodimère avec le TLR6 reconnaît également les lipopeptides diacétylés des mycoplasmes par exemple.
- Le TLR11 qui reconnaît les bactéries uropathogènes.
- Le TLR4 reconnaît notamment le lipopolysaccharide (LPS) qui est une endotoxine présente sur la membrane des bactéries Gram négatives.

Les TLR à la membrane des endosomes, reconnaissent essentiellement des acides nucléiques comme :

- Le TLR3 qui reconnaît l'ADN double brin qui compose un grand nombre de virus.
- Le TLR7 en hétérodimère avec le TLR8 reconnaît l'ARN simple brin présent chez certains virus.

- Le TLR9 qui reconnaît l'ADN CpG, non méthylé présent chez les bactéries mais également chez certains virus.
- Le TLR13 qui reconnaît la sous unité 23s de l'ARN ribosomal bactérien.

De façon générale, les TLR extracellulaires activent des facteurs de transcriptions comme NF- κ B, l'« activator protein-1 » (AP1) et le « cAMP responsive element binding protein » (CREB), pour stimuler la production de cytokines pro-inflammatoires.

Les TLR des endosomes, activent plutôt le facteur de transcription « interferon regulatory factor 7 » (IRF7) pour induire la production d'IFN de type I. Seul le TLR4, capable d'induire la production de cytokines pro-inflammatoire, peut aussi être endocyté afin d'activer « l'interferon regulatory factor 3 » (IRF3) et induire la production d'IFN de type I (O'Neill et al., 2013).

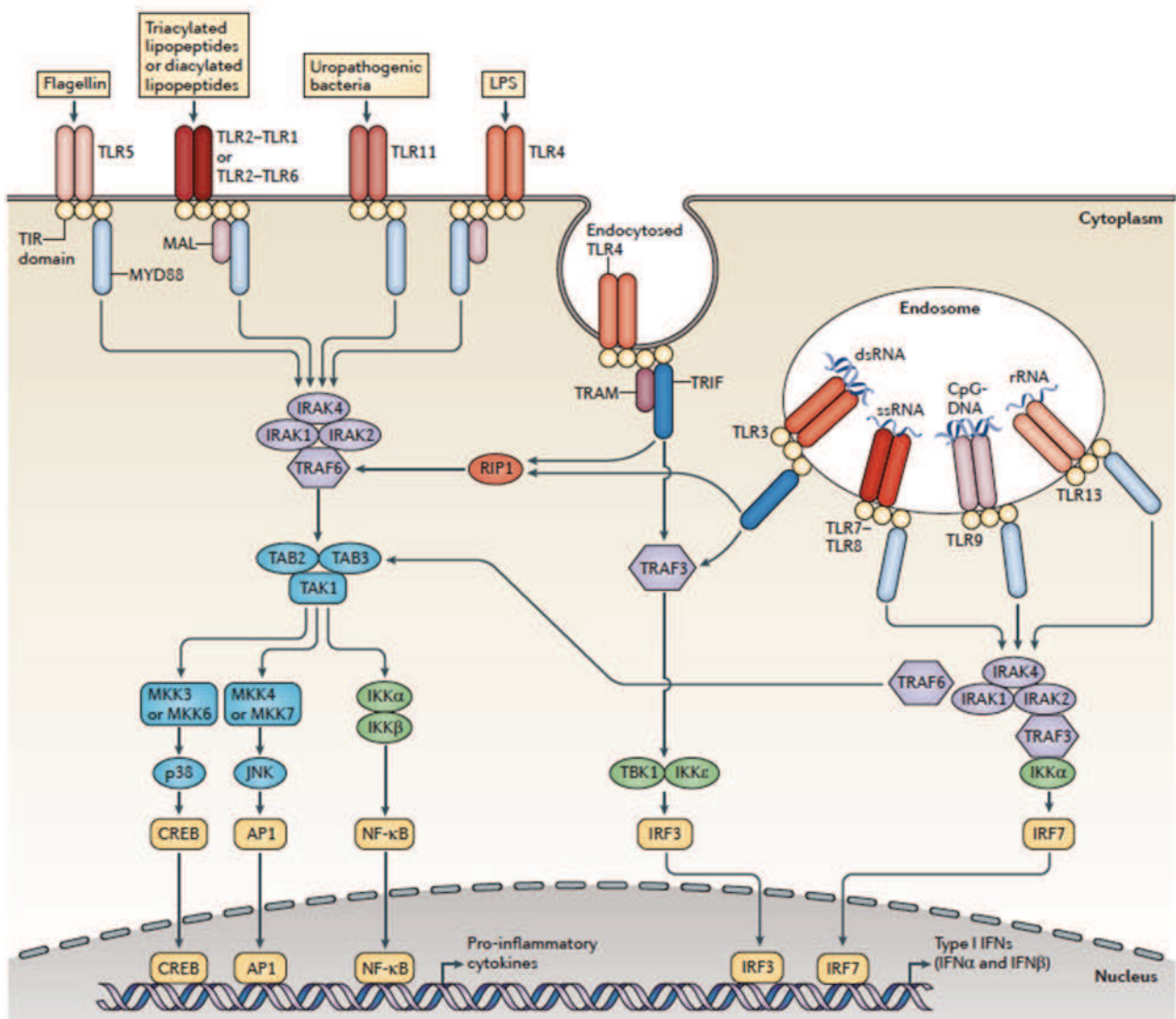


Figure 24 : Les TLR chez les mammifères et leur voie de signalisation.

Les TLR induisent la synthèse de cytokines pro-inflammatoires. Il existe des TLR à la membrane plasmique et des TLR qui se situent à la membrane des endosomes. Ils reconnaissent des molécules de dangers associées aux pathogènes qui sont diverse et variées; qui peuvent se trouver aussi bien dans le milieu extracellulaire qu'à l'intérieur même de la cellule (O'Neill et al., 2013).

Dans un article sur la BPCO, il a récemment été montré que l'expression du TLR9 était nécessaire pour le développement de l'emphysème pulmonaire provoqué par la fumée de cigarette chez la souris ([Foronjy et al., 2016](#)).

Une délétion du TLR4 entraîne à un emphysème spontané ([Zhang et al., 2006](#)).

Les TLR sont essentiellement mis en jeu lors de la reconnaissance de pathogènes viraux et bactériens. De ce fait, lorsqu'un patient atteint de BPCO va développer une surinfection, l'implication des TLR va être la plus importante, en réponse à l'infection.

Les TLR sont également impliqués dans l'établissement de la fibrose pulmonaire. Dans les poumons les TLR4 et TLR2 sont faiblement exprimés de façon endogène sur un grand nombre de cellules telles que les lymphocytes, les macrophages, les neutrophiles et sur les pneumocytes de type I et II. Lors d'une fibrose pulmonaire, leur expression va se trouver fortement augmentée, participant ainsi à l'aggravation de la maladie en augmentant la sensibilité de détection des pathogènes dans les poumons ([Go et al.](#)).

1.4.1.4.2 Les Nod-like receptors (NLR)

Parmi les PRR, les NLR représentent une famille de protéines cytosoliques qui sont des récepteurs reconnaissant essentiellement des PAMP et des DAMP (**Figure 25**). En effet, bien que certains NLR (NLRC4, NOD1, NOD2, NAIP) puissent reconnaître des PAMP qui proviennent de bactéries, certains d'entre eux (comme NLRP3) peuvent également reconnaître des DAMP. On peut compter parmi ces DAMP : l'ATP extracellulaire, l'acide urique, l'ADN extracellulaire, les ROS, les produits de la nécrose ou autres micro ou macro molécules produites de façon endogène par nos cellules et qui n'ont pas lieu d'être dans le milieu extracellulaire. Les particules exogènes de l'environnement comme la silice, l'amiante ou certaines nanoparticules font également partis des DAMP.

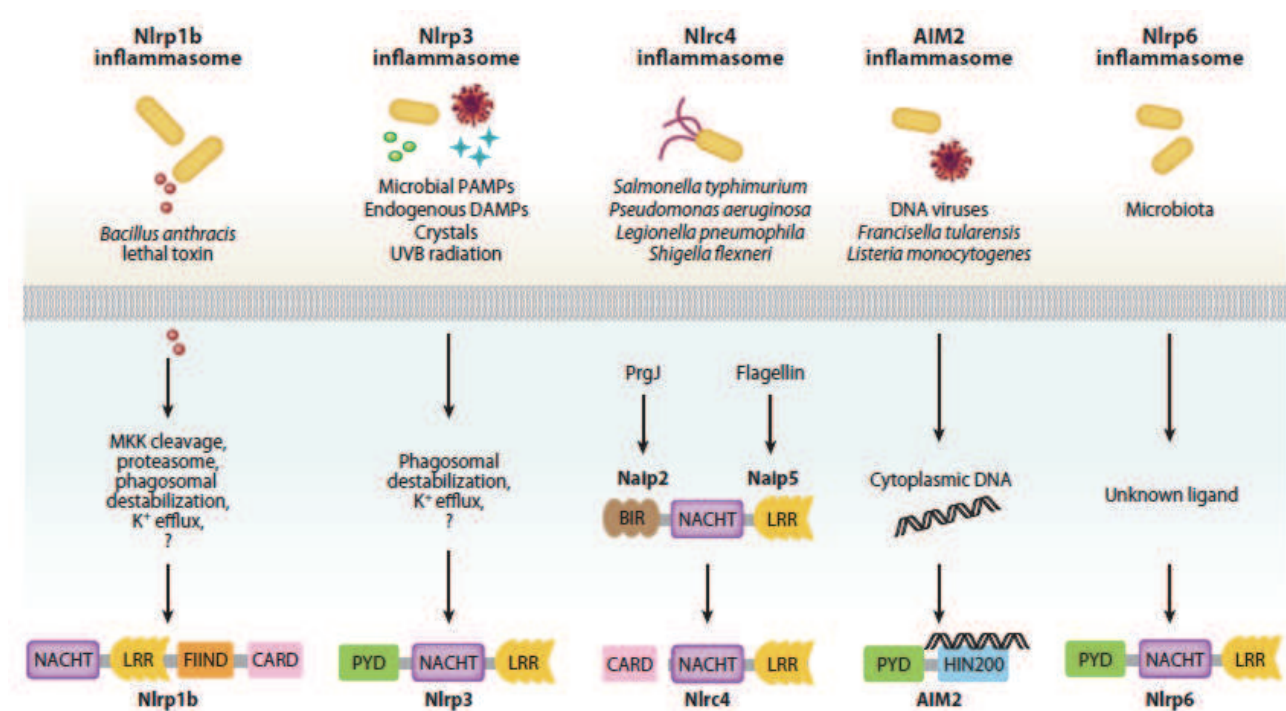


Figure 25 : Aperçu des PRR qui peuvent former un inflammasome.

([Lamkanfi and Dixit, 2012](#))

Chez l'homme les NLR se composent de 22 membres, répartis en 4 sous familles (**Figure 26**) ([Geddes et al., 2009](#)).

- CIITA : cette sous-famille comprend CTIIA agit en tant que facteur de transcription en activant la transcription des gènes qui codent pour le CMH II. ([Tschopp et al., 2003](#))
- IPAF ou NLRC4: Cette famille se distingue par son domaine CARD en N-terminal et aussi par l'absence de NAD. Au sein de cette famille sont présents les « NLR family apoptosis inhibitory protein » (NAIP) qui possèdent un domaine BIR en N-terminal ; certains membre de cette famille peuvent former un inflammasome et agissent donc en induisant la production d'IL-1 β , ainsi que l'inflammasome NLRC4 ([Poyet et al., 2001](#)).
- NOD (« NLR nucleotide oligomerization domain receptor »): Ces récepteurs qui ne possèdent pas de « pyrin domain » (PYD), peuvent jouer sur la réponse inflammatoire via deux voies bien distinctes : la voie NF- κ B/AP-1 (mis en jeu dans l'apoptose et l'inflammation) d'une part et la voie MAVS/IRF (mis en jeu dans la production d'IFN- β) d'autre part ([Correa et al., 2012](#)).
- NLRP ou NALP : cette sous-famille comprend les inflammasomes NLRP, qui servent entre autre à la maturation par clivage enzymatique de l'IL-1 β et de l'IL-18. ([Thornberry et al., 1992](#)) ([Murphy et al.](#))

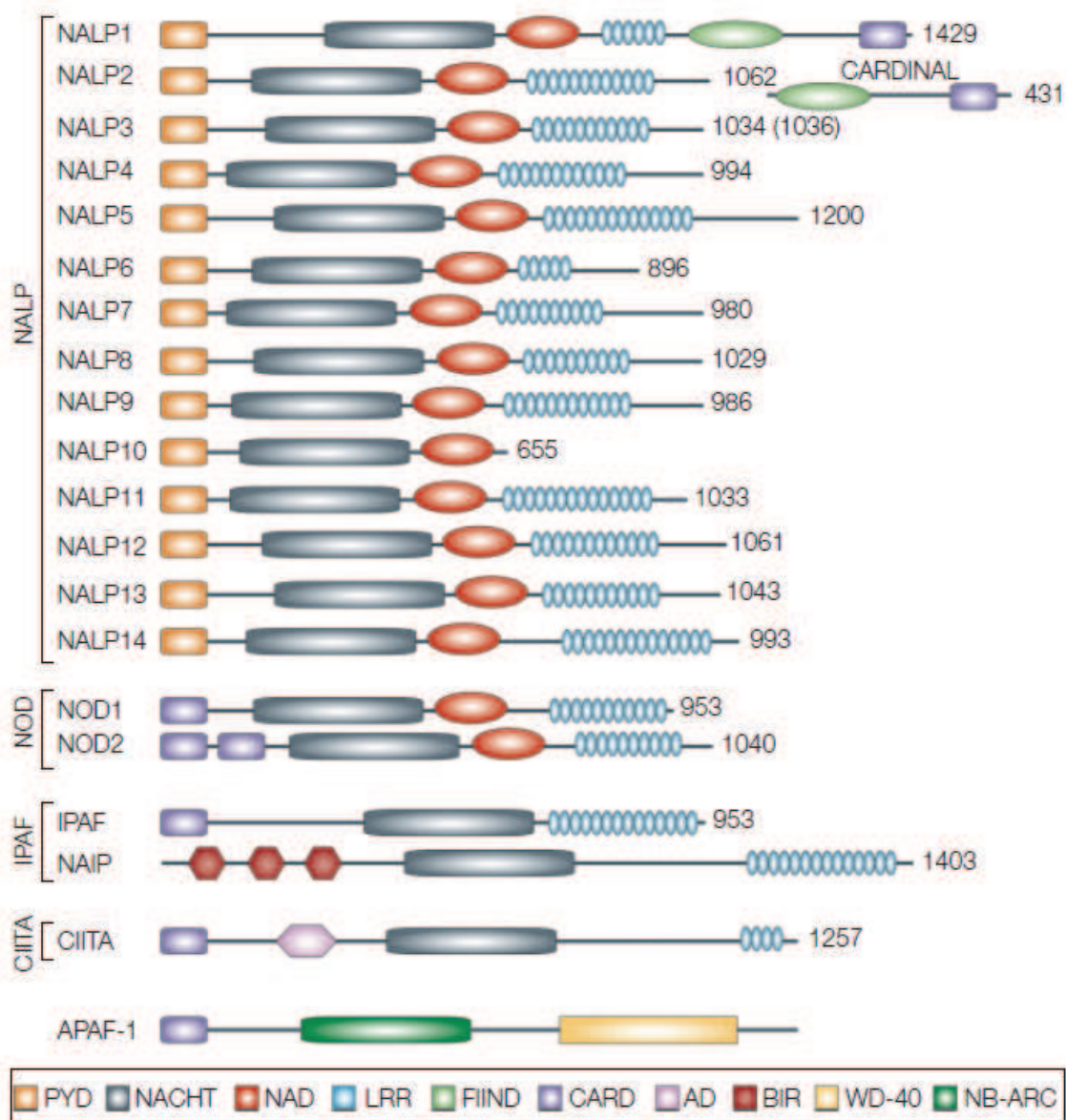


Figure 26 : Structure des NOD Like Recepteurs.

Représentation structurale des 4 familles principales composant les NLR. La structure d'APAF-1 est mise à titre comparatif ([Tschopp et al., 2003](#)).

Cependant parmi les NLR, les structures qui sont de plus en plus étudiées depuis leur découverte sont les inflammasomes (**Figure 27**). Découverts en 2002 par Jürg Tschopp, ([Martinon et al., 2002](#)) les inflammasomes sont des complexes protéiques qui sont constitutivement auto réprimés et qui une fois activés, s'oligomérisent pour former une structure circulaire capable d'activer des caspases. La famille des inflammasomes est constituée de récepteurs NLRP, de la molécule adaptatrice ASC, et de molécules effectrices ou caspase, le plus souvent la caspase 1 et 5. (**Figure 28**)

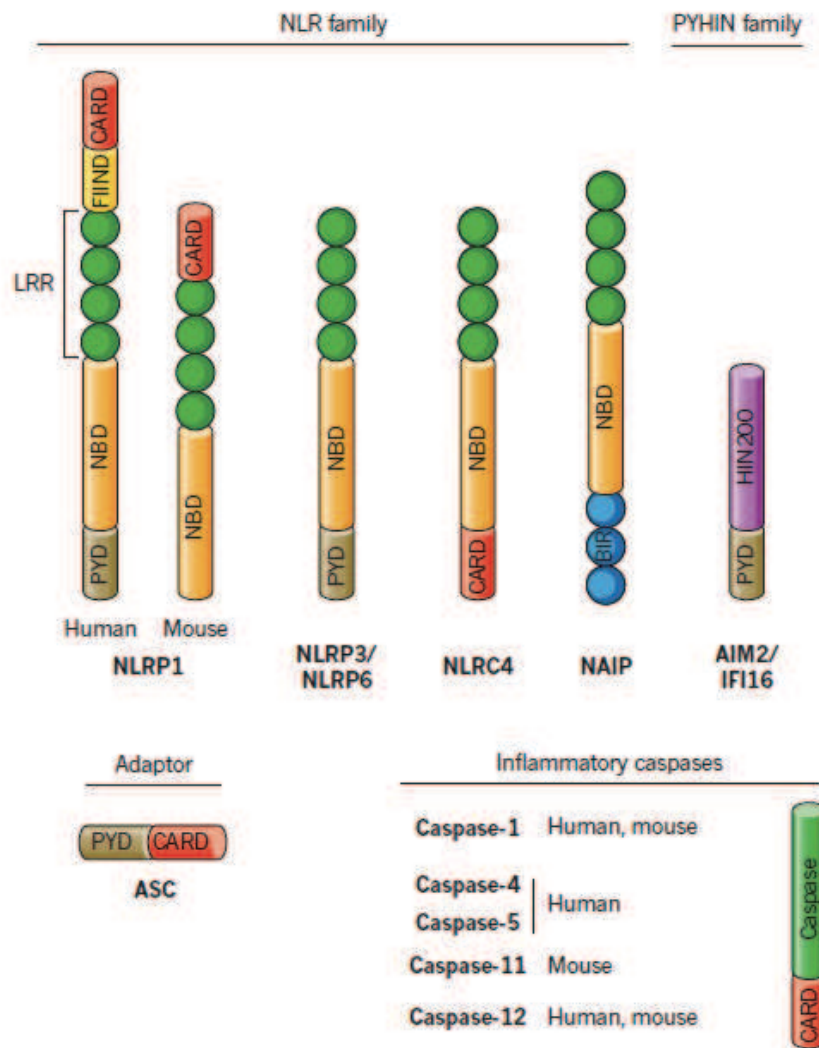


Figure 27 : Organisation des domaines constituant les NLR qui à leur tour peuvent constituer un inflammasome.

(Strowig et al., 2012)

De façon plus spécifique, les récepteurs NLRP pouvant former un inflammasome sont constitués d'un domaine « leucine rich repeat » (LRR), qui pourrait détecter les PAMP et les DAMP ; d'un domaine d'oligomérisation nommé « nucleotide binding domain » (NBD ou encore appelé NACHT) et d'un domaine d'interaction protéine/protéine qui peut être le domaine PYD uniquement ou le « caspase activation and recruitment domain » (CARD) (**Figure 27**).

Suite à la reconnaissance du DAMP ou du PAMP (**Figure 25**), le récepteur NLRP va s'activer et s'oligomériser pour induire la formation d'un inflammasome. Lors de l'oligomérisation, le domaine PYD du récepteur va interagir avec le domaine PYD de ASC. Enfin la partie CARD de ASC va interagir avec le domaine CARD de la procaspase 1. Une fois l'inflammasome formé celui-ci va permettre l'activation de l'IL-18 et de l'IL-1 β . (**Figure 28**)

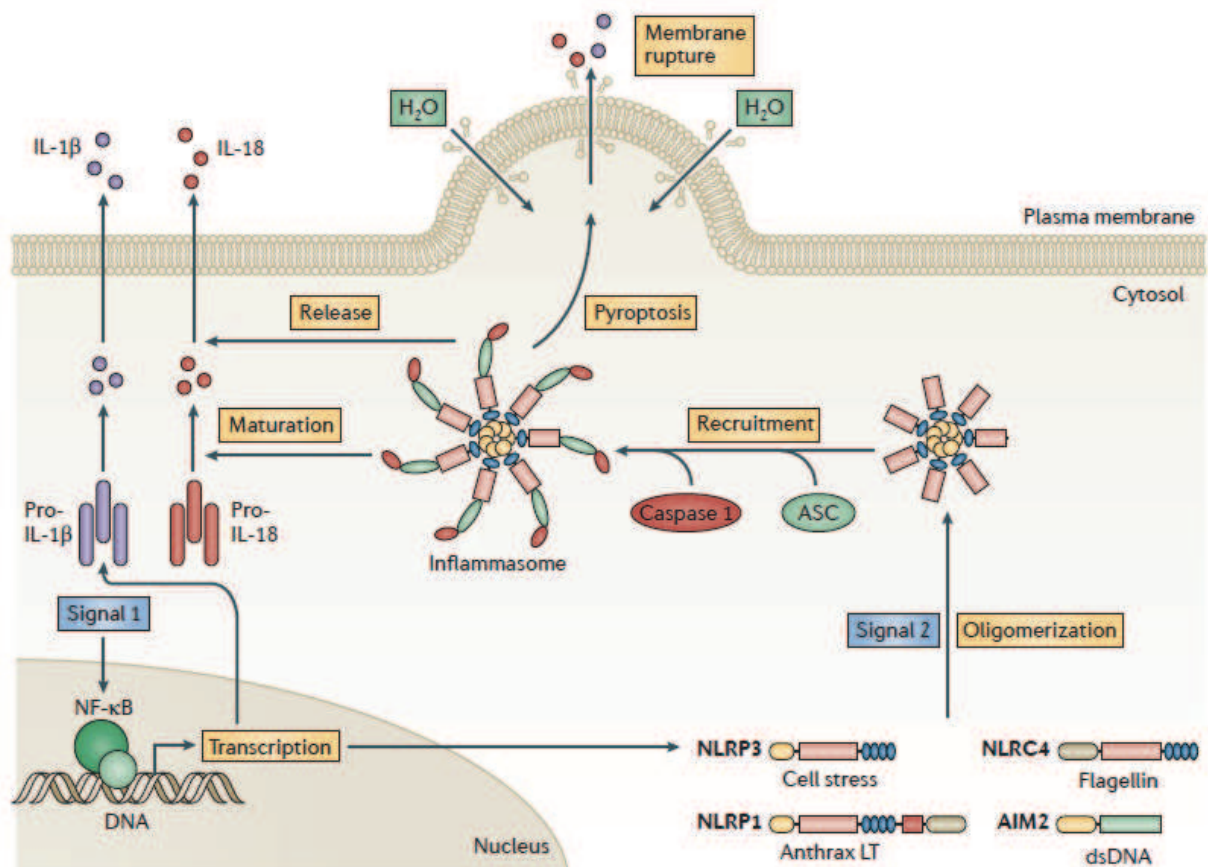


Figure 28 : Mécanisme d'activation des inflammasomes.

Après la reconnaissance des signaux des dangers par les NOD like récepteurs, ceux-ci s'activent et s'oligomérisent. Cette oligomérisation va donner naissance à une hyper structure : l'inflammasome. Lequel va induire l'activation de la caspase 1 et par clivage, transformer la pro IL-1 β et la pro IL-18 en IL-1 β et IL-18 mature ([Walsh et al., 2014](#)).

Parmi les récepteurs capables de former un inflammasome nous avons :

NLRP1 : Il possède un domaine NBD et un domaine LRR. Tandis que la forme humaine de cet inflammasome possède à la fois le domaine CARD et un domaine PYD qui va interagir avec le domaine PYD de la molécule adaptatrice ASC, chez la souris en revanche le domaine PYD est absent (**Figure 27**). NLRP1 ne possède pas les mêmes activateurs selon qu'il soit d'origine humaine ou murine. En effet, NLRP1 est activé chez l'homme par le muramyl dipeptide, alors que chez la souris NLRP1 peut être activé par la toxine létale de l'anthrax. L'inflammasome NLRP1 est impliqué dans les mécanismes suivants :

- Dans la pyroptose dépendante du clivage de l'IL-1 β et de l'IL-18 par l'activation de la caspase-1, ceci étant provoqué par la toxine létale de l'anthrax ([Fink et al., 2008](#)). La pyroptose est une voie de mort cellulaire proinflammatoire induite par l'activation de la caspase-1 qui va permettre la libération de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-18 et l'IL-1 β ; cette activation de la caspase-1 se fait par le biais de l'activation de l'inflammasome NLRP1. Cette sur activation va entraîner une lyse cellulaire entraînant la libération du contenu intracellulaire dans la matrice extra cellulaire.
- Chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer à plaques de β -amyloïde, où il est surexprimé. Il semble être impliqué dans l'activation des monocytes. Sa surexpression ainsi que celle de NLRP3, sont directement corrélées à la production d'IL-1 β et d'IL-18 ([Saresella et al., 2016](#)).

- Suite à un trauma majeur, la capacité des monocytes à produire de l'IL-1 β est fortement réduite ce qui *de facto* induit une baisse de la capacité du système immunitaire à répondre à une attaque pathogène. Il a été montré *in vitro* que la perte de fonction des monocytes est entièrement dépendante de l'inflammasome NLRP1, qui dans ce cas présenterait un défaut d'oligomérisation ([Relja et al., 2015](#)).
- Il a également été montré que l'activateur de facteur de transcription 4 (ATF4), pouvait induire l'expression de l'inflammasome NLRP1 lors d'un stress du réticulum endoplasmique. Ce qui impliquerait une régulation de l'inflammasome et donc de la réponse immunitaire par le réticulum endoplasmique ([D'Oswaldo et al., 2015](#)).

NLRP2 est un récepteur qui peut adopter la structure d'un inflammasome qui est très peu connu, on ne sait encore pas de façon claire ce qui l'active, ou ce qu'il induit au niveau pulmonaire. Il a néanmoins été montré en 2013 que les astrocytes humains exprimaient ce récepteur et qu'il induisait un inflammasome suite à la reconnaissance par le récepteur purinergique P2X7 de l'ATP comme signal de danger ([Minkiewicz et al., 2013](#)).

NLRC4 ; constitué d'un domaine NBD, LRR et du domaine CARD de ASC (**Figure 27**), cet inflammasome est activé notamment par la flagelline, lorsque celle-ci est reconnue par le récepteur NAIP (voir ci-dessous) ([Rathinam et al., 2012](#)) et les systèmes de sécrétions de type III et IV des bactéries. Il est connu pour être impliqué dans la réponse anti-virale et anti-bactérienne ([Aachoui and Miao, 2016](#)).

NAIP, contrairement aux autres inflammasomes, est constitué d'une partie NBD et LRR mais au lieu d'avoir comme molécule adaptatrice ASC, il a une partie « baculovirus inhibitor of apoptosis repeat » (BIR) (**Figure 27**), activé par la flagelline ; cet inflammasome est mis en cause dans la réponse contre les bactéries ([Aachoui and Miao, 2016](#)).

AIM2 : très différent structuralement des autres inflammasomes, cet inflammasome possède la partie PYD de la molécule adaptatrice ASC et un domaine HIN200 (**Figure 27**). Il est activé par l'ADN cytoplasmique : (**Figure 25**) Il a été décrit comme pouvant inhiber l'autophagie et la production d'IFN- γ lors d'une infection à *Mycobacterium bovis* BCG ([Liu et al., 2016](#)).

NLRP3 est constitué, comme NLRP1 des domaines NBD et LRR, et possède aussi la partie PYD de la molécule adaptatrice ASC. L'ATP (via la fixation de l'ATP au récepteur purinergique P2X7), le taux de potassium, la nigéricine, les cristaux d'acides uriques, l'asbeste, les microparticules et les nanoparticules de silices, l'amyloïde, le poly IC et l'ARN double brin constituent des exemples non exhaustifs des activateurs de l'inflammasome NLRP3 (**Figure 29**) ([Martinon et al., 2006](#)) ([Petrilli et al., 2007](#)). Il est également établi que cet inflammasome permet l'activation de la caspase-1 qui va pouvoir cliver la pro IL-1 β immature en IL-1 β mature. La maturation de l'IL-1 β et de l'IL-18 entraîne alors de façon générale une aggravation de l'inflammation.

Il a récemment été montré que la molécule adaptatrice ASC pouvait s'agglomérer et former ce que l'on appelle des « ASC specks » ; ces particules sont actives et capables d'induire l'activation de l'IL-1 β indépendamment de l'inflammasome NLRP3 ([Franklin et al., 2014](#)).

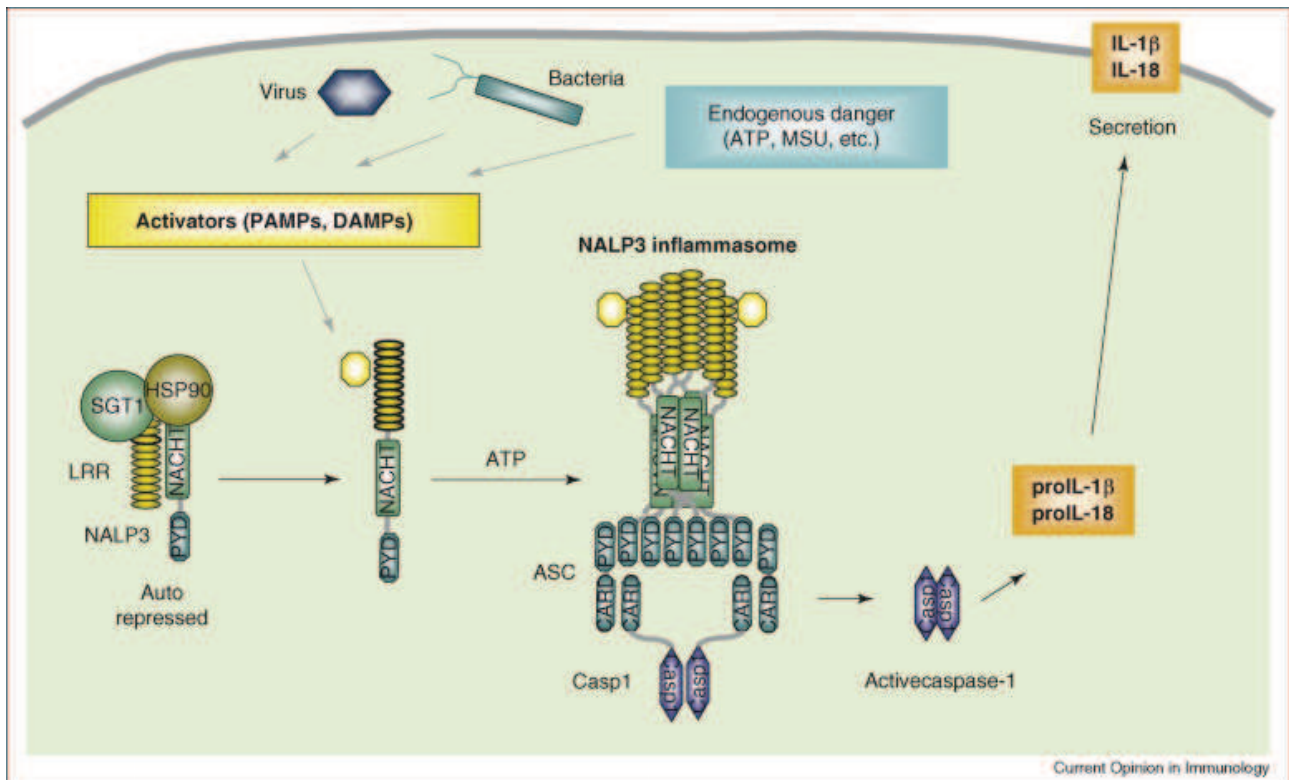


Figure 29 : Mécanisme d'activation de l'inflammasome NLRP3

NLRP3 est de façon constitutive auto-réprimé. A la reconnaissance de signaux de DAMP et PAMP, ce NLR va s'oligomériser et former un inflammasome. Cet inflammasome va activer la caspase 1 qui va être en mesure de cliver l'IL-1 β et l'IL-18 pour les rendre mature ([Pétrilli et al., 2007](#)).

L'inflammasome NLRP3 est également impliqué dans la différenciation des cellules Th2 en tant que facteur de transcription et donc de son rôle indépendant de la formation d'un inflammasome ([Bruchard et al., 2015](#)).

L'inflammasome NLRP3 est mis en cause dans un grand nombre de pathologies qui font intervenir la production d'IL-1 β et d'IL-18 dont :

- Les maladies auto-immunes : dans la sclérose en plaque, l'expression de NLRP3 est augmentée dans la corde spinale et via la production d'IL-1 β et d'IL-18, la migration des Th1 et des Th17 aggrave la pathologie ([Guo et al., 2015](#)).
- Les maladies du système nerveux central : dans la maladie d'Alzheimer par exemple, les plaques de peptides β amyloïdes activent l'inflammasome NLRP3 ce qui induit la production d'IL-1 β ([Halle et al., 2008](#)).
- Les maladies de la peau comme la dermatite atopique : l'expression de NLRP3 est réduite au niveau des lésions. Cela est dû à l'environnement cytokinique de type Th2 (IL-4, IL-5 et IL-13). De fait, la sécrétion d'IL-1 β chez les monocytes de patients atteints de dermatite atopique est diminuée ([Niebuhr et al., 2014](#)).
- Les maladies métaboliques : par exemple le diabète de type 2, où une forte production de TNF et d'IL-1 β semble provenir de la surexpression de NLRP3 sur les cellules myéloïdes des patients atteints de diabète de type 2 ([Lee et al., 2013](#)) ([Guo et al., 2015](#)).
- Le Cancer : l'inflammasome NLRP3 inhibe les métastases du cancer colorectal dans le foie en stimulant l'activité tumoricide des cellules NK ([Dupaul-Chicoine et al.](#)).

- La fibrose pulmonaire : lors de la mise en place de cette maladie et notamment suite aux agressions répétées de l'épithélium pulmonaire au début de la pathologie, une forte production au niveau pulmonaire d'IL-1 β est observée qui résulte de l'activation de l'inflammasome NLRP3. Cela exacerbe l'inflammation et la pathologie. ([Riteau et al., 2010b](#))

NLRP6 est un récepteur qui fait partie des NLR pouvant former un inflammasome. Bien que similaire à NLRP3, sa structure diffère par sa partie LRR qui est plus courte que celle de NLRP3 (**Figure 30**) ([Tschopp et al., 2003](#)).

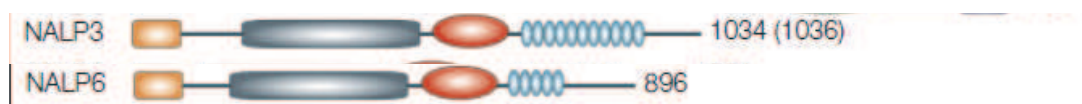


Figure 30 : Différences entre l'inflammasome NLRP3 et NLRP6.

NLRP3 et NLRP6 diffèrent par leur région LRR. En effet, celle de NLRP6 est plus courte que celle de NLRP3. Figure modifiée à partir de ([Tschopp et al., 2003](#)).

Encore méconnu NLRP6 fait l'objet de recherches intenses dans le domaine de l'immunologie. En effet, tout comme NLRP2, nous connaissons peu les activateurs de NLRP6, la structure qu'il adopte et sa fonction. La littérature fait état de l'expression de NLRP6 dans un grand nombre de types cellulaires tels que les cellules dendritiques, les cellules T CD4 et CD8, les macrophages, les cellules épithéliales de l'intestin et dans les cellules mononucléées humaines du sang périphérique ([Anand et al., 2012](#)) ([Chen et al., 2011](#)) ([Normand et al., 2011a](#)) ([Meixenberger et al., 2010](#)).

Le récepteur NLRP6 est capable à la fois d'adopter la forme d'un inflammasome, mais aussi d'activer et de réguler des mécanismes indépendants de la formation de l'inflammasome. Par exemple, relié par leur domaine PYD, NLRP6 a été identifié dans le cytoplasme comme étant capable d'interagir avec les « ASC specks » permettant ainsi activer NF- κ B. ([Grenier et al., 2002](#)). NLRP6 peut également agir indépendamment de la formation d'un inflammasome en permettant la cicatrisation nerveuse suite à un dommage ([Ydens et al., 2015](#)). De la même manière, une infection par *Listéria monocytogenes* n'implique pas l'action de l'inflammasome NLRP6. La production d'IL-1 β des cellules mononucléaires du sang périphérique humain dépend donc de NLRP3 et de la listeriolysin O ([Meixenberger et al., 2010](#)).

L'inhibition de la clairance bactérienne au sein de l'intestin est aussi un mécanisme régulé par NLRP6. La voie mise en jeu est elle aussi totalement indépendante de l'inflammasome. En effet, NLRP6 va inhiber la voie canonique de NF- κ B et la voie des MAP kinases, empêchant ainsi le recrutement de monocytes et de neutrophile. La clairance bactérienne se trouve alors bloquée. Cela est utile à l'organisme pour éviter une inflammation chronique qui serait médiée par la flore commensale. (**Figure 31**)

NLRP6 est impliqué dans divers mécanismes de défense et plusieurs articles publiés par Richard Flavell et d'autres sur le rôle de NLRP6 dans l'intestin, aident à mieux appréhender le rôle de ce récepteur :

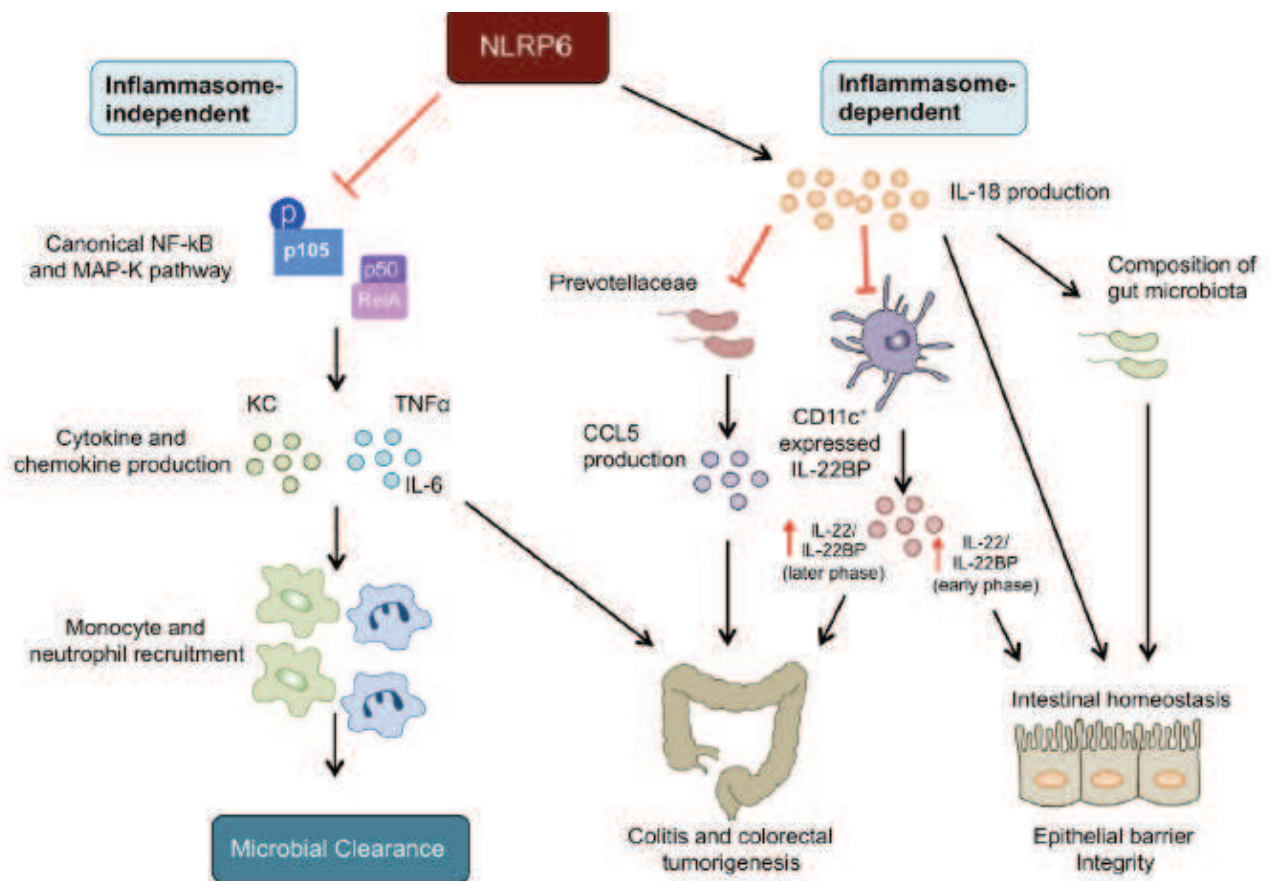


Figure 31 : Régulation par NLRP6 de façon inflammasome dépendant et inflammasome indépendant de : la clairance microbienne, la colite, la tumorigenèse et l'intégrité de la barrière épithéliale.

NLRP6 inhibe de façon indépendante de l'inflammasome la clairance microbienne, la colite et la tumorigenèse colorectale. NLRP6 contrôle également de façon dépendante de l'inflammasome, la colite, la tumorigenèse colorectale et la composition de la flore intestinale, ce qui influe sur l'intégrité de la barrière épithéliale. ([Anand and Kanneganti, 2013](#))

Il a été montré dans un contexte de maladie intestinale que l'activation de NLRP6 induisait la production d'IL-18, cette dernière ayant un effet protecteur (**Figure 32**). Un papier de juin 2016 paru dans *Mucosal immunology* montre que NLRP6 exprimé par les monocytes inflammatoires serait suffisant pour induire cette protection ([Seregin et al., 2016](#)).

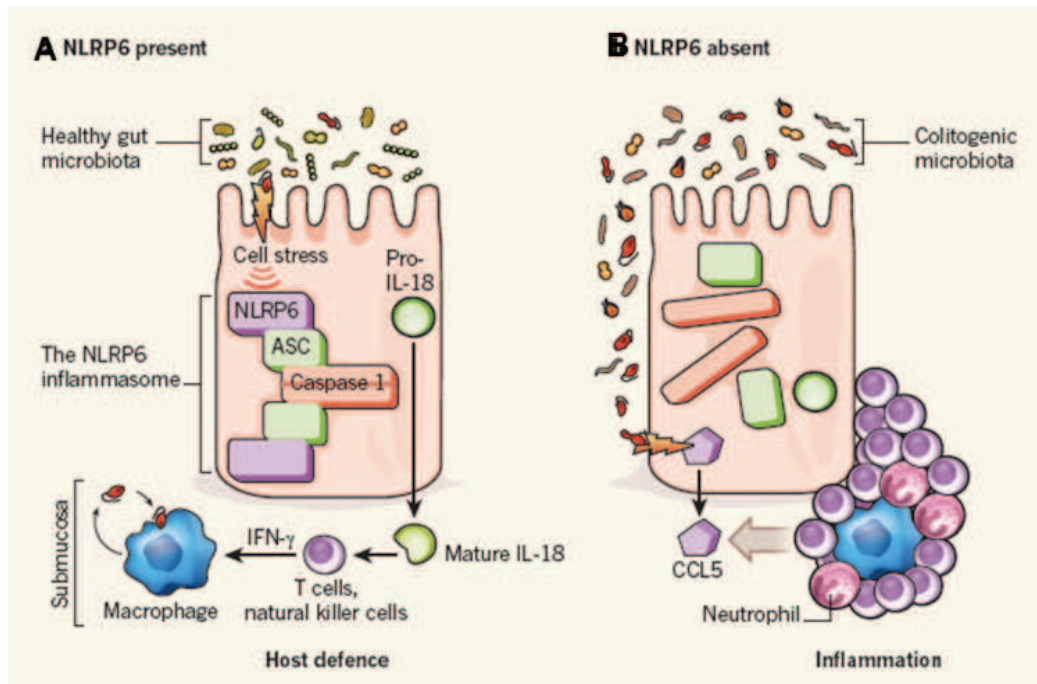


Figure 32 : Inflammasome NLRP6, gardien de l'homéostasie intestinale.

A) A l'état basal, avec un microbiote intestinal normal, NLRP6 permet la production d'IL-18 qui est impliqué dans l'intégrité de l'épithélium intestinal et le maintien d'un microbiote intestinal adéquat. B) Sans NLRP6 il y a le développement d'un microbiote colitogénique, qui crée une disruption de la barrière intestinale et les bactéries induisent le recrutement de cellules pro-inflammatoires et la production de CCL5 et d'autres cytokines pro-inflammatoires ([van Lookeren Campagne and Dixit, 2011](#)).

NLRP6 permet le maintien de l'homéostasie intestinale et le maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale. Cette voie est dépendante de l'inflammasome. En effet NLRP6 va former un inflammasome et induire la production d'IL-18 ; et inhiber l'IL-22BP ce qui va permettre à l'IL22 d'agir et de permettre la réparation de l'épithélium. (**Figure 33**)

NLRP6 est aussi capable d'inhiber le développement de tumeurs et de colites colorectales. Cet aspect est également dépendant de l'inflammasome, car NLRP6 va induire la production d'IL-18 et empêcher le développement de la bactérie *Prevotellaceae* ce qui va bloquer la production par cette bactérie de CCL5, ainsi que la production d'IL-22BP (**Figure 33**). Cette modification de la flore intestinale chez les souris déficientes pour NLRP6 est transmissible aux souris par les fèces.

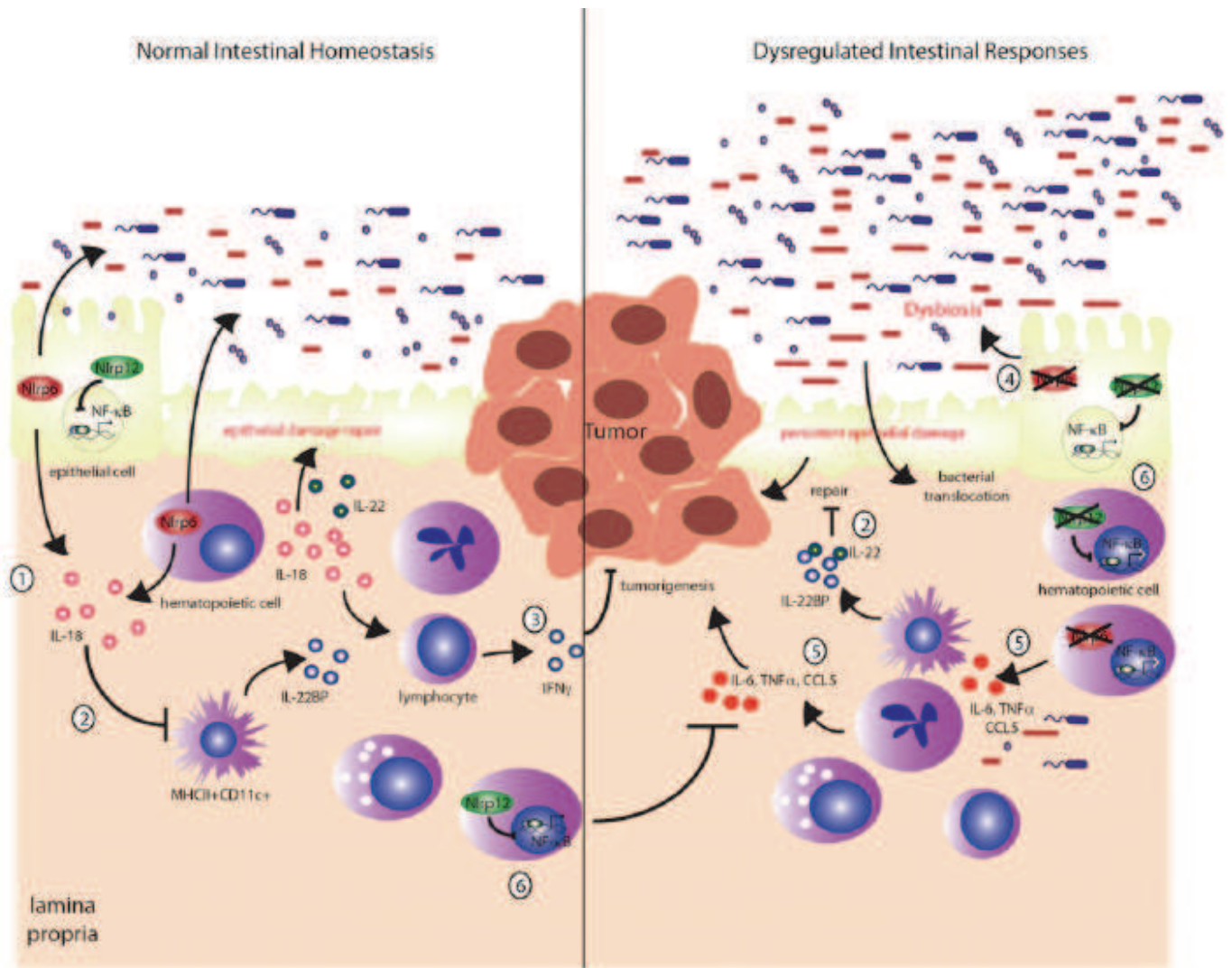


Figure 33 : De multiples mécanismes impliqués dans la suppression de l'inflammation et de la tumorigenèse via NLRP6.

1) NLRP6 régule la production d'IL-18 ce qui permet le maintien d'un microbiote intestinal correcte et promeut la réparation de l'épithélium. 2) L'IL-18 induit également la répression de l'IL-22BP. Ce qui permet à l'IL-22 de participer à la prolifération des cellules épithéliales et à la réparation de l'épithélium. 3) l'IL-18 induit favorise la production de l'interféron gamma ce qui permet de mettre en place une réponse antitumorale. En absence de NLRP6 il y a une dysbiose au niveau du microbiote intestinal. 4) ce qui induit l'accumulation de bactéries colitogéniques. 5) cela induit la sécrétions de facteurs proinflammatoires comme CCL5 ce qui induit une inflammation et le développement de tumeur. 6 NLRP12 bloque l'activation de NF-kB ce qui contribue à favoriser la tumorigenèse ([Chen, 2014](#)).

NLRP6 régule aussi la sécrétion de mucus par les cellules caliciformes dans l'intestin, permettant ainsi de réguler le microbiote intestinal. (**Figure 34**) ([Wlodarska et al., 2014a](#))

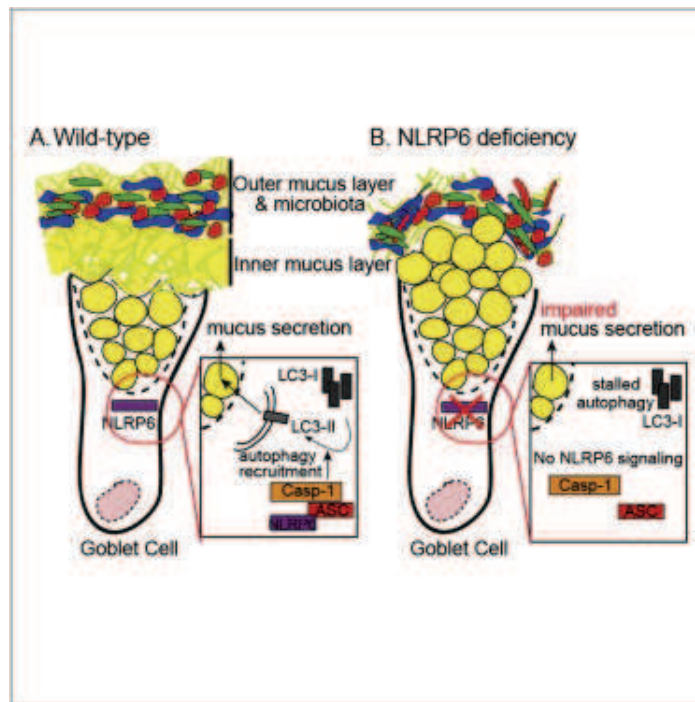


Figure 34 : Production de mucus par les cellules caliciformes de l'intestin dépendante de NLRP6.

NLRP6 permet l'exocytose des granules des mucines. En l'absence de NLRP6 l'autophagie des cellules caliciformes est compromise, étant incapable d'excréter le mucus ([Wlodarska et al., 2014a](#)).

Les métabolites produits par le microbiote intestinal comme la taurine, l'histamine et la spermine, qui régulent le microbiote intestinal (la taurine active NLRP6, tandis que la spermine et l'histamine l'inhibe) sont désormais connus pour activer NLRP6, qui lui-même régule la production d'IL-18 et de peptides antimicrobiens ([Levy et al., 2015](#)).

NLRP6 est aussi impliqué dans la réponse antivirale. C'est en se fixant à l'ARN viral par l'ARN hélicase Dhx15 et en induisant la production d'interférons de types I et III que NLRP6 a été identifié comme pouvant aussi réguler la réponse innée, en réponse à une infection virale. Dans ce cas, le récepteur NLRP6 agit indépendamment de la formation d'un inflammasome mais par son interaction avec la « mitochondrial antiviral-signaling protein » (MAVS) ([Wang et al., 2015a](#)).

Il faut noter que jusqu'à aujourd'hui, aucune étude n'a encore été publiée concernant le rôle de NLRP6 dans l'inflammation pulmonaire.

1.4.2 Le système immunitaire adaptatif

Le système immunitaire adaptatif constitue la deuxième phase de réponse de notre organisme face à une attaque pathogène. Cette réponse se fait plus tardivement que la réponse immunitaire innée, et se caractérise par la mise en place d'une mémoire immunitaire médiée par les anticorps, les cellules T et les cellules B.

1.4.2.1 Les cellules T

Les précurseurs des cellules T se trouvent dans la moelle osseuse et vont se différencier en trois grandes familles de cellules lymphocytaires : les lymphocytes B, les cellules « natural killer » (NK) et les lymphocytes T.

Tandis que les lymphocytes B vont se différencier dans la moelle osseuse, les lymphocytes T poursuivent leur différenciation dans le thymus. Les lymphocytes sont nichés la plupart du temps dans les organes lymphoïdes secondaires comme les ganglions et la rate.

La réponse adaptative du système immunitaire est déclenchée dès lors que les cellules présentatrices d'antigène (CPA) vont présenter les antigènes via le CMH I ou II aux lymphocytes T. Les cellules T qui auront reconnu l'antigène par le CMH I sont des lymphocytes T CD8. Ces cellules ont des propriétés cytotoxiques, elles détruisent les cellules qu'elles reconnaissent.

Les cellules qui en revanche reconnaissent l'antigène par le CMH II, sont des lymphocytes T CD4.

Dans le cas où les lymphocytes ne reconnaissent ni le CMH I, ni celui de classe II, ils entrent en apoptose (**Figure 35**) ([Janeway et al., 2001](#)).

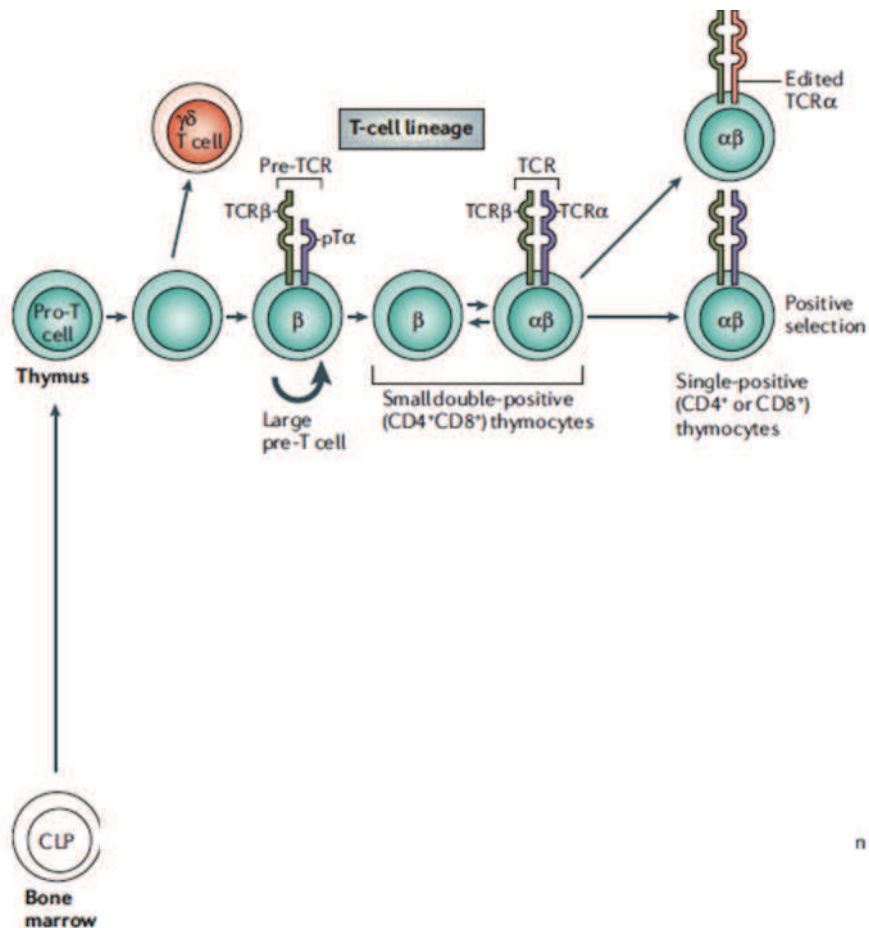


Figure 35 : Développement des cellules T.

Les cellules T se développent à partir de progéniteurs lymphoïdes qui sont contenus dans la moelle osseuse. Le développement se poursuit dans le thymus pour donner naissance à deux populations principales : les lymphocytes T CD4 et CD8, caractérisés la présence du TCR. Figure modifiée à partir de ([Nemazee, 2006](#)).

Selon l'action des cytokines les lymphocytes T CD4 sont capables de se différencier en plusieurs types de cellules T et ainsi orienter la réponse immune (**Figure 36**) :

- En présence d'IL-12 il va y avoir une activation des facteurs de transcriptions TAT4 et T-bet, ce qui va induire la différenciation des cellules en cellules de type Th1. Ces cellules vont avoir pour particularité de sécréter de l'IFN-γ. Elles entrent en jeu lors de l'immunité cellulaire et nous protègent des pathogènes intracellulaires.

- L'IL-4 va activer les facteurs de transcriptions STAT6 et GATA3, induisant la différenciation des cellules en lymphocytes de type Th2. Ces cellules sont mises en jeu dans l'immunité humorale et servent à nous protéger contre des pathogènes extracellulaires. Ces cellules produisent des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13 dans les cas d'asthme allergique.
- En présence d'IL-6, d'IL-21, d'IL-23 ou de TGF β , les facteurs STAT3, ROR γ t et ROR α vont s'activer et faire évoluer les cellules vers des lymphocytes Th17. Mises en cause dans l'inflammation tissulaire, l'auto-immunité et la protection contre les pathogènes extracellulaires, ces cellules vont produire des cytokines comme l'IL-17, l'IL-17F, l'IL-22 et l'IL-21 pour protéger l'organisme.
- En présence d'IL-2 et du facteur de croissance transformant (TGF β), STAT5 et FOXP3 vont s'activer et induire la différenciation des cellules en lymphocytes Treg. Ces cellules servent à mettre en place une tolérance, et/ou une immunosuppression afin de réduire une réaction immunitaire inflammatoire trop forte ou encore d'empêcher la réaction inflammatoire d'avoir lieu. Pour se faire, ces cellules vont produire de l'IL-10 et du TGF β .

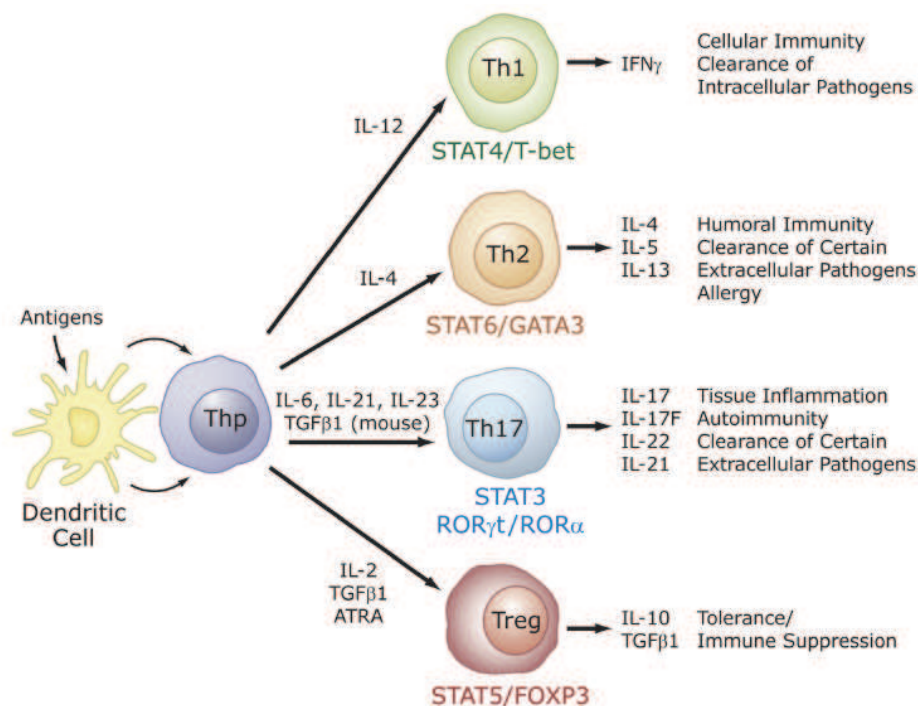


Figure 36 : Différenciation des lymphocytes TCD4 en Th1, Th2, Th17 ou Treg.

La différenciation des lymphocytes TCD4 est principalement orchestrée par l'environnement cytokinique, où chaque cytokine induit une différenciation particulière. Ce processus influence l'orientation de la réponse immune face à une attaque qui a été subie par le système immunitaire ([Jetten, 2009](#)).

La mise en évidence de « bronchus associated lymphoid tissue » (BALT) dans la BPCO, montre l'importance que peuvent avoir les lymphocytes dans cette pathologie. Il a aussi été constaté que les lymphocytes pulmonaires qui étaient isolés chez les patients emphysémateux, étaient souvent activés et qu'ils étaient en mesure de sécréter des cytokines qui entraient en jeu dans la maladie ([Hogg et al., 2004](#)).

Il a aussi été montré qu'il y avait une augmentation du taux de lymphocytes T CD8 et T CD4, que ceux-ci étaient activés et que leur nombre était corrélé à la sévérité de la maladie ([Gadgil and Duncan, 2008](#)).

De récentes études ont également montré l'importance des cellules NKT dans la BPCO. Ainsi lorsqu'un agoniste des NKT (α Gal-Cer) a été instillé aux souris, celles-ci développaient un emphysème pulmonaire avec une importante production de lymphocytes T CD8 et de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 et le TNF- α ([Tsao et al., 2016](#)).

Concernant les lymphocytes Treg, certaines études ont, soit montré qu'ils étaient également recrutés lors de la BPCO, mais étaient inactifs, soit que leur nombre diminuait avec l'installation de la BPCO ([Kalathil et al., 2014](#)).

L'implication des Th17 a aussi été mise en évidence car chez les patients atteints de BPCO, une importante quantité d'IL-17 est dosée dans le lavage broncho-alvéolaire des patients. Cette cytokine induit alors l'exacerbation de la maladie ([Di Stefano et al., 2009](#)).

Ces cellules sont aussi importantes dans des cas de fibrose pulmonaire, où la présence d'IL-17 sécrété par les Th17 dans le lavage bronchoalvéolaire est corrélée au nombre de neutrophiles dans ce même lavage. Les Th17 attirent donc les neutrophiles qui vont produire encore plus d'IL-17. Tout ceci conduit à l'exacerbation de l'inflammation ([Wilson et al., 2010](#)).

1.4.2.2 Les cellules B

Les lymphocytes B sont ces cellules qui sont activées par un contact direct avec les lymphocytes T CD4 ou alors par une liaison directe des antigènes sur le lymphocyte B. Une fois activées, ces cellules vont pouvoir induire la production d'anticorps spécifiques de l'antigène pour en venir à bout.

Ces anticorps spécifiques peuvent également entrer dans la constitution de complexes immuns, complexe regroupant l'antigène recouvert d'anticorps qui va pouvoir être éliminé par la voie du complément par exemple.

Les lymphocytes B sont aussi à l'origine de la mémoire immunitaire. Cette mémoire va permettre à l'organisme de toujours garder un stock d'anticorps spécifiques contre les antigènes déjà rencontrés. De sorte que si nous les rencontrons une nouvelle fois, la réponse adaptative puisse se faire plus rapidement et détruire l'antigène (**Figure 37**) ([Janeway et al., 2001](#)).

Les lymphocytes B interviennent dans la fibrose pulmonaire idiopathique.

J'ai participé à l'étude du laboratoire montrant le rôle de BAFF produit par les neutrophiles dans la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine chez la souris. Ce travail montre que BAFF active les cellules B et stimule la production d'IL-17 et d'IL-1 β , créant ainsi une boucle d'auto-amplification qui aggrave la fibrose pulmonaire ([Francois et al., 2015](#)).

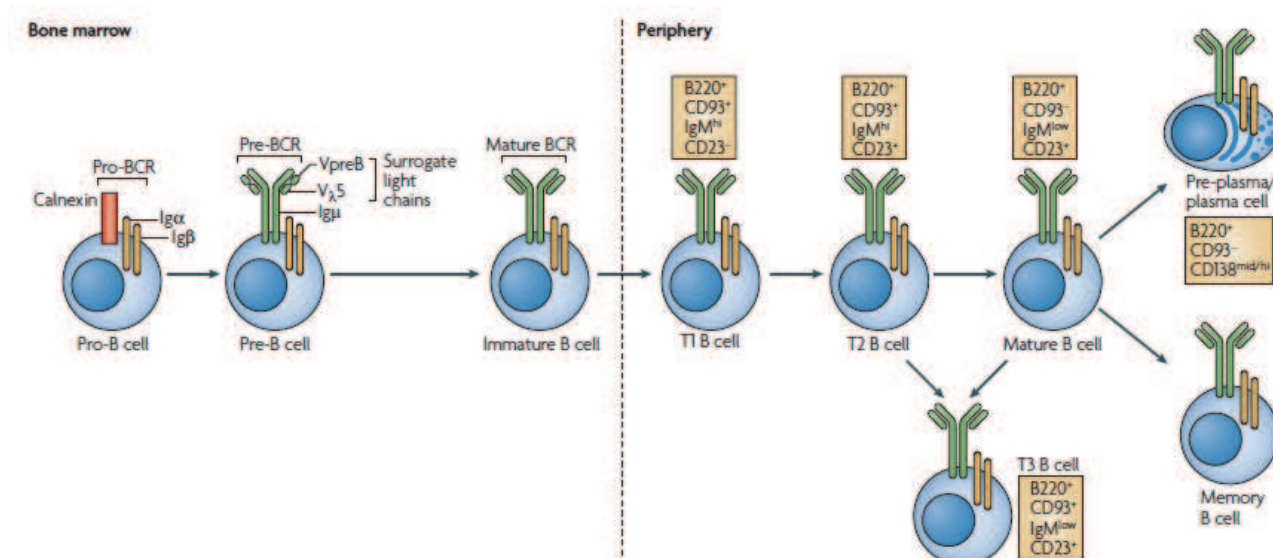


Figure 37 : Stades de développement des lymphocytes B.

Dans la moelle osseuse le développement des cellules B se fait à partir de progéniteurs lymphoïdes. Ceux-ci vont se différencier jusqu'à atteindre le stade de cellule B immature ou cette dernière va pouvoir migrer vers la périphérie et continuer sa différenciation jusqu'à donner des cellules B mémoires ou des cellules plasmacitoïdes immatures. Figure modifiée à partir de ([Nemazee, 2006](#)).

1.5 Objectifs de la thèse

Au cours de cette thèse deux axes ont pu être abordés. Le premier axe met en évidence deux objectifs d'études. En effet, l'un des objectifs de ce travail est de comprendre le(s) mécanisme(s) mis en jeu dans l'inflammation pulmonaire médiée par les nanoparticules.

Ce travail a pour but d'étudier les effets néfastes que peuvent avoir les nanoparticules de silices sur les poumons, et plus particulièrement le rôle de l'axe IL-33/ST2 dans l'inflammation. Mieux comprendre la mécanistique de cette phase précoce pourrait permettre de trouver un moyen de pouvoir réguler cette inflammation et ainsi empêcher en amont l'établissement de la fibrose pulmonaire. Le deuxième aspect de cet axe est d'étudier l'inflammation pulmonaire médiée par la bléomycine à l'aide à la fois d'analyses post mortem mais également d'un suivi des mêmes souris afin de pouvoir associer l'évolution de la fibrose à des différences structurales observées à l'IRM. Permettant ainsi l'étude du rôle de l'axe IL-33/ST2 dans l'inflammation pulmonaire dans un autre modèle inflammatoire afin de pouvoir éventuellement comprendre d'avantage le rôle que peut jouer l'IL-33 et ainsi, agir sur l'inflammation avant l'établissement de la fibrose.

Enfin le deuxième axe d'étude abordé au cours de ma thèse, est l'étude de l'inflammasome NLRP6 dans l'inflammation pulmonaire médiée par la fumée de cigarette. En effet il existe très peu de données dans la littérature sur la phase aigüe de la BPCO ; et il n'existe à ce jour aucune donnée sur NLRP6 dans les poumons. L'implication éventuelle de NLRP6 dans la mise en place de la BPCO pourrait constituer soit une nouvelle cible thérapeutique, soit un biomarqueur très intéressant dans la mesure où un diagnostic précoce de la BPCO est impossible encore aujourd'hui du fait du manque cruel de connaissances sur cette pathologie.

Résultats

1.1 L'IL-33 intracellulaire contenu dans les macrophages permet l'exacerbation de l'inflammation pulmonaire médiée par les nanoparticules de silices

Il a été montré chez l'homme que les microparticules de silice pouvaient entraîner une inflammation pulmonaire et une fibrose pulmonaire ([Aghilinejad et al., 2012](#)).

Nous sommes soumis de façon quotidienne aux nanoparticules de silice (pouvant faire entre 10 et 20nm de diamètre) qui sont présentes entre autres dans la crème solaire, la nourriture, l'eau. De par leurs propriétés, celles-ci peuvent atteindre un grand nombre d'organes via la circulation sanguine. Elles peuvent également une fois inhalées, se retrouver dans les poumons (alvéoles pulmonaires par exemple) ([Oberdorster et al., 2005](#)).

Ces nanoparticules sont, par définition, plus réactives que les microparticules ; ainsi, il est fondamental de déterminer si les nanoparticules sont également capables de provoquer une inflammation pulmonaire et quels peuvent être les mécanismes mis en jeu lors de cette inflammation.

Durant la phase inflammatoire, le laboratoire a déjà montré que l'instillation de nanoparticules de titane à des souris C57Bl/6 (WT), provoque dès 24h une inflammation pulmonaire. Ces nanoparticules induisent l'activation de l'inflammasome NLRP3, lequel va activer à son tour la caspase 1 et induire la maturation et la sécrétion de l'IL-1 β ([Yazdi et al., 2010](#)). *In vitro* nous avons montré que les macrophages stimulés par les nanoparticules de titane ou de silice provoquent la sortie d'ATP qui une fois fixé à son récepteur P2X7, induit l'activation de l'inflammasome NLRP3 et donc l'activation par clivage, de l'IL-1 β ([Baron et al., 2015](#)).

Tout comme l'IL-1 β , l'IL-33 est très fortement exprimée et produite suite à l'inflammation pulmonaire induite par les nanoparticules. Cette cytokine est impliquée dans de nombreuses pathologies notamment dans l'asthme allergique et est connue pour ces propriétés pro-inflammatoires. Ces résultats préliminaires qui faisaient état de la forte expression d'IL-33 dans les poumons après instillation de nanoparticules a poussé l'équipe à étudier le rôle de cette cytokine dans l'établissement de la réponse inflammatoire pulmonaire, et quels pouvaient être les mécanismes mis en jeu.

Suite à l'instillation de nanoparticules de silice à des souris WT, une production importante d'IL-33 est certes induite dans les poumons, mais pas de sécrétion. Le blocage de l'IL-33 extracellulaire avec du ST2 soluble, un anticorps anti-ST2 et un anticorps anti-IL-33, ne modifie pas la réponse inflammatoire induite par les nanoparticules de silice. De plus, en instillant de l'IL-33 recombinant nous constatons un effet dépendant de ST2 qui est totalement différent de celui constaté avec les nanoparticules de silice.

Dans le but de comprendre le rôle de l'IL-33 dans cette inflammation pulmonaire provoquée par les nanoparticules de silice, nous avons instillé ces nanoparticules à des souris déficientes pour le récepteur à l'IL-33, ST2 (ST2^{-/-}). Nos résultats indiquent que ces souris présentent une exacerbation de l'inflammation pulmonaire par rapport aux souris de type sauvage (WT). Il apparaît donc que l'IL-33, aurait un effet pro-inflammatoire, qui serait dépendant de ST2 et que cette action serait exclusivement intracellulaire.

Il existe différentes formes de l'IL-33 selon les différents clivages que peut subir la cytokine ([Cayrol and Girard, 2014](#)). Dans nos conditions, nous constatons que l'IL-33 produite suite à l'instillation des nanoparticules de silice est présente sous forme entière, mais également que deux formes clivées sont présentes. Dans le but d'identifier les protéases responsables du clivage de l'IL-33 dans notre modèle, nous avons utilisé des souris transgéniques pour l'élafine (Elafin Tg),

exprimant un peptide humain capable d'inhiber l'action de la neutrophile élastase et de la protéinase 3 ([Sallenave et al., 2003b](#)). Les souris Elafin Tg instillées avec des nanoparticules de silice, présentent une inflammation pulmonaire réduite par rapport aux souris WT. Nous notons également une diminution de la forme entière de l'IL-33. Nous ne pouvons donc par conséquent pas conclure sur un défaut de clivage éventuel généré par ces deux protéases. Par contre, elles semblent jouer un rôle très important dans l'inflammation médiée par les nanoparticules.

Nos résultats montrent que les nanoparticules induisent de façon spécifique le recrutement nucléaire d'une forme clivée de l'IL-33, tandis que dans le cytoplasme aussi bien la forme entière que les formes clivées sont observées. Les macrophages présentent une activité « tryptase like » augmentée après stimulation par les nanoparticules, activité qui pourrait être à l'origine du clivage de l'IL-33 au niveau intracellulaire. De plus, nous constatons que la forme clivée de l'IL-33 présente dans le noyau aurait des partenaires nucléaires, suggérant que cette cytokine pourrait jouer un rôle dans la transcription de gènes impliqués dans l'inflammation. Enfin, la co-localisation intracellulaire de ST2 avec l'IL-33 semble suggérer une régulation interne de l'action de l'IL-33.

Nous avons donc montré dans cet article, l'importance de l'IL-33 en réponse aux nanoparticules, en mettant en évidence pour la première fois à notre connaissance, une activité intracellulaire de cette cytokine au niveau des macrophages et notamment au niveau nucléaire.

Nous montrons également qu'une forme clivée de l'IL-33, présente dans le cytoplasme des macrophages, et résultant probablement d'une activité « tryptase like », est recrutée au sein du noyau.

Enfin, nos travaux suggèrent une activité pro-inflammatoire de l'IL-33 nucléaire qui serait augmentée chez les souris ST2^{-/-}. En effet, l'absence de ST2 cytoplasmique entrainerait une libération d'IL-33 qui pourrait alors être clivée et transloquée dans le noyau, augmentant ainsi la transcription de gènes pro-inflammatoires. En ce sens, nous avons également identifiés de potentiels partenaires nucléaires de l'IL-33 qui pourraient jouer un rôle dans la transcription de gènes proinflammatoires.

L'article ci-dessous a été soumis à JEM en Sept 2016.

Nuclear IL-33 promotes nanoparticles-induced pulmonary inflammation in absence of the IL-33 receptor ST2

Manoussa Fanny^{1*}, Ludivine Baron^{1*}, Fabien Bastaert², Marc Le Bert¹, Valérie Quesniaux¹, François Erard¹, Jean-Michel Sallenave², Bernard Ryffel¹, Aurélie Gombault¹, Isabelle Couillin¹

University of Orleans and CNRS, UMR7355, Orleans, France¹
INSERM, UMR1152; Laboratoire d'Excellence Inflamex, Département Hospitalo-Universitaire FIRE (Fibrosis, Inflammation and Remodeling), University Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France²

* These authors contributed equally to this work.

Grant support by the French «Région Centre », « Conseil Général du Loiret » and «Fonds de Dotation pour la Recherche en Santé Respiratoire» (France)».

Key words: Nanoparticles, Inflammation, Lungs, ST2, IL-33

Running Title: ST2-dependent regulation of intracellular IL-33 pro-inflammatory effect

Address of correspondence to Isabelle Couillin[¶], Experimental and Molecular Immunology and Neurogenetics, UMR7355, 3B rue de la Férollerie 45071 Orleans, France. Phone: 0033 238 25 54 43 Fax: 0033 238 25 79 79.

E-mail: couillin@cnrs-orleans.fr

Abbreviations used in this paper: ST2: Suppression of Tumorigenicity 2; IL-33, Interleukin-33; nanoTiO₂, nanoSiO₂; Th2, T helper type 2; sST2, soluble ST2;

Abstract

IL-33 is a member of the IL-1 cytokine family with dual functions, acting either as a classical cytokine via interaction with the membrane ST2 receptor complex promoting inflammation or as nuclear transcriptional regulator, which is poorly understood. IL-33 bioactivity is regulated by proteases produced by neutrophils, macrophages or mast cells. Professional silica oxide nanoparticles (nano-SiO₂) exposure causes respiratory diseases and we asked the role of IL-33 in pulmonary inflammation to nano-SiO₂ in mice. We report here that mice deficient for the receptor of IL-33, ST2, presented exacerbated inflammatory responses to airway nano-SiO₂ associated with increased expression of full-length and generation of cleaved IL-33 forms in lung. Extracellular IL-33 and membrane ST2 are not involved in nano-SiO₂-mediated pulmonary inflammation. Nano-SiO₂ promoted IL-33 and ST2 co-localization in the cytosol of alveolar macrophages, and absence of ST2 enables the nuclear IL-33 translocation and proinflammatory function. Importantly, we identified a C-terminal form of IL-33 in the nucleus upon nano-SiO₂-macrophage stimulation, which is associated with protein partners involved in the regulation of gene transcription. Our results highlight ST2 prevents nuclear localization of IL-33 in the cytosol as a new mechanism to regulate the pro-inflammatory effect of nuclear IL-33 upon activation of macrophages by nanoparticles.

Introduction

Manufactured nanoparticles are increasingly used in various fields, since they exhibit attractive innovative properties for economic and research ([Oberdorster et al., 2005](#)). Nanoparticles display specific properties, in particular their small size (1 and 100 nm sized), shape, large surface area to mass ratio, state of agglomeration, reactive surface charges and groups are very specific ([Auffan et al., 2009](#); [Nemmar et al., 2013](#)). Industrial common nanoparticles are inorganic metal oxides such as silica dioxide (SiO₂) and titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles. Among them, silica dioxide

nanoparticles (nano-SiO₂) are produced in high quantities and have important applications such as sunscreen lotions, drug delivery, cosmetics, food, and chemical industries and also nanomedicine associated with human exposure and in particular during production. Chronic exposure may lead to novel biological effects and unknown adverse health effects ([Napierska et al., 2010](#); [Tang and Cheng, 2013](#)). If inhaled, nano-SiO₂ will be deposited in different regions of the lungs reaching the alveoli ([Oberdorster et al., 2005](#)). At this site they encounter alveolar macrophages and epithelial cells, promote inflammatory mediators release leading to pulmonary inflammation and potentially lung fibrosis. We previously showed that nano-TiO₂ promote IL-1 α release and NLR pyrin domain containing 3 (NLRP3) inflammasome dependent IL-1 β secretion causing neutrophils influx and lung inflammation ([Yazdi et al., 2010](#)). However the role of interleukin-33 (IL-33) in sterile lung inflammation to nanoparticles is not known. IL-33 is an IL-1-like cytokine constitutively produced and expressed in the nucleus of endothelial and/or epithelial cells and involve in maintaining barriers ([Baekkevold et al., 2003](#)). IL-33 acts as a dual-function protein, with both nuclear and extracellular effects in particular when released as an alarmin upon cellular damage ([Kuchler et al., 2008](#); [Moussion et al., 2008](#)). After synthesis in the cytosol, IL-33 translocates into the nucleus, where it associates with chromatin ([Carriere et al., 2007](#); [Pichery et al., 2012](#); [Roussel et al., 2008](#); [Sundnes et al., 2015](#)). IL-33 is produced as a precursor or in full-length form (270 amino acids in humans and 266 in mice) with the typical IL-1-like cytokine domain localized at the C terminal ([Kurowska-Stolarska et al., 2009](#)). An evolutionarily conserved homeodomain-like HTH motif within the N terminal part was show to be necessary and sufficient for IL-33 association with heterochromatin and mitotic chromosomes, and for transcriptional-repression activity in epithelial barrier cells ([Carriere et al., 2007](#)). Constitutive expression in different mouse epithelial cells may be rapidly lost during acute inflammation ([Sundnes et al., 2015](#)). However, IL-33 expression in myeloid cell immune responses, the classical source of pro-inflammatory cytokines, was less studied. Immune cells require stimulation of pattern-recognition receptors or treatment with pro-inflammatory cytokines to express IL-33 in the nucleus or cytoplasm ([Zhao and Hu, 2012](#)). IL-33

stimulates its own production and release in a positive feed-forward loop in mouse bone marrow–derived macrophages and dendritic cells (DCs) ([Su et al., 2013](#)). In myeloid cell IL-33 was mainly found in the cytoplasm of monocytes with no evidence of nuclear translocation in stimulated cells ([Nile et al., 2010b](#)) but it is not clear whether IL-33 resides also in the nucleus after synthesis. Differential cell expression may correspond to differently expressed IL-33 such as constitutive homeostatic IL-33 present in tissues and pro-inflammatory IL-33 induced in immune cells. Extracellular IL-33 interacts with the ST2 receptor which is either expressed on the cell surface (membrane-bound ST2L) or shed from these cells (soluble ST2, sST2), thereby functioning as a “decoy” receptor to bind and efficiently inhibit IL-33 activity ([Hayakawa et al., 2007](#)). The increased concentration of sST2 in serum is a biomarker of Th2 inflammation such as allergic asthma ([Oshikawa et al., 2001](#)) and idiopathic pulmonary fibrosis ([Tajima et al., 2003](#)). ST2L is closely related to the IL-1R1 (IL-1 receptor 1) and binding of IL-33 on ST2L activates NF-κB pathway ([Schmitz et al., 2005](#)), suggesting that it regulates the response ([Hayakawa et al., 2007](#); [Yin et al., 2011](#)). Unlike IL-1β, full-length IL-33 is bioactive and cleavage by caspases -1, -3 and -7 inactivates IL-33 ([Cayrol and Girard, 2009](#); [Luthi et al., 2009b](#)), suggesting immunosilencing of IL-33 during apoptosis. By contrast active full-length IL-33 may be processed by several other proteases to 20 to 30-fold more active forms. In particular, serine proteases secreted by activated human or murine mast cells (chymase and tryptase) generate mature IL-33 forms with potent activity on ILC2s and eosinophils in vivo, associated with elevated concentrations of IL-5 and IL-13 ([Lefrancais et al., 2014](#)). In a murine model of acute lung injury associated with neutrophil infiltration, neutrophil elastase and cathepsin G were able to cleave IL-33 into mature highly active forms detected in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) ([Lefrancais et al., 2012](#)). In this context IL-33 was shown to play an important role in sterile neutrophilic inflammation. Moreover, IL-33 contributes to the pathogenesis of acute lung, liver or ischemia-induced injury, and to chronic lung, bowel and joint inflammation diseases, in particular mouse rheumatoid arthritis ([Xu et al., 2010](#))

([Palmer et al., 2009](#)) where IL-33 orchestrates neutrophil migration into the joints ([Verri et al., 2010](#)).

Here we report that nano-SiO₂-induced pulmonary inflammation is characterized by enhanced pulmonary IL-33 expression and exacerbated respiratory inflammation in ST2 deficient mice. We show that exogenous IL-33 and membrane ST2 are not involved in nano-SiO₂-mediated pulmonary inflammation. *Ex vivo* stimulation of alveolar macrophages by nano-SiO₂ promotes IL-33/ST2 co-localization in the cytoplasm and the recruitment of a cleaved form of IL-33 into the nucleus. Our results suggest ST2 prevents nuclear localization of IL-33 in the cytosol as a mechanism to regulate the pro-inflammatory effect of nuclear IL-33 upon nanoparticles.

Results

Nano-SiO₂ promotes pulmonary inflammation with enhanced expression of IL-33 in lungs

We previously reported that titanium metal oxide nanoparticles (nano-TiO₂) induce pulmonary inflammation when administrated locally ([Yazdi et al., 2010](#)). Here we show that silica dioxide nanoparticles (nano-SiO₂) promoted dose-dependent cell (Fig. 1A) and protein (Fig. 1C) influx into the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of C57BL/6 mice (WT mice), 24h after instillation. Neutrophils (Fig. 1B) and macrophages (Fig. 1D) were recruited into the BALF. FACS analysis of isolated lung cells showed a significant increase in CD11b⁺ macrophages, CD11c⁺ dendritic cells, GR1⁺ neutrophils, but not of EPCAM⁺ epithelial cells after nano-SiO₂ instillation in comparison to NaCl (Fig. 1E). Moreover, MPO activity (Fig. 1F), expression of the chemoattractant chemokine KC (Fig. 1G) and the pro-inflammatory cytokine IL-1β (Fig. 1H) in lung homogenates were greatly enhanced upon nanoparticles instillation. Importantly, IL-33 expression was significantly increased after nano-SiO₂ airway instillation above a strong basal expression of (Fig. 1I), whereas IL-33 was undetectable in BALF in all mouse groups (Fig. 4G). Since IL-33 may be proteolytically cleaved for functional activation or inactivation, we performed western blotting (WB) analysis in order to evaluate the expression of full-length and cleaved forms of IL-33 in response to nano-SiO₂. We

observed a slight increase of full-length IL-33 form (35kDa) and a strong increase of essentially one cleaved form (around 18kDa) in lung homogenate after nano-SiO₂ instillation (Fig. 1J). These results suggest that both full-length and cleaved IL-33 may play a role in nano-SiO₂-induced pulmonary inflammation.

ST2 deficient mice present an exacerbated inflammatory response to nanoparticles

In order to investigate the role of IL-33 in nano-SiO₂-induced pulmonary inflammation, we analysed nano-SiO₂-induced inflammation in mice deficient for the ST2 chain of the IL-33 receptor complex. ST2 deficient (ST2^{-/-}) mice presented increased inflammation in comparison to wild-type mice (WT) with enhanced cell recruitment (Fig. 2A), and in particular of neutrophils into BALF (Fig. 2B) and lungs as assessed by MPO (Fig. 2C) associated with higher production of KC (Fig. 2D), enhanced neutrophils elastase (NE) activities in lung (Fig. 2E) and BALF (data not shown). Moreover levels of the pro-inflammatory cytokines IL-1-β (Fig. 2F), IL-1α (Fig. 2G) and IL-33 (Fig. 2H) were greatly increased in lung from ST2^{-/-} mice in comparison to WT mice whereas TARC levels were unchanged (data not shown). Finally the expression of the remodeling factors MMP-9 (Fig. 2I) and TIMP-1 (Fig. 2J) was increased in the BALF of ST2^{-/-} mice instilled with nano-SiO₂. Finally, microscopic analysis revealed increased inflammatory cell recruitment in peribronchiolar region in nano-SiO₂-treated ST2^{-/-} mice in comparison to nano-SiO₂-treated littermate control mice (Fig. 2K-2L). Altogether these results suggest that absence of ST2 enhances nano-SiO₂-induced pulmonary inflammation.

Overexpression of protease inhibitor elafin decreases full-length and cleaved IL-33 expression and pulmonary inflammation in response to nano-SiO₂

In order to investigate the role of neutrophil-derived serine proteases on full-length IL-33 maturation in the context of nano-SiO₂-induced airway inflammation, we used elafin transgenic (Tg) mice which constitutively express human elafin (or peptidase inhibitor 3), an endogenous,

ubiquitous serine protease inhibitor ([Sallenave et al., 2003a](#)). Neutrophil elastase (NE) activity present in lungs of WT mice was reduced in elafin transgenic mice treated with nano-SiO₂ indicating that elafin is efficient in inhibiting NE activity in lungs (data not shown). Importantly MPO (Fig. 3A) and KC (Fig. 3B) characteristic of neutrophil recruitment and of IL-1 β (Fig. 3C), IL-6 (Fig. 3D), BAFF (Fig. 3E), IL-17A (Fig. 3F) and TIMP-1 (Fig. 3G) were significantly decreased in lungs of nano-SiO₂ exposed elafin Tg mice in comparison to nano-SiO₂ littermate control mice. Importantly, nano-SiO₂-induced IL-33 expression was also reduced in lung from elafin Tg mice in comparison to WT mice as measured by ELISA (Fig. 3H). We confirmed decreased expression of full-length IL-33 upon nano-SiO₂ in lung of elafin Tg mice by western blot analysis (Fig. 3I). Moreover, the cleaved form of IL-33 was not detectable in lung of elafin transgenic. These results suggest that neutrophil-derived elastase is involved in IL-33 expression and processing thereby affecting lung inflammation.

Exogenous IL-33 and membrane ST2 are not involved in nano-SiO₂-mediated pulmonary inflammation

Since IL-33 may act extracellularly as a cytokine via the membrane receptor ST2 or intracellularly as a transcription regulator, we tested the impact of exogenous IL-33 on pulmonary nano-SiO₂-induced inflammation. First wild-type (WT) or ST2^{-/-} mice were instilled with murine recombinant IL-33 (rIL-33), nano-SiO₂ or both rIL-33 and nano-SiO₂. This form of IL-33 (amino acids 109-266) corresponds to the IL-1-like cytokine domain (18kDa bioactive form of IL-33) which is known to promote inflammation through the membrane ST2 signaling complex. We observed that a single administration of recombinant IL-33 promoted neutrophil recruitment into BALF (Fig. 4A) in WT mice which is abolished in ST2^{-/-} mice, whereas nano-SiO₂ induced a strong neutrophil influx in WT mice which was increased in ST2^{-/-} mice. Nevertheless instillation of both nano-SiO₂ and rIL-33 further augmented neutrophil influx in WT, but not in ST2^{-/-} mice (Fig. 4A). These results suggest that extracellular IL-33 induced neutrophils influx through membrane ST2 signaling, whereas nano-SiO₂-induced neutrophil influx is independent of the membrane IL-33/ST2 signaling

complex. Expression of IL-1 β , MMP-9 and TIMP-1 (Fig. 4B-D) in lung presented a similar profile of inflammatory responses. In contrast, rIL-33 induced a small, ST2-dependent eosinophil influx in BALF (Fig. 4E) and lung (Fig. 4F), whereas nano-SiO₂ had no effect. This rIL-33 effect was increased by nano-SiO₂ in WT, but not in ST2^{-/-} mice. These results indicate that inflammation induced by nano-SiO₂ is not mediated by extracellular IL-33 and independent of membrane ST2. We confirmed that IL-33 was not secreted in response to nano-SiO₂ since IL-33 was detected in the BALF only when rIL-33 was instilled (Fig. 4G). To confirm that, we instilled mice with nano-SiO₂ in presence of anti-IL-33 or anti-ST2 antibodies or recombinant ST2, in order to neutralize extracellular IL-33 or soluble ST2 (sST2), but we did not observe a significant effect on nano-SiO₂-induced pulmonary cellular inflammation or cytokines, chemokines and remodeling factors expression in BALF or lung (data not shown). Altogether these results indicate that IL-33 is not secreted or passively released upon nano-SiO₂ exposure and probably acts intracellularly.

Since nano-SiO₂ instillation promoted both IL-1 β and IL-33 expression, we analyzed the relationship between IL-1 β , IL-33 and nano-SiO₂ in pulmonary inflammation. We observed that instillation of nano-SiO₂ together with rIL-1 β potentiated pulmonary inflammation (Supplementary Fig. 1A-C). Importantly, rIL-1 β alone significantly increased IL-33 in lung (Supplementary Fig. 1D) and in particular the cleaved form of IL-33 (Supplementary Fig. 1E) suggesting that IL-1 β /IL-1R1 signaling is involved in IL-33 expression. Altogether these results suggest that, in contrast to secreted IL-1 β , which signals through IL-1R1 membrane receptor, extracellular IL-33 signaling and membrane ST2 are not involved in nano-SiO₂-induced inflammation.

Nano-SiO₂ increases intracellular IL-33 expression in alveolar epithelial cells and macrophages

In order to evaluate cellular sources of IL-33 upon nanoparticles instillation, we used citrine IL-33 (*Il33Cit/+*) reporter mice where citrine fluorescence is a surrogate for IL-33 mRNA expression with the GFP-derived *citrine* gene inserted downstream of the ATG start codon of *Il33* ([Hardman et al.,](#)

[2013](#)). Fluorescence analysis of lung tissue cryosections from NaCl-instilled reporter mice indicated that citrine is present constitutively in lung tissue (Fig. 5A), and in particular in alveolar epithelial cells as reported ([Hardman et al., 2013](#)). Nanoparticles promoted upregulation of IL-33 expression in alveolar epithelial cells and infiltrating macrophages (Fig 5A).

In order to decipher a potential intracellular role of IL-33 in nanoparticles-induced inflammation, we isolated alveolar macrophages (AMs) from the bronchoalveolar space of naïve C57Bl/6 WT mice. AMs were primed with LPS and stimulated during 3 or 6h with nanoparticles. No IL-33 protein expression was observed in primed, non-activated AMs by immunofluorescence, whereas we observed a great increase in IL-33 protein expression in nano-SiO₂-stimulated AMs (Fig. 5B). These results indicated that nano-SiO₂ promoted intracellular expression of IL-33 in alveolar macrophages with cytosolic and nuclear localization. Moreover, ST2 was constitutively expressed in the cytoplasm and importantly we observed IL-33 and ST2 co-localization in nano-SiO₂-stimulated AMs (Fig. 5C). In addition, we showed that upon nano-SiO₂ stimulation, levels of the pro-inflammatory cytokines IL-1 α and IL-1 β present in the supernatant (Fig. 5D) were greatly increased for ST2^{-/-} AM in comparison to WT AM whereas extracellular IL-33 remained undetectable in both conditions (data not shown). These data showing IL-33 and ST2 interaction in the cytosol and increased inflammation in absence of ST2 strongly suggests that cytoplasmic ST2 regulate IL-33 nuclear translocation and its pro-inflammatory effects upon nano-SiO₂ stimulation.

Nano-SiO₂ increased IL-33 expression in human macrophages

To obtain better insight of intracellular location of IL-33 in macrophages, we used the human monocytes establish cell line THP1. Immunofluorescence revealed a weak constitutive IL-33 protein expression in primed, non-activated THP1 macrophages which was strongly increased upon nano-SiO₂ stimulation at 6h (Supplementary Fig 2A) and expressed both in cytoplasm and nucleus. Moreover, nano-SiO₂ stimulation increased cytoplasmic ST2 expression and co-localization with IL-33 in the cytosol (Supplementary Fig. 2B), confirming the data observed in mouse AM. Human

PMA-primed THP1 macrophages stimulated during 6h with nano-SiO₂ or nano-TiO₂ expressed increased IL-33 mRNA (Supplementary Fig. 3A) and intracellular IL-33 protein (Supplementary Fig. 2B), but no IL-33 secretion contrarily to IL-1 β , which was expressed both intracellularly (Supplementary Fig. 3C) and extracellularly (Supplementary Fig. 3D). Interestingly, ATP (Supplementary Fig. 3E) and/or adenosine (Supplementary Fig. 3F) induced IL-33 mRNA and intracellular IL-33 protein expression (Supplementary Fig. 3G) suggesting that nanoparticles promote IL-33 through the release of extracellular ATP and adenosine through activation of purinergic receptor P2 and P1 respectively. Indeed we showed that nano-SiO₂ or nano-TiO₂ promotes ATP release (Supplementary Fig. 3H) leading to IL-1 β secretion through NLRP3 inflammasome activation ([Baron et al., 2015](#)). Nanoparticles, ATP or adenosine did not induce cell death as shown *in vitro* in accordance with the absence of extracellular IL-33 protein (Supplementary Fig. 3I and J). In conclusion nanoparticles augment intracellular, but not extracellular IL-33 expression through ATP release and purinergic signaling as shown for IL-1 β .

Nano-SiO₂ induces translocation of cleaved IL-33 into the nucleus of human macrophages

In order to evaluate if nanoparticles induce IL-33 expression in the nucleus and/or cytoplasm, we performed cell fractionation and IL-33 western blot analysis of nuclear and cytoplasmic fractions in THP1 cells using monoclonal anti-IL-33 antibody specific of the C-terminal part of the polypeptide (amino acid 112- 270). Full-length or cleaved IL-33 was not detectable in the nucleus of non-stimulated THP1 cells (Fig. 6A). Surprisingly we observed a strong expression of cleaved IL-33 (around 18kDa) in the nuclear fraction 6h after nano-SiO₂ stimulation (Fig. 6A). In contrast the expressions of full-length and cleaved IL-33 were not significantly changed in the cytoplasmic fractions of THP1 cells (Fig. 6B). Measuring protease activity in the cytoplasmic fractions, we observed constitutive trypsin-like activity in the cytosol of THP1 cell which was increased after stimulation with nano-SiO₂ (Fig. 6C). Our results suggest that upon nano-SiO₂ stimulation, full-length IL-33 is processed in the cytosol, potentially by trypsin-like protease or other intracellular

proteases leading to cleaved C-terminal containing IL-33 form which may be transported into the nucleus.

Nuclear IL-33 is involved in positive regulation of pro-inflammatory gene transcription in nano-SiO₂-stimulated THP1 cells

In order to decipher the role of the C-terminal containing IL-33 form present in the nuclear fraction, we looked for potentially interacting proteins with the cleaved form. For that PMA primed THP1 cells were stimulated 6h with nano-SiO₂ and fractionated. IL-33-specific immunoprecipitation was performed on nuclear fractions in order to keep all potential molecules interacting directly or indirectly with IL-33. After immunoblotting with IL-33 antibody, the samples were submitted to mass spectrometry analysis through HPLC and classical MALDI TOFF sequencing with trypsin digestion yielding many peptides. Most of the peptides (87 to 89%) represented only one time (spectral count equal or superior to 2), were not considered, since only the more frequent peptides may correspond to partner fragments. Three proteins emerged with highest spectral counts (SC) (Table 1). First, the splicing factor, proline- and glutamine-rich or SFPQ (SC=360), second the elongation factor 1-alpha 1 or EF1A1 (SC=357) and third the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q or HNRPQ (SC=329). String analysis revealed no known interaction between these three proteins or with IL-33. We further pushed away the string analysis by gradually increasing the number of proteins to find potential direct and indirect interactions or links. Figure 7 represents a graphical view of the first 9 proteins (up to poly-Ubiquitin C or UBC), using spectral counts to order the potential proximity between them in a possible complex with IL-33. Thickness of the links between each protein corresponds to confidence of the interactions found, using all the available sources of String database (curated experiments, databases, co-expression, neighborhood, gene fusion, co-occurrence, and automated unsupervised textmining= searching for proteins that are frequently mentioned together). SFPQ and NONO interact together and are implicated in spliceosome, regulating pre-mRNA alternative splicing in T-Cells. The SFPQ-NONO heteromer

associated with MATR3 may play a role in nuclear retention of defective RNAs. SF3B1 may potentially interact with EF2 during splicing has shown in other species. Interestingly the 5 proteins SFPQ, EF2, EF1A, SF3B1 and NONO are all linked to the pre- and post-translational regulation of pre-mRNA. INPP5D, SYNCRIP and HSP90AB1 are excluded from this process. But adding UBC in the list of partners completely change the String interaction map since UBC is strongly linked to all the 8 first proteins. Globally this analysis shows that this network has significantly more interactions than what would be expected for a random set of proteins of similar size. This enrichment indicates that the first 3 proteins identified are at least partially biologically connected as a group and that addition of the next 6 proteins increases the relationships and the network group structure, UBC staying a major partner role in this protein complex interaction. Nevertheless interaction between this complex and IL-33 was not shown before.

Altogether, these results suggest that upon nano-SiO₂, the cleaved form of IL-33 is recruited in the nucleus of stimulated macrophages and involved in gene transcription, possibly interacting with the splicing factor, proline- and glutamine-rich, elongation factor 1-alpha 1 and heterogeneous nuclear ribonucleoproteins.

Discussion

Like IL-1 α , IL-33 is a member of the IL-1 cytokine family which holds a dual function, acting either as a classical cytokine via interaction with the membrane ST2 receptor complex or exerting gene transcriptional regulatory functions in the nucleus. While the former has been thoroughly studied, its nuclear function is poorly understood. IL-33 is constitutively expressed in non-immune, epithelial barrier cells, but not or weakly in innate immune cells ([Martin and Martin, 2016a](#)). Under steady state conditions, IL-33 is expressed in the nucleus of non-immune cells possibly acting as a transcription factor. Upon cellular stress or damage, IL-33 is released by cell death and functions as an alarmin ([Lefrancais and Cayrol, 2012](#)) or through unconventional secretory mechanisms ([Kakkar et al., 2012](#)). Once released, IL-33 activates various types of cells by binding to its receptor

complex consisting of ST2 and the IL-1 receptor accessory protein (IL-1RAcP). We reported before that nano-SiO₂ induced pulmonary inflammation through the release of IL-1 α and IL-1 β expression and IL-1R1 signaling ([Yazdi et al., 2010](#)). Here we investigated the role of IL-33 and report that nano-SiO₂ enhanced the expression of full-length IL-33, but also induced the processing of IL-33 suggesting a pro-inflammatory role for IL-33. Investigating a potential role for neutrophil-derived proteases in full-length IL-33 maturation we used the elafin transgenic (Tg) mice which express constitutively a endogenous serine protease inhibitor ([Sallenave et al., 2003a](#)). The data obtained with the elafin protease inhibitor Tg mice suggest that neutrophil-derived elastases are involved in both expression and processing of lung IL-33, but also in pulmonary inflammation. Indeed, elafin originally characterized by its neutrophil elastase (NE)-inhibitory activity was shown to be synthesized at mucosal inflammatory sites and to modulate innate immune response ([Sallenave et al., 2003a](#); [Sallenave et al., 1994](#); [Sallenave et al., 1997](#)). Interestingly, an exacerbated inflammatory response to nanoparticles was found in absence of ST2. Nevertheless IL-33 was not present in the bronchoalveolar space and neutralization of extracellular IL-33 or soluble ST2 had no effect on nano-SiO₂-induced inflammation. In contrast to exogenous rIL-33 (109-266) which promoted membrane ST2-dependent neutrophil and eosinophil influx, nano-SiO₂-induced pulmonary inflammation is independent of the membrane IL-33/ST2 signaling complex. These results might be explained by increasing availability of the IL-1RAcP chain for interaction with IL-1R1, enhancing pulmonary inflammation induced by IL-1 α and IL-1 β which are also induced upon nanoparticles. Indeed, we observed that instillation of exogenous IL-1 β potentiated pulmonary inflammation induced by nano-SiO₂ and that exogenous IL-1 β alone significantly increased IL-33 in lung. Another possibility is that intracellular IL-33 is involved in the inflammatory processes observed. Since the functional role of IL-33 in myeloid cells is not well establish, we analyzed IL-33 expression by macrophages increased upon nano-SiO₂ exposure. We demonstrated that nanoparticles promoted intracellular, but not extracellular IL-33 expression through ATP release and purinergic signaling as shown for IL-1 β ([Baron et al., 2015](#)). Intracellular, but not extracellular

IL-33 expression in macrophages upon stimulation was previously reported ([Martin and Martin, 2016a](#); [Nile et al., 2010b](#); [Zhao and Hu, 2012](#)). Importantly we show that nano-SiO₂ increased intracellular expression of both IL-33 and ST2 in mouse alveolar macrophages and human macrophages. Most strikingly IL-33 and ST2 co-localized in the cytosol and we showed increased inflammation in absence of ST2 suggesting that cytoplasmic ST2 regulate IL-33 nuclear translocation and nuclear IL-33-induced pro-inflammatory response. Cytosolic ST2 upon synthesis is transported to the cell membrane, allowing the biological response to extracellular IL-33. In absence of ST2, cytoplasmic IL-33 is not retained and translocates into the nucleus acting as nuclear factor promoting exacerbated inflammatory response of *in vitro* nanoSiO₂- activated alveolar macrophages. A recent study reported that IL-33 is localized simultaneously in nuclear euchromatin and in membrane-bound cytoplasmic vesicles and proposed dynamic nucleo-cytoplasmic flux depending on nuclear pore complex suggesting possible interaction of IL-33 with cytoplasmic ST2 ([Kakkar et al., 2012](#)). Our fractionation study of nano-SiO₂-stimulated macrophages identified a strong expression of the cleaved form of IL-33 (around 18kDa) which corresponds to the C-term part of IL-33 (IL-1-like cytokine domain) suggesting that full-length IL-33 is processed by intracellular proteases, potentially by trypsin like proteases, leading to a C-terminal cleaved IL-33 which may be transported into the nucleus. However we cannot exclude that an N-terminal fragment may also translocate to the nucleus and promote inflammation. In addition, mass spectrometry analysis of partner proteins found after immunoprecipitation with IL-33 nuclear fragment allowed us to identify three proteins involved in gene transcription, the splicing factor, proline- and glutamine-rich, the elongation factor 1-alpha 1 and the heterogeneous nuclear ribonucleoproteins. Human SFPQ is a nuclear multifunctional protein that has been implicated in a series of steps in the human gene expression pathway ([Shav-Tal and Zipori, 2002](#)). EF1A1 is an isoform of the alpha subunit of the elongation factor-1 complex, which is responsible for the enzymatic delivery of aminoacyl tRNAs to the ribosome. Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) are complexes of RNA and protein present in the cell nucleus during gene transcription

and subsequent post-transcriptional modification of the newly synthesized RNA (pre-mRNA). Our results suggest that the cleaved form of nuclear IL-33 we identified is involved in the transcription of pro-inflammatory genes. Several study reported that the N terminal region of IL-33 (residues 1-65 in human) corresponding to a conserved homeodomain-like helix-turn-helix (HTH) DNA-binding domain ([Carriere et al., 2007](#)) and containing a chromatin-binding motif (CBM) structure ([Roussel et al., 2008](#)) is necessary and sufficient for nuclear IL-33 functions. IL-33 tethers to chromatin by docking into the acidic pocket formed by the histone H2A–H2B dimer at the surface of the nucleosome, regulating chromatin compaction through nucleosome–nucleosome interactions through this CBD ([Roussel et al., 2008](#)). It was proposed that in absence of nuclear sequestration domain, IL-33 is released systemically activating an innate immune response and lethal non-resolving mostly T_H2-biased inflammation which is IL-33 receptor (ST2) dependent ([Bessa et al., 2014](#)). Another study showed that IL-33 binds to the ST2 gene promoter acting directly as a transcription repressor ([Shao et al., 2014](#)). However, nuclear IL-33 was showed to interact with the transcription factor NFκB via its activation domain (residue 66-109) leading to downregulation of gene expression ([Ali et al., 2011a](#)) suggesting that IL-33 may regulate gene expression through different mechanisms and possibly via its C-terminal IL-1-like cytokine domain (residue 112-270). Depending on the gene and cell type-specific promoters, IL-33 could act through a protein–protein interaction with other transcription factors and possibly through its C-terminal region. The functional role of nuclear IL-33 in myeloid cell remains poorly studied. Here we propose that upon nano-SiO₂ macrophage stimulation, a C-terminal, cleaved form of IL-33 is recruited into the nucleus and involved in positive regulation of gene transcription. Nevertheless the specific nuclear targets and the biological effects of C-term nuclear IL-33 need to be further investigated.

In conclusion, nano-SiO₂ promotes pulmonary inflammation characterized by enhanced pulmonary IL-33 expression, which is exacerbated in ST2 deficient mice. Exogenous IL-33 and membrane ST2 are not involved in nano-SiO₂-mediated pulmonary inflammation. *Ex vivo* stimulation of alveolar macrophages by nano-SiO₂ increased IL-33 and ST2 expression in the cytoplasm and promoted the

recruitment of a C-terminal form of IL-33 into the nucleus. Our study suggests ST2-mediated retention of IL-33 in the cytosol as a mechanism to regulate the pro-inflammatory effect of nuclear IL-33 upon nanoparticles. Nevertheless the specific nuclear targets and the biological effects of C-terminal nuclear IL-33 need further investigations.

Materiel and Methods

Mice. C57Bl/6J Wild type (WT) mice were purchased from Janvier Labs (Le Genest Saint Isle, France). ST2-deficient mice (ST2^{-/-}) and Elafin transgenic on C57Bl/6J background were respectively generated and provided by Andrew N.J. McKenzie (Medical Research Council Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK) ([Townsend et al., 2000](#)) and by Jean-Michel Sallenave (INSERM UMR 1152, Bichat hospital, Paris, France) ([Sallenave et al., 2003a](#)). Animals were housed at the animal facility at transgenose institute (TAAM) in CNRS of Orleans, France. For experiments, adults (6-10 weeks old) were kept in sterile, isolated and ventilated cages. Animal experiments were performed according to the French Institutional Committee under agreement CLE CCO 2015-1087.

In vivo nano-SiO₂ model. Nano-SiO₂ particles (15 nm, Iolitec, Germany) were sonicated and thoroughly vortexed before use. Nano-SiO₂ (5, 7.5, 10 or 15 mg/kg), rIL-33 (109-266, 0.5 µg/mice, R&D system, Minneapolis, MN) or rIL-1β (1 µg/mice, R&D system) in saline or vehicle only were given by nasal instillation under light ketamine-xylasine anaesthesia. Twenty-four hours after administration, mice were killed by CO₂ exposure and BAL was performed as previously described (Gasse et al, 2009).

Differential cell counts were performed on cytopsin preparation (Cytospin 3, Thermo Shandon) after May-Grünwald Giemsa staining (Sigma Aldrich, St Louis, MO) according to the manufacturer's instructions. Differential cell counts were made on 200 cells using standard morphological criteria.

Lung homogenization and analysis. After BAL the lungs were perfused with isoton to flush the vascular content. Lungs were homogenized by a rotor-stator (Ultra-turrax®) in 1 ml of PBS. The extract was centrifuged 10 min at 10000 rpm and the supernatant was stored at -80°C before mediator measurements. The pellets were resuspended in 1 ml PBS containing 0.5% hexadecyltrimethyl ammoniumbromide (HTAB) and 5 mM ethylene-diamine tetra-acetic acid (EDTA). After centrifugation, 50 µl of supernatants were placed in test tubes with 200 µl PBS-HTAB-EDTA, 2 ml Hanks' balanced salt solution, 100 µl of o-dianisidine dihydro-chloride (1.25 mg/ml), and 100 µl H₂O₂ 0.05%. After 15 minutes of incubation at 37°C in an agitator, the reaction was stopped with 100µl NaN₃ 1%. The MPO activity was determined as absorbance at 610-630 nm against medium.

Lung histology. The left lobe of lung was fixed in 4% buffered formaldehyde, processed and paraffin embedded under standard conditions. Lung sections of 3 µm were stained with haematoxylin and eosin (H&E). The slides were blindly examined by using a Leica microscope at 200X magnification (Leica, Solms, Germany). Cell infiltration was assessed by a semi-quantitative score (with increasing severity 0-5) by two independent observers.

Mediator measurements. For cytokine determination, BALF supernatants and lung homogenates were analysed by ELISA assay kits for murine IL-1β, IL-33, KC, MPO, TARC, MMP-9, TIMP-1, IL-1α, BAFF, IL-6, IL-17, EPO and human IL-1β and IL-33 according to manufacturers' instructions (R&D system, Minneapolis, MN).

Flow cytometry analysis. After nano-SiO₂ instillation (7.5 mg/kg), lungs were perfused with isoton® (Beckman Coulter France, Villepinte) to flush the vascular content and digested by Liberase™ TL Research Grade (62.5 µg/ml, Roche diagnostic France) and DNase I (50 U/ml, Sigma Aldrich, St Louis, MO) for 45 min. To characterise the infiltrating leukocytes, lung homogenates were filtered twice and analysed for epithelial cells, neutrophils, macrophages and

dendritic cells influx using the following monoclonal antibodies: anti-F4/80, anti-CD11b, anti-CD11c, anti-Gr1, anti-EPCAM and isotype controls (BD Biosciences). Data were collected using a FACS Canto II (BD Biosciences) and analysed using FLOWJO software (TreeStar, Mountain View, CA).

Immunoblotting. Protein concentrations were determined in lung tissue by using DCTM protein Assay (BIO-RAD, France, Marnes-la-coquettes). 30 µg of proteins were denatured by boiling (95°C, 5 min) in reducing SDS sample buffer, separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, Illinois, USA). The membranes were blocked 2 hours in 10% non-fat dried milk in Tris-Buffered saline (TBS)-0,1% Tween® 20 and incubated with primary goat anti-IL-33 (R&D Systems Minneapolis; AF3626) antibody or mouse anti-β-actin in 5% non-fat dried milk in TBS-0,1% Tween® 20. Membranes were then washed three times in TBS-0,1% Tween 20 and incubated with the appropriate second antibody conjugated to horseradish peroxidase (anti-goat IgG, and anti-mouse IgG respectively from Sigma Aldrich). Detection was performed with ECLTM Prime Western-blotting system (GE Healthcare Life Sciences). The intensity of bands revealed was quantified by mean of densitometry with Multi-application gel imaging system PXi software (Syngene).

Human monocytes/macrophages THP1 cells culture and stimulation. THP1 cells were cultured in RPMI (GIBCOTM, Fisher scientific, Hampton, New Hampshire, USA), 10% FCS (Hyclone, Cramlington, UK), penicillin (100U/ml, Invitrogen, Illkirch, France) and streptomycin (100µg/ml, Invitrogen). For experiments, THP1 cells were differentiated 3 hours with 0.5 µM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; Sigma-Aldrich), washed and plated overnight (2×10^5 cells /well for mediator and ATP measurement and 5×10^6 cells/well for q-PCR, immunoblotting and fractionation analysis).

Alveolar macrophages (AMs) preparation and stimulation. BALF was collected after instilling the whole lung with 1 mL of ice cold PBS-EDTA 1,5 mM. This process was repeated 5 times for maximal recovery of macrophages. BALF was centrifuged and cells were re-suspended in 1 ml RPMI medium supplemented with 10% FCS (Hyclone, Cramlington, UK), penicillin 100U/ml (100U/ml, Invitrogen, Illkirch, France), streptomycin 100µg/ml (100µg/ml, Invitrogen). AMs were counted using a haemocytometer and 120 000 cells per well were plated in 96-wells plate overnight. Cells were incubated at 37°C and 5% CO₂ for 2 hours to facilitate adherence. Non-adherent cells were removed and fresh medium was added. Cells were stimulated following day during 6 hours.

Immunofluorescence on IL-33 citrine reporter mice. The larger left lung lobe was excised, fixed in formol 4% and embedded in paraffin. Sections were dewaxed and stained 1 min in DAPI (Sigma Aldrich). Pictures were taken with Leica microsystem microscope (Leica, Solms, Germany) and analysed with image J.

Immunofluorescence. After plating on cover slip and stimulation, cells (THP1 or AMs) were fixed in paraformaldehyde 4% for 15 min at room temperature. After two lavages, one in PBS/BSA and another in PBS, the saturation was performed in PBS/ BSA 1%/ FCS 10% for 30 min at 4°C. The cells were permeabilized with PBS/ BSA 1%/ FCS 10%/ Triton 1X for 30 min at 4°C. After a lavage, the first antibody was applied 1 h at room temperature or overnight at 4°C. The second antibody was applied after another lavage for 1 h at room temperature. After a lavage the DAPI was applied for 1 min at room temperature and the cells were washed and stick on glass with fluoromount G. The first antibodies used were Nessler-1 antibody (Abcam, Cambridge, UK); anti-ST2 antibody (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA); anti- α -tubulin antibody (Abcam); anti-goat A488, anti-rabbit TRITC (Abcam). Pictures of THP1 were taken with Leica microsystem microscope and analysed with image J and pictures of AMs were taken on Carl ZEISS microscope

(Axio OBSERVER Z1, objective 63X Plan Apochromat oil 63x N.A 1.4) and analysed on AxioVision Rel 4.8 software.

Fractionation. Primed-THP1 cells were stimulated during 6 hours in 6-well plates. The culture medium was removed and cells were washed twice with PBS. Cells were lysed with CLB (Cell Lysis Buffer) during 15 min at 4°C. The lysate was suck in and out with 1ml syringe 15 times. Lysates were collected into 2 ml tubes and 1,5 M of sucrose was added. The lysates were homogenised gently and centrifuged at 6500 g for 15 min at 4°C. The supernatant was collected as the cytoplasm fraction. The pellet (or nuclear fraction) was washed once with TSE buffer (Tris 10 mM, Sucrose 300 mM, EDTA 1 mM) and centrifuged at 4000 g for 5 min. Finally, the pellet was dissolved with 25 µl of TSE buffer. The nuclear fraction was sonicated and protein concentrations were determined by using DCTM protein Assay (BIO-RAD) in both cytoplasm and nuclear fraction. Proteins were then incubated at 95°C for 5 min in reducing SDS sample buffer and Western-blot was performed to detect IL-33.

Trypsin-like activity dosage. After lung harvest, tissues were homogenized in 1 ml PBS and grinded with FastPrep-24 (MP Biomedicals, 45sec, speed 6, 2 cycles). After centrifugation (10,000 rpm, 10 min, at 4°C), tissue samples, including trypsin standards (80pM to 5000pM final concentration) were diluted in Tris-HCL 50 mM, NaCl 150 mM pH 8.1, and assessed for trypsin-like activity in 384 well dark plates, using the specific substrate Boc-Phe-Ser-Arg-MCA (final concentration = 150 µM). Fluorescence (excitation and emission wavelength = 350 nm and et 460 nm respectively) was read over a 3 h time period in a *VarioskanTM Flash Multimode Reader* (Thermo scientific) and lung trypsin-like concentration was calculated related to the trypsin standard curve.

Samples preparation for sequencing. Gel bands were excised from the SDS-PAGE after Coomassie Blue staining. In-gel enzymatic digestion was performed with standard conditions. Briefly, protein bands were extensively washed with CH₃CN and 25 mM NH₄HCO₃. The excised bands were treated with 10 mM DTT at 56°C for 30 min. After DTT removal, cysteine carbamidomethylation was performed at room temperature in dark for 30 min by addition of 55 mM iodoacetamide. After removal of the supernatant, the washing procedure was repeated, and gel slices were dried. 10ng/μl of trypsin (Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA) diluted in 25mM NH₄HCO₃ was added, and enzymatic digestion was performed overnight at 37°C. Proteolytic peptides were first extracted by addition of 20 μl volume of 50% acetonitrile and 0.1% formic acid and then by addition of 20 μl volume of 100% acetonitrile. Extracted peptides were vacuum dried and resuspended in 5% acetonitrile and 0.1% TFA prior to LC-MS/MS mass spectrometry analyses.

NanoLC-MS/MS analysis. The nanoLC-MS/MS analysis were performed with the triple-TOF 4600 spectrometer (Absciex, Framingham, MA, USA) coupled to the NanoRSLC system (Thermo scientific). Peptides were desalted on a C18 reverse phase pre-column (C18 Acclaim Pepmap100, 3 μm, 100 Å, 75 μm i.d., 2 cm length) using a loading buffer containing H₂O/ACN/TFA 98%/2%/0.05%) at 5μL/min and were then eluted at a flow rate of 300nl/min from the reverse phase analytical C18 column (C18 Acclaim Pepmap100, 2 μm, 100 Å, 75 μm i.d., 25 cm length) using a 5-35% solvent B gradient for 40 min. Solvent B was 0.1% formic acid in 100% acetonitrile and solvent A was 0.1% formic acid in water. NanoLC-MS/MS experiments were conducted in Data Dependent acquisition method by selecting the 20 most intense precursors for CID fragmentation with Q1 quadrupole set at low resolution for better sensitivity. Raw data were processed using MS data converter software (Absciex) and protein identification were performed using the MASCOT search engine (Matrix science, London, UK) against the Swissprot database (release 2016_04, human taxa) and NCBI database (release 20160325, human taxa) with carbamidomethylation of cysteines and oxidation of methionines set as fixed and variable

modifications respectively. Peptide and fragment tolerance were respectively set at 10 ppm and 0.05 Da. Only proteins with at least two unique peptides with mascot ions score higher than the identity threshold at less than 1% of false positive discovery rate.

qPCR. RNA was purified from cell lysate by using Trizol extraction protocol. RNA reverse transcription into cDNA was carried out with Go script reverse kit (Promega). RT-PCR was performed with Fast SYBR Green master mix on a (Stratagene MX3005P, Agilent technologies). The primers used were followed: hIL-33, hIL-1 β (Qiagen, Hilden, Germany).

Statistical analysis. Statistical evaluation of differences between experimental groups was determined by one-way ANOVA, analysis of variance, Bonferroni test for in vivo experiments and one-way ANOVA, Kruskal-Wallis for in vitro studies using Prism software (La Jolla, CA, USA). *P* values <0.05 were considered statistically significant.

Acknowledgements

We thank Corinne Schricke and Florence Savigny for technical assistance (Orleans, France) and David Cornu for mass spectrometry analysis. This work has benefited from the facilities and expertise of the SICaPS platform of I2BC (Institute for Integrative Biology of the Cell, <http://www.i2bc.paris-saclay.fr>)

Figure legends

Figure 1. Nano-SiO₂ promotes cellular recruitment into Broncho Alveolar Lavage Fluid (BALF) and lung in mice. Wild-type (C57Bl6) mice were instilled with 5, 10 or 15 mg/kg of nano-SiO₂ led to significant increase of (A) total cells and (B) neutrophils into the BALF 24 hours after instillation compared to saline group.(C) Protein content was increased in a dose dependent manner after nanoparticles instillation. (D) Macrophages count in BALF was only significantly increased with 15 mg/kg of nanoparticles. (E) Twenty-four hours after intranasal administration of

nano-SiO₂ (7.5 mg/kg) in wild-type mice, lung homogenates were analysed by flow cytometry. (F) Myeloperoxidase (MPO) activity was determined in lung after nano-SiO₂ treatment. (G) Chemokine KC and pro-inflammatory cytokines (H) IL-1 β and (I) IL-33 levels measured by ELISA were increased in lung homogenates in response to nano-SiO₂. (J) Western-blot was performed in lung homogenates of mice treated with NaCl or nano-SiO₂ (7,5 mg/kg) to detect full length and processed IL-33.

Data are representative of two experiments and are expressed as mean values $\pm$ SD (n= 4-6 mice per group, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 using an Anova one way analyse of variance Bonferroni test). ns = not significant.

Figure 2. ST2 deficient mice present an exacerbated inflammatory in response to nano-SiO₂.

Wild-type (WT) and ST2 deficient (ST2^{-/-}) mice were treated with NaCl or 5 mg/kg of nano-SiO₂ and (A) total cells and (B) neutrophils were scored. To correlate with neutrophils count, (C) MPO activity and (D) KC production were assessed in lung. (E) Neutrophil elastase activity in lung was increased in ST2^{-/-} mice treated with nano-SiO₂ compared to wild-type mice treated with nano-SiO₂. (F-H) Proinflammatory cytokines level, (F) IL-1 β , (G) IL-1 α , (H) IL-33, in lung were determined by ELISA in lung of WT or ST2^{-/-} treated or not by nano-SiO₂. (I) Production of matrix metalloproteinase (MMP-9) and (J) Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP-1) were measured by ELISA in BALF of NaCl or nano-SiO₂-treated WT or ST2^{-/-}. (K) Representative micrographs (20X magnification) of lung sections stained with haematoxylin and eosin of a NaCl vehicle control and a nano-SiO₂-treated in WT or ST2^{-/-} mice 24h after exposure. (L) Cell infiltration was assessed by a semi-quantitative score done with 0-5.

Data are representative of four independent experiments and are expressed as mean values $\pm$ SD (n= 4-5 mice per group, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 using an Anova one way analyse of variance Bonferroni test). ns = not significant.

Figure 3. Pulmonary inflammation and remodelling to nano-SiO₂ are decreased in elafin transgenic mice. Wild-type (WT) and elafin transgenic (Elafin Tg) mice were instilled with NaCl or nano-SiO₂ (7,5mg/kg). (A) Myeloperoxidase (MPO) activity and (B) the chemokine KC production were assessed in lung showing decreased in Elafin Tg mice compared to WT mice treated with nano-SiO₂. Proinflammatory cytokines production such as (C) IL-1 β , (D) IL-6, (E) BAFF, (F) IL-17 and (H) IL-33 and (G) TIMP-1 were determined in lung by ELISA showing a significant diminution in lung of Elafin Tg mice instilled with nano-SiO₂ compared to WT treated. (I) Western-blot is performed in lung homogenates of treated and untreated mice to detect different forms of IL-33. Full-length and processed forms of IL-33 was strongly decreased in Elafin Tg treated mice.

Data are representative of six independent experiments and are expressed as mean values $\pm$ SD (n= 4-6 mice per group, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 using an Anova one way analyse of variance Bonferroni test).

Figure 4. Extracellular IL-33 and membrane ST2 are not involved in inflammation induced by nanoparticles. Wild-type (WT) and ST2 deficient (ST2^{-/-}) mice were treated by intranasal administration of NaCl, recombinant IL-33 (rIL-33) or nano-SiO₂ alone or combined with rIL-33. Recombinant IL-33 alone induced (A) neutrophils infiltration in BALF of WT but not ST2^{-/-} mice. Neutrophils infiltration was significantly increased in BALF of ST2^{-/-} treated mice. Additive effect of rIL-33 and nano-SiO₂ together led to neutrophils infiltration in BALF of WT and ST2^{-/-} mice. (B) Pro-inflammatory cytokine IL-1 β level, tissue remodelling molecules like (C) MMP-9 and (D) TIMP-1 productions induced by nanoparticles were determined by ELISA. (E) rIL-33 alone induced eosinophils infiltration in BALF in a membrane ST2 dependent way and together with nano-SiO₂ rIL-33 potentiates the eosinophilia in ST2 dependent manner. (F) Additive effect of rIL-33 and nano-SiO₂ in eosinophil peroxidase (EPO) activity in lung is also dependent of ST2. (G) IL-33 was detected in the BALF by ELISA only after rIL-33 instillation.

Data are representative of two independent experiments and are expressed as mean values $\pm$ SD (n= 4-6 mice per group, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 using an Anova one way analyse of variance Bonferroni test).

Figure 5. Nano-SiO₂ induced intracellular IL-33 protein expression and co-localization of intracellular ST2 in lung tissue and in murine alveolar macrophages (AMs). (A) IL-33 citrine reporter mice were instilled with NaCl or nano-SiO₂ (7,5 mg/kg) and immunofluorescence on lung sections was done showing that IL-33 is constitutively expressed but nano-SiO₂ instillation led to an increase of IL-33 expression in lung tissue of mice. (B) Alveolar macrophages (AMs) from wild-type mice were isolated and stimulated during 6 hours with complete medium or nano-SiO₂ (500 μ g/ml) and immunofluorescent staining were performed. Nano-SiO₂ induces IL-33 production in AMs. (C) Intracellular ST2 is constitutively expressed in AM cytoplasm. Intracellular IL-33 co-localizes with intracellular ST2 after nano-SiO₂ treatment. (D) Levels of IL-1 α and IL-1 β present in the supernatant were greatly increased for ST2^{-/-} AM in comparison to WT AM. Viability of AM stimulated with nanoparticles was performed using methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay.

Data are representative of two independent experiments and are expressed as mean values $\pm$ SD (pool of 10 mice per group, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 using an Anova one way analyse of variance Bonferroni test).

Figure 6. Nano-SiO₂ induce cytosolic processing of IL-33 by trypsin-like activity and translocation of cleaved IL-33 into the nucleus in THP1 cells. (A) THP1 cells were differentiated in macrophages by PMA during 3 hours and stimulated 6 hours with nano-SiO₂ (250-500 μ g/ml) or complete medium as control. THP1 cells were fractioned and a western-blot was performed in nucleus and cytoplasm fraction to identify forms of IL-33. Full length and processed form of IL-33 were present in the cytoplasm fraction before and after nano-SiO₂ treatment. In the nucleus fraction

only one processed form of IL-33 is found in response to nano-SiO₂ stimulation, in a dose-dependent manner. (B) Trypsin-like enzyme activity was assessed in the cytoplasm fraction. Trypsin-like activity was constitutively present in the cytoplasm of non-stimulated cells, but increased with nano-SiO₂ stimulation.

Data are representative of three independent experiments.

Figure 7. Nuclear IL-33 interacts with three proteins involved in transcription activity in nano-SiO₂ stimulated THP1 cells. After stimulation of THP1 cells with nano-SiO₂, cells were fractionated and the nuclear fraction was immunoprecipitated, migrated and high molecular weight bands of proteins were identified and sequenced. Analysis of biological interactions between IL-33 and proteins found after sequencing. Thick lines represented strong interactions between proteins whereas fine lines represented weak interactions.

Table 1. Fifteen major proteins identified by sequencing.

Among proteins identified after the sequencing, 3 potential partners with higher spectral counting were identified: splicing factor, proline and glutamine-rich/ Elongation factor 1-alpha1 and the herogeneous nuclear ribonucleoprotein Q.

Figure S1. Exogenous recombinant IL-1 β but not recombinant IL-33 is involved in nano-SiO₂-induced pulmonary inflammation. Wild-type mice were treated by intranasal route with NaCl, recombinant IL-1 β (rIL-1 β) or nano-SiO₂ alone or combined with rIL-1 β . (A) rIL-1 β and nano-SiO₂ alone increased total cells in BALF. Used together rIL-1 β and nano-SiO₂ had an additive effect on the total cells and on (B) macrophages and (C) neutrophils count in BALF. (D) Nano-SiO₂

and rIL-1 β alone significantly increased IL-33 level in lung homogenates compared to saline group without any difference between treated groups. (E) Western-blot was performed in lung homogenates of mice treated with NaCl, or nano-SiO₂ (7,5 mg/kg) with or without rIL-1 β . Recombinant IL-1 β alone was able to induce IL-33 protein expression.

Data are representative of two independent experiments and are expressed as mean values $\pm$ SD (n= 4-6 mice per group, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 using an Anova one way analyse of variance Bonferroni test).

Figure S2. Nano-SiO₂ induce intracellular IL-33 protein which co-localizes with IL-33 in THP1 human macrophages. THP1 cells were primed with PMA and stimulated during 6 hours with culture medium or nano-SiO₂ (500 μ g/ml) and an immunofluorescent staining were performed. (A) IL-33 protein was induced in the cytoplasm of THP1 cells after nano-SiO₂ stimulation. (B) ST2 was constitutively induced into THP1 cells and co-localized with intracellular IL-33 after nano-SiO₂ treatment.

Data are representative of three independent experiments

Figure S3. Nano-SiO₂ induces IL-33 mRNA expression and intracellular but not extracellular protein expression in THP1 human macrophages. PMA-primed THP1 cells were stimulated 6 hours with nano-SiO₂ (250 – 1000 μ g/ml). (A) mRNA relative expression of IL-33 and (B) intracellular IL-33 were increased in THP1 cells after nano-SiO₂. (C) Intracellular and (D) extracellular IL-1 β levels were increased in THP1 cells after nano-SiO₂ treatment. (E-G) Primed THP1 macrophages were stimulated with culture medium as a control, ATP or adenosine (Ado). IL-33 mRNA is increased after low concentration of ATP (0,3 mM) but not with high concentration (3 mM) whereas no significant difference was observed with adenosine treatment. (H) Extracellular ATP dosage was performed in primed-THP1 cells supernatant showing that nano-SiO₂ induced

extracellular ATP release. (I-J) Viability of primed THP1 cells stimulated with nanoparticles or adenosine (Ado) was performed using methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay. Data are representative of five independent experiments and are expressed as mean values $\pm$ SD (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ using an Anova one way analyse of variance Kruskal-Wallis test). ns = not significant.

Supplementary materials

ATP measurement. Extracellular ATP in cell free medium supernatant was quantified using ATP Lite one step kit (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France) according to manufacturer's instructions and luminescence produced measured (Mithras, Mikrowin 2000 software, Berthold Technologies, Thoiry, France).

Pulmonary eosinophil peroxidase (EPO) activity. EPO activity was determined in order to estimate the recruitment of eosinophils to the lung parenchym. After BAL lavage and perfusion, the lungs were excised, stored frozen at -80°C or directly homogenized for 30 s in 1 ml of 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 8.0, using a Polytron (Kinematic AG, Luzern, Switzerland). The homogenate was centrifuged for 15 min at 4°C at 10,000 $\times g$. EPO activity in the supernatant was determined as estimated from the oxidation of *O*-phenylenediamine (OPD) by EPO in the presence of hydrogen peroxide (H_2O_2). The substrate solution consisted of 10 mM OPD in 0.05 M Tris/HCl-buffer, pH 8.0 and 4 mM H_2O_2 (BDH, Poole, UK) and was added to the samples in a 96-wells microplate (Greiner) and incubated at 37°C for 30 min. Duplicate incubations were carried out in the absence and presence of the EPO inhibitor 3-amino-1,2,4-triazole (AMT, 2 mmol/l). The absorbance was then measured at 490 nm.

Figure 1

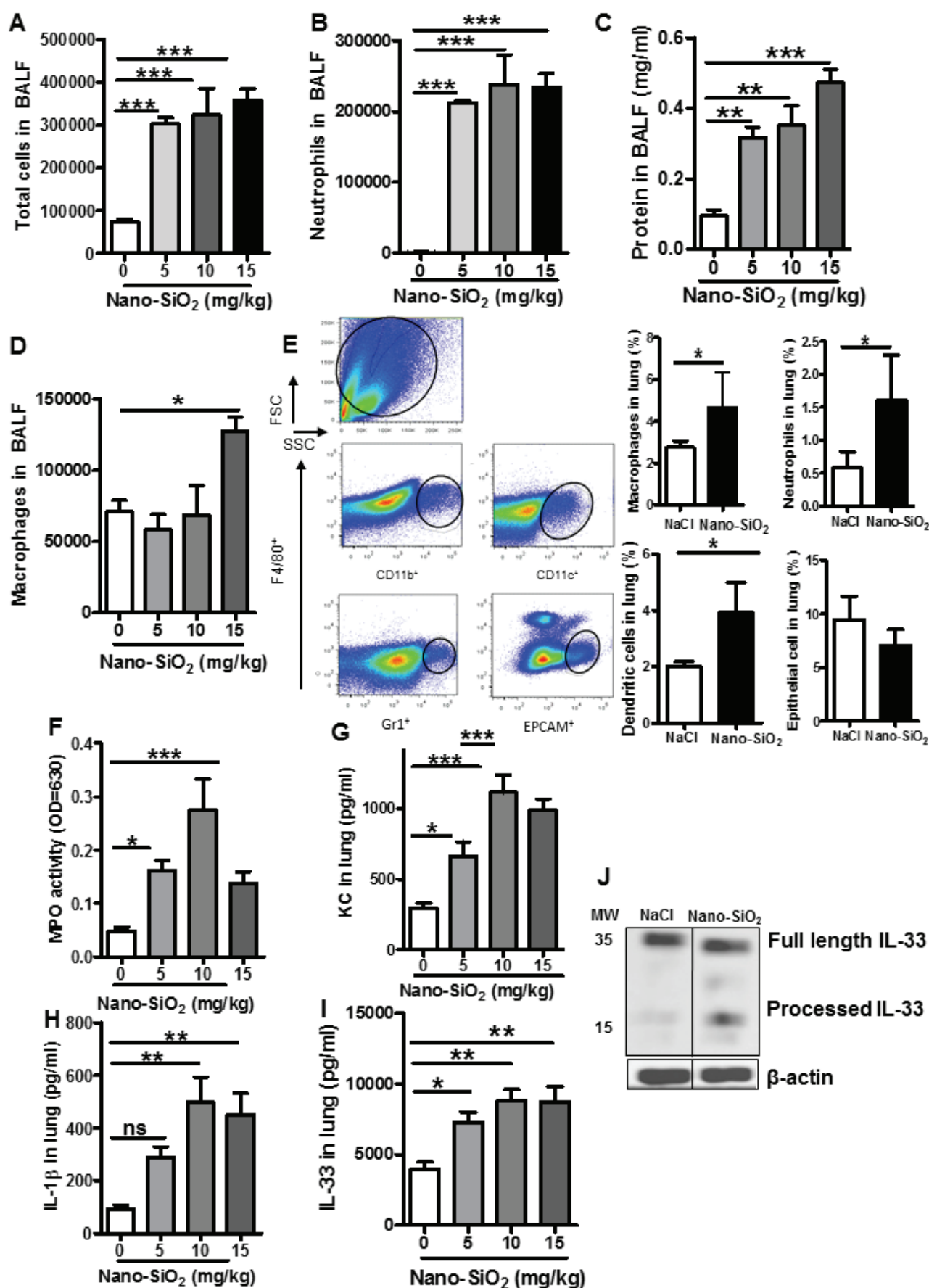


Figure 2

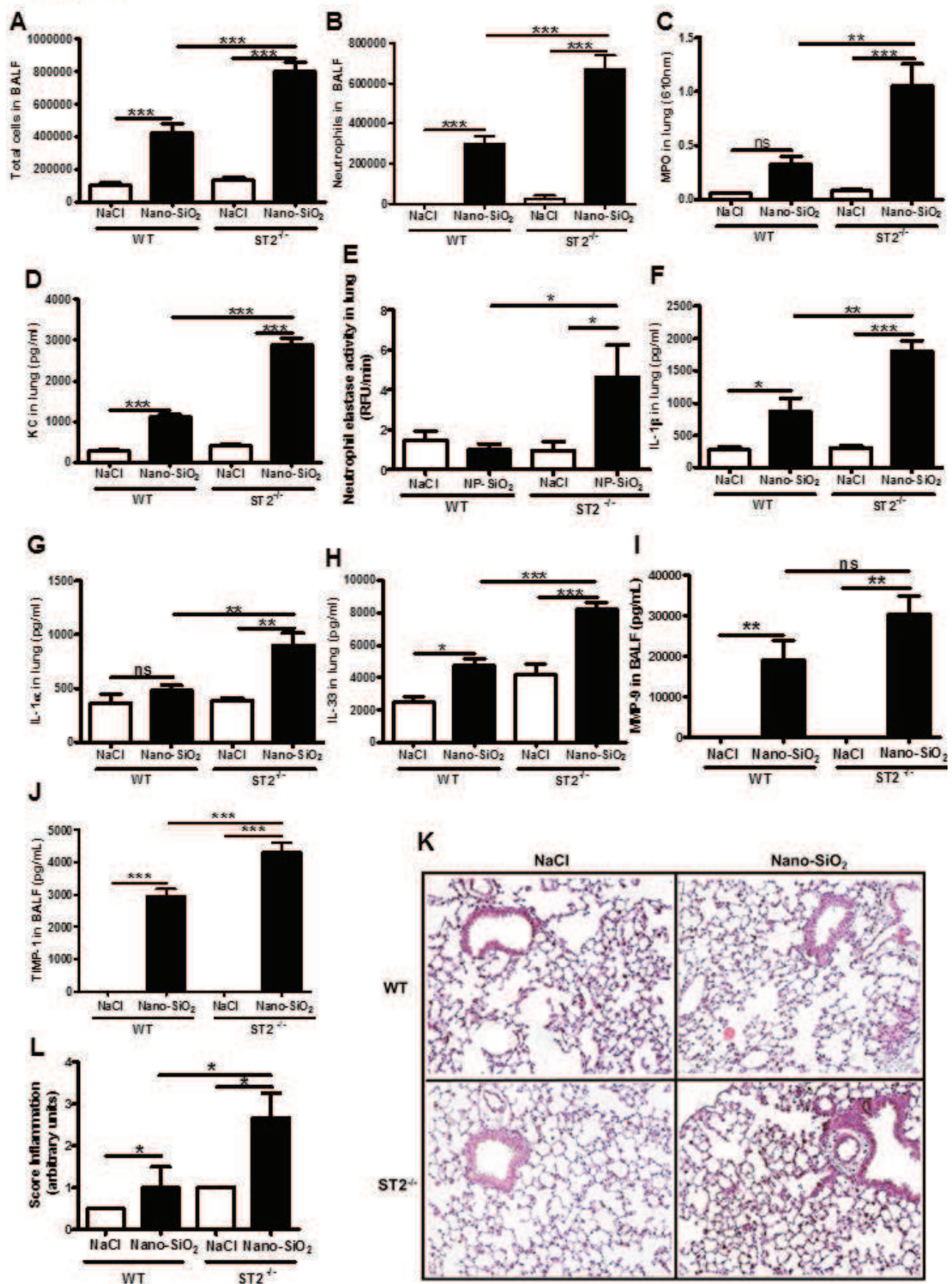


Figure 3

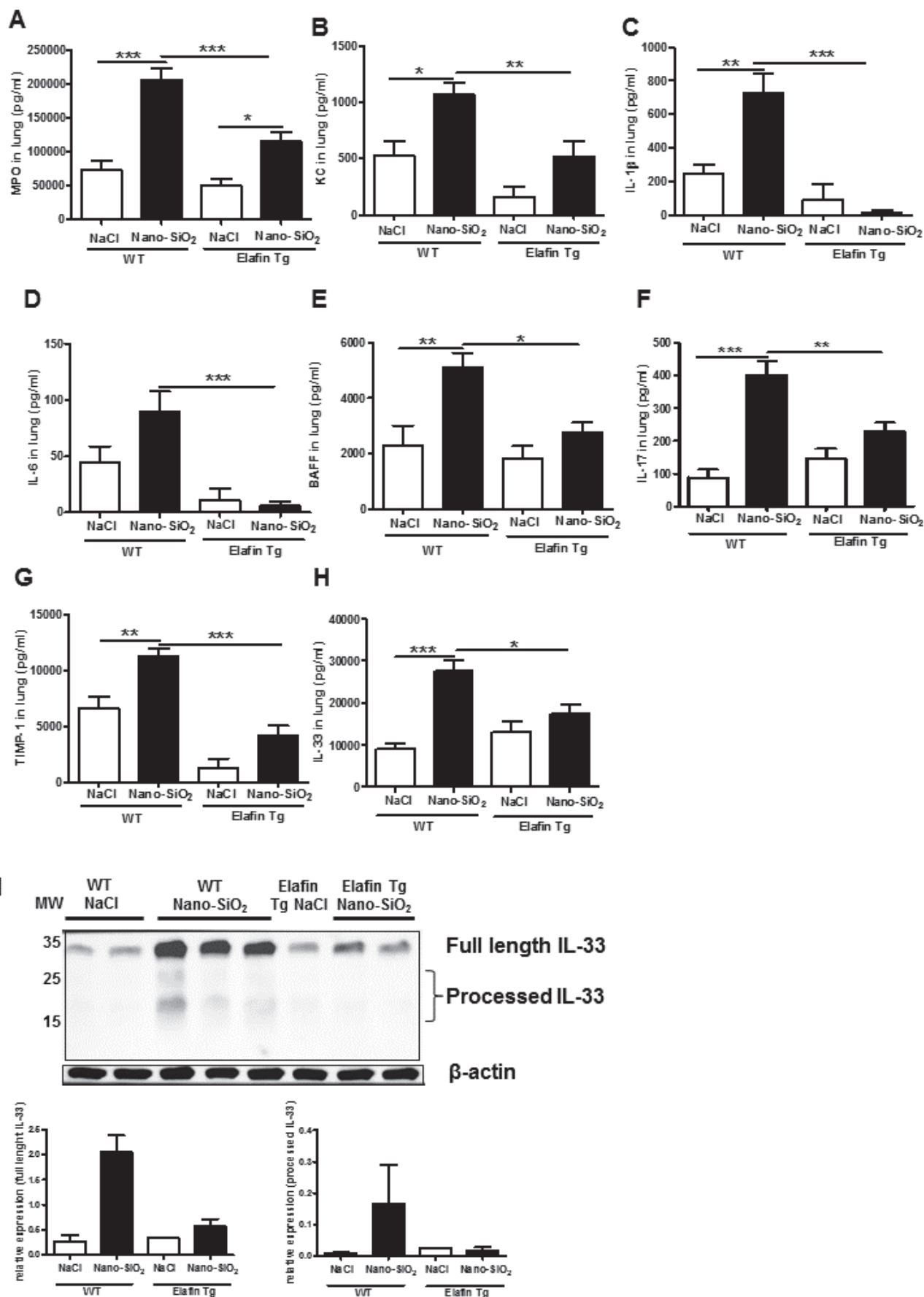


Figure 4

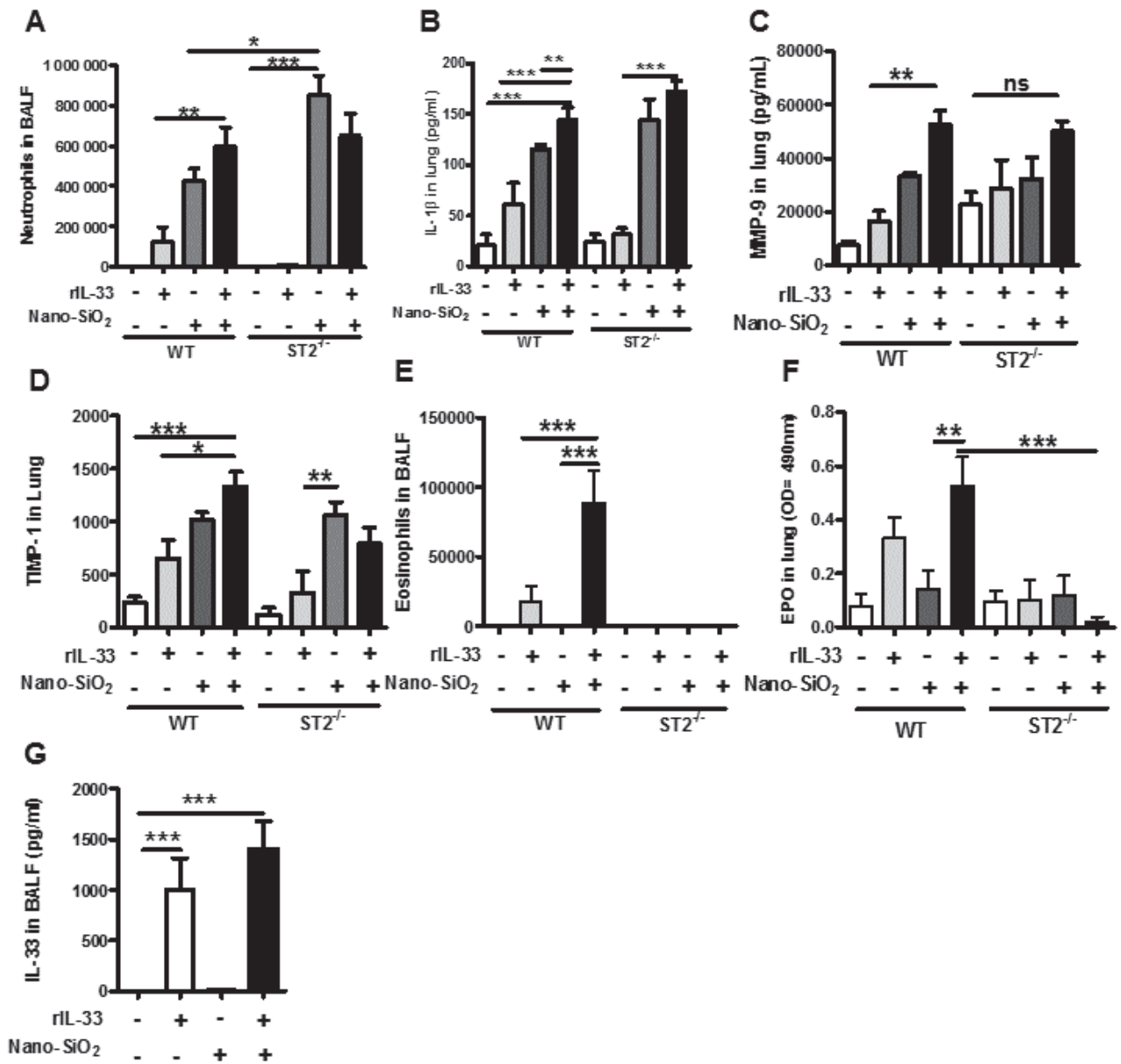
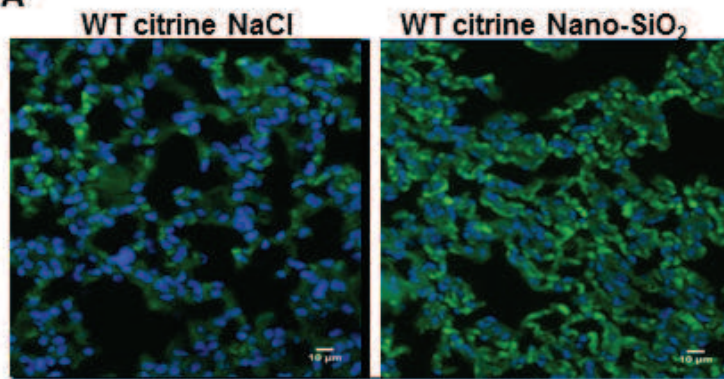


Figure 5

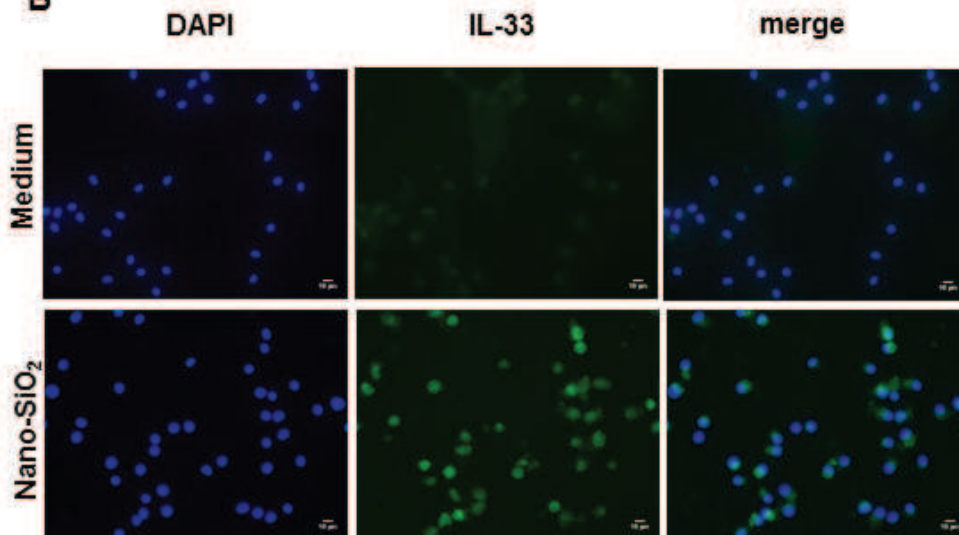
In vivo

A

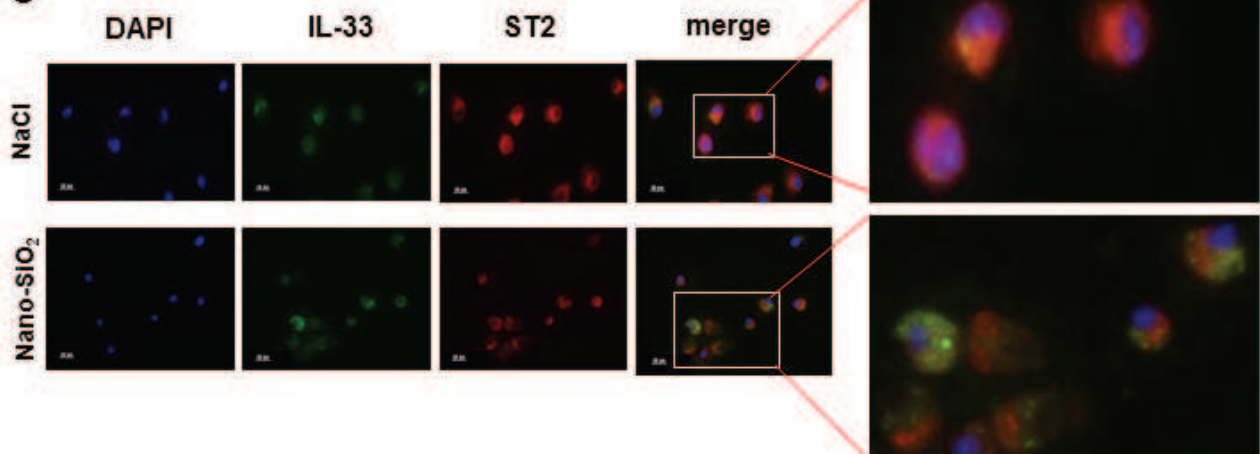


Ex vivo stimulation

B



C



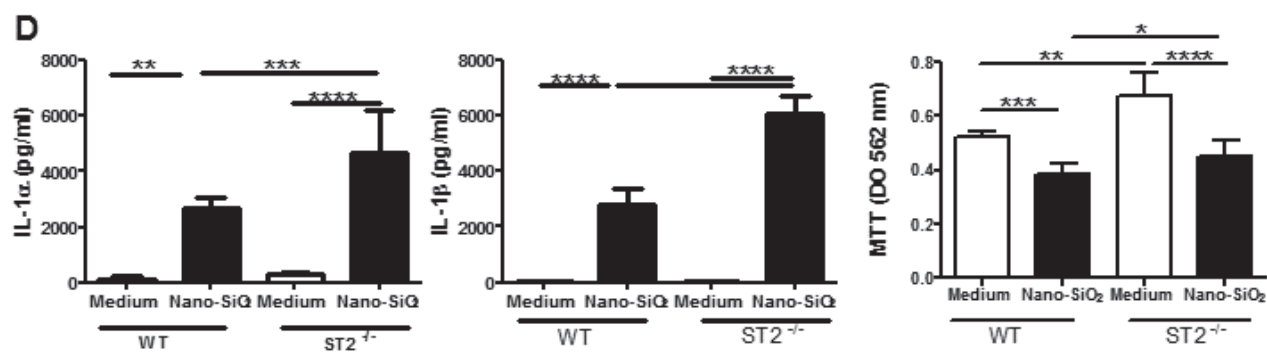


Figure 6

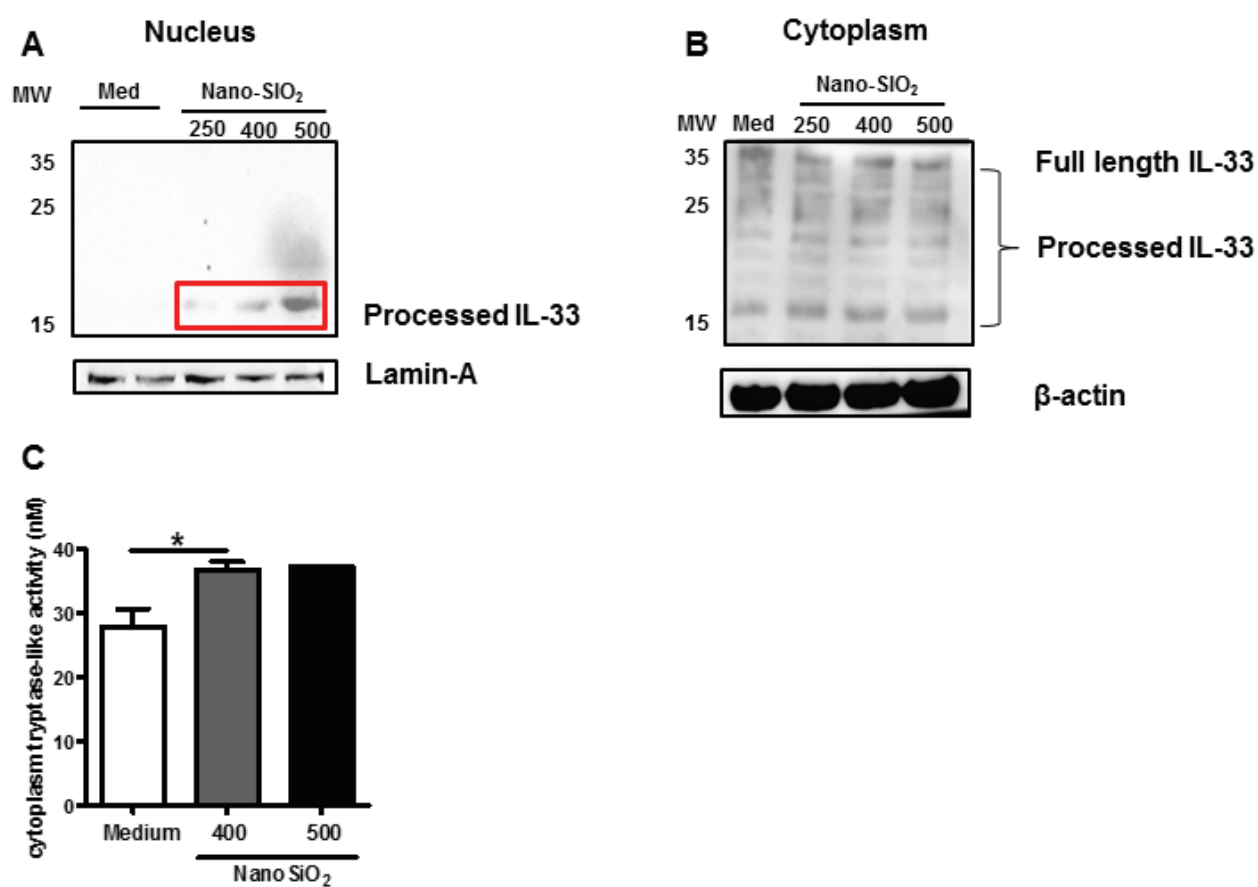
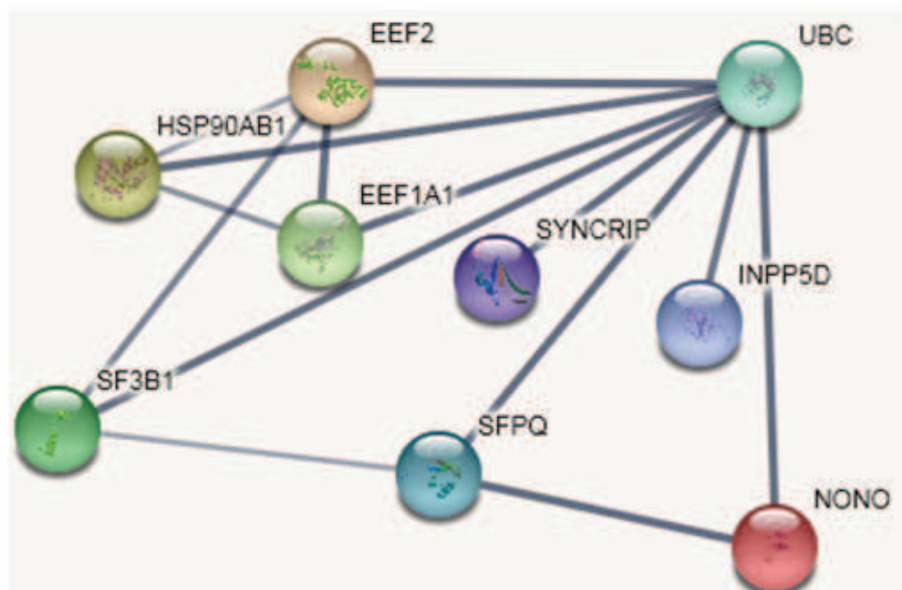


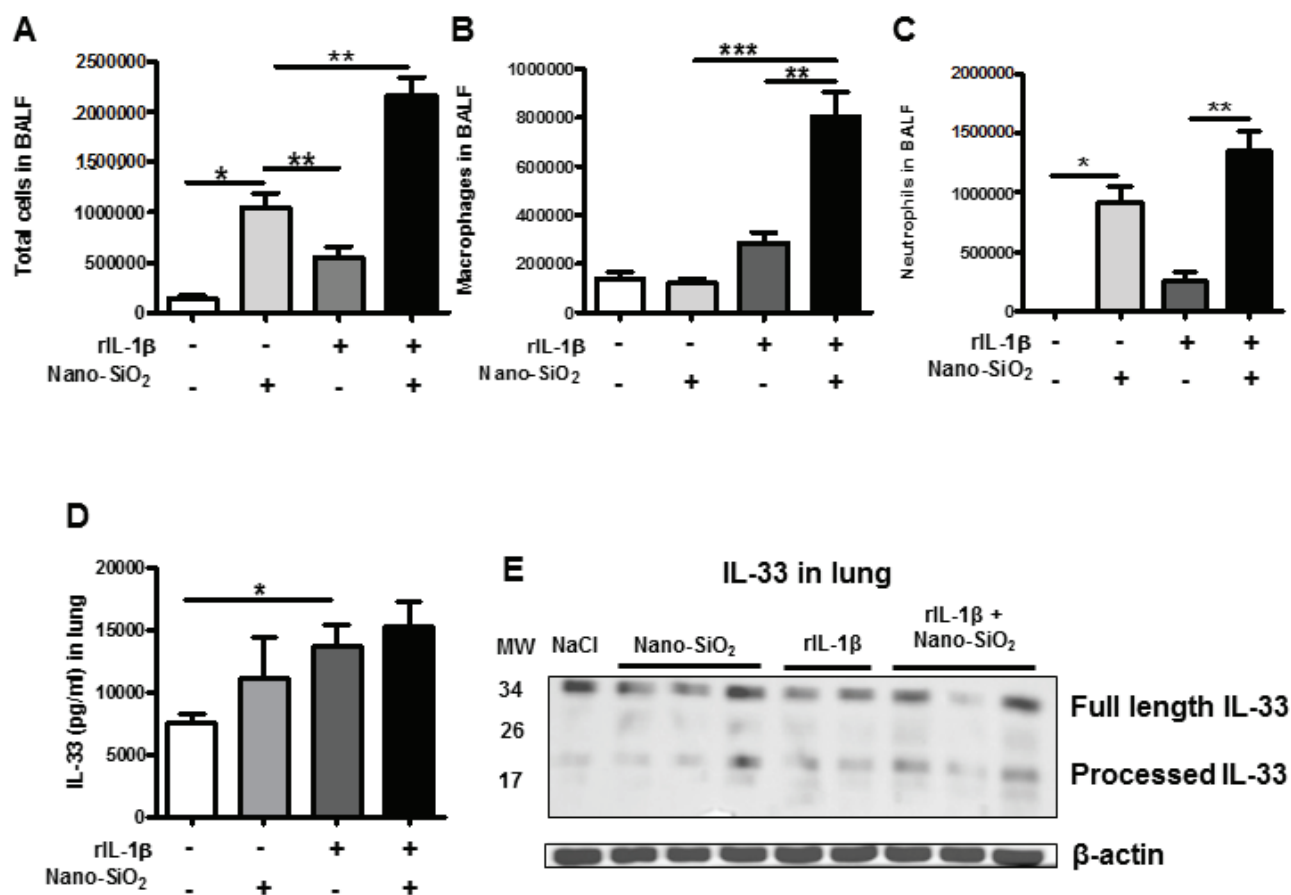
Table 1

Rank	SC	Accession	Name	M W
1	360	P23246	SFPQ_HUMAN	76
2	357	P68104	EF1A1_HUMAN	50
3	329	O60506	HNRPQ_HUMAN/SYNCRIP	70
4	237	P13639	EF2_HUMAN/EEF2	95
5	206	P08238	HS90B_HUMAN/HSP90AB1	83
6	190	O75533	SF3B1_HUMAN	146
7	184	Q92835	SHIP1_HUMAN/INPP5D	133
8	159	Q15233	NONO_HUMAN	54
9	158	P0CG48	UBC_HUMAN	77
10	150	P61978	HNRPK_HUMAN	51
11	143	O00571	DDX3X_HUMAN	73
12	141	P11940	PABP1_HUMAN	71
13	141	Q13310	PABP4_HUMAN	71
14	137	Q92499	DDX1_HUMAN	82
15	135	O43390	HNRPR_HUMAN	71

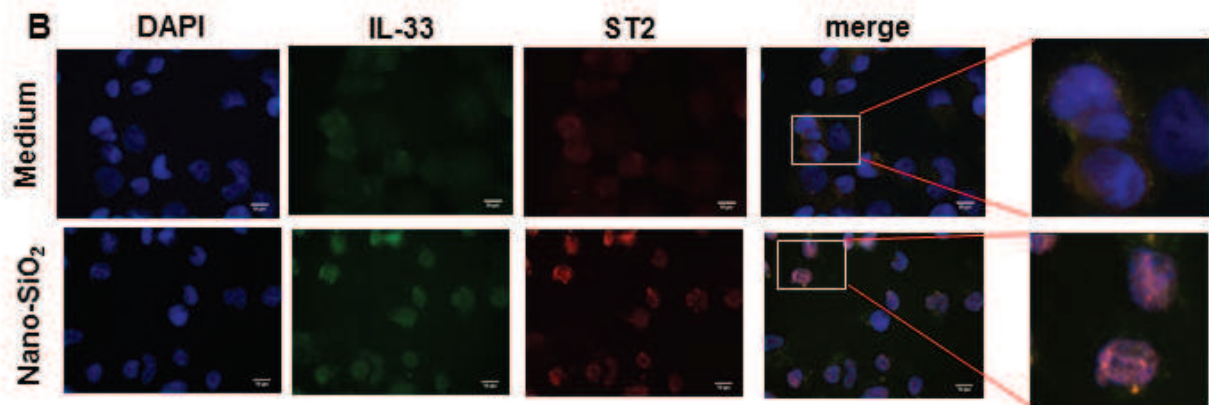
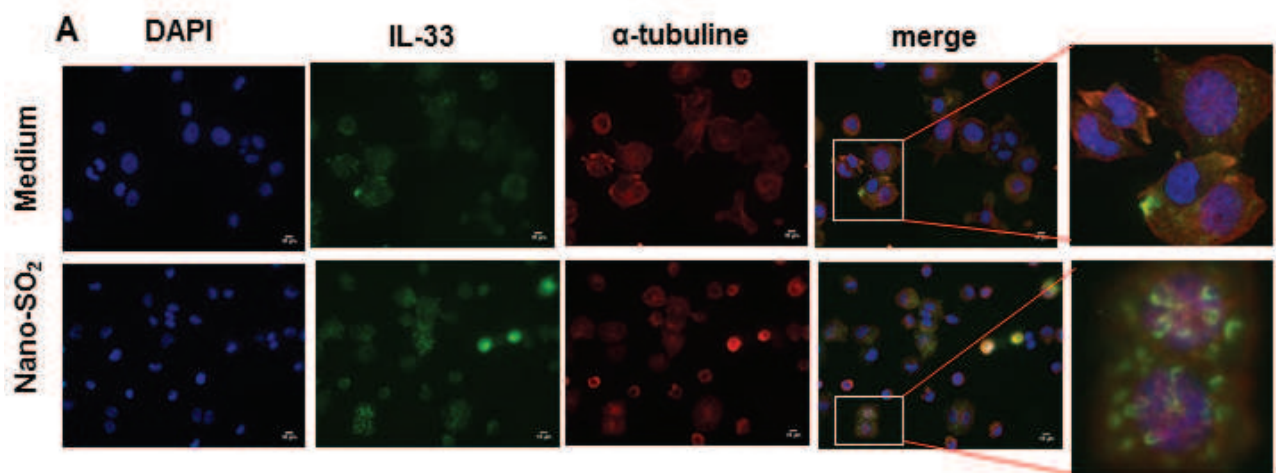
Figure 7



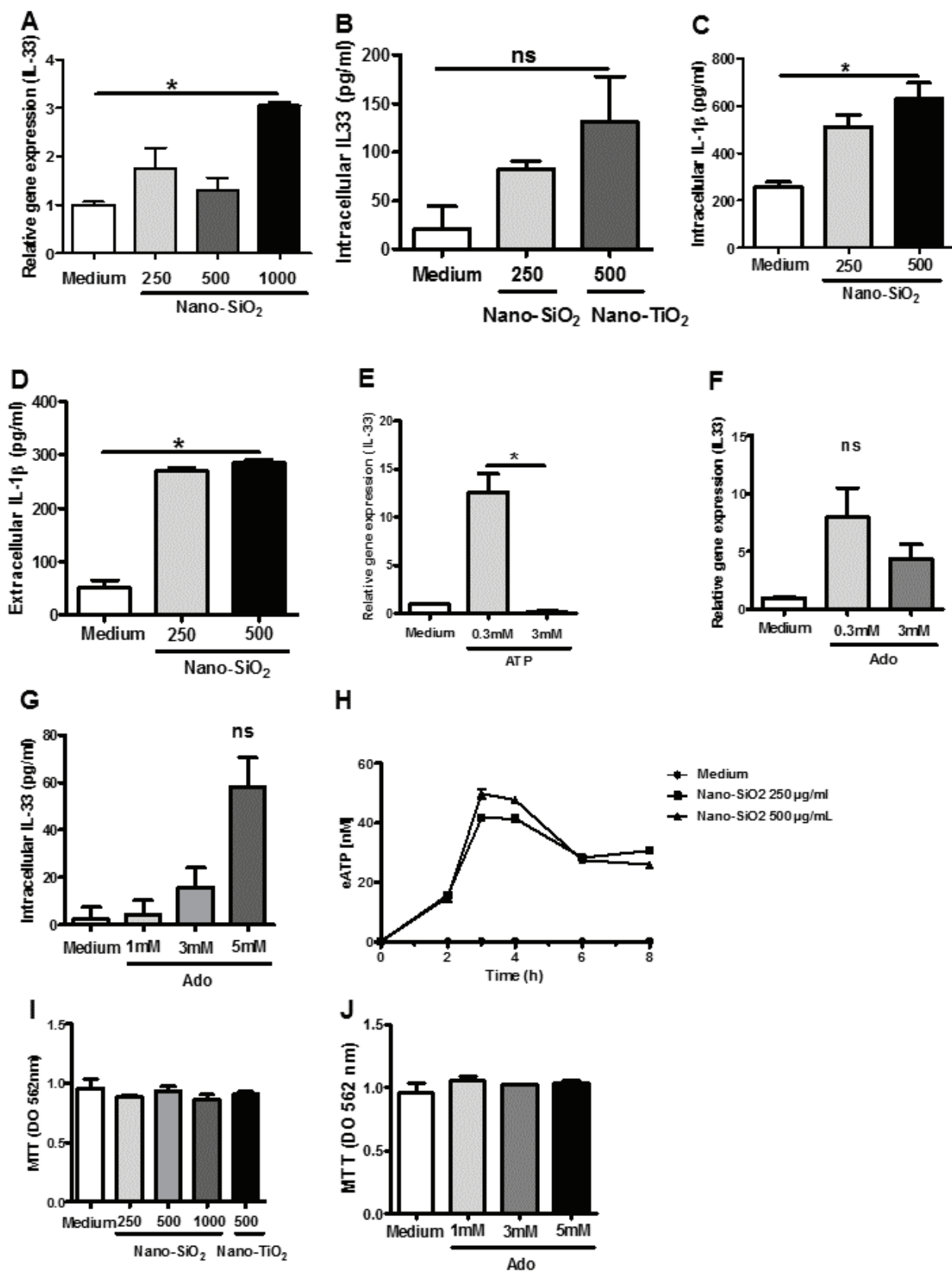
Supplementary Figure 1: *Exogenous recombinant IL-1 β but not recombinant IL-33 is involved in nano-SiO₂-induced pulmonary*



Suppl Figure 2 : Nanoparticles induce intracellular IL-33 protein in THP1



Supplementary Figure 3: Nano-SiO₂ induces IL-33 mRNA expression and intracellular but not extracellular protein expression in THP1



References

- Ali, S., A. Mohs, M. Thomas, J. Klare, R. Ross, M.L. Schmitz, and M.U. Martin. 2011. The dual function cytokine IL-33 interacts with the transcription factor NF-kappaB to dampen NF-kappaB-stimulated gene transcription. *J Immunol* 187:1609-1616.
- Auffan, M., J. Rose, J.Y. Bottero, G.V. Lowry, J.P. Jolivet, and M.R. Wiesner. 2009. Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nat Nanotechnol* 4:634-641.
- Baekkevold, E.S., M. Roussigne, T. Yamanaka, F.E. Johansen, F.L. Jahnsen, F. Amalric, P. Brandtzaeg, M. Erard, G. Haraldsen, and J.P. Girard. 2003. Molecular characterization of NF-HEV, a nuclear factor preferentially expressed in human high endothelial venules. *Am J Pathol* 163:69-79.
- Baron, L., A. Gombault, M. Fanny, B. Villeret, F. Savigny, N. Guillou, C. Panek, M. Le Bert, V. Lagente, F. Rassendren, N. Riteau, and I. Couillin. 2015. The NLRP3 inflammasome is activated by nanoparticles through ATP, ADP and adenosine. *Cell Death Dis* 6:e1629.
- Bessa, J., C.A. Meyer, M.C. de Vera Mudry, S. Schlicht, S.H. Smith, A. Iglesias, and J. Cote-Sierra. 2014. Altered subcellular localization of IL-33 leads to non-resolving lethal inflammation. *J Autoimmun* 55:33-41.
- Carriere, V., L. Roussel, N. Ortega, D.A. Lacorre, L. Americh, L. Aguilar, G. Bouche, and J.P. Girard. 2007. IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:282-287.
- Cayrol, C., and J.P. Girard. 2009. The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:9021-9026.
- Gasse, P., N. Riteau, S. Charron, S. Girre, L. Fick, V. Petrilli, J. Tschopp, V. Lagente, V.F. Quesniaux, B. Ryffel, and I. Couillin. 2009. Uric acid is a danger signal activating NALP3 inflammasome in lung injury inflammation and fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 179:903-913.
- Hardman, C.S., V. Panova, and A.N. McKenzie. 2013. IL-33 citrine reporter mice reveal the temporal and spatial expression of IL-33 during allergic lung inflammation. *Eur J Immunol* 43:488-498.
- Hayakawa, H., M. Hayakawa, A. Kume, and S. Tominaga. 2007. Soluble ST2 blocks interleukin-33 signaling in allergic airway inflammation. *J Biol Chem* 282:26369-26380.
- Kakkar, R., H. Hei, S. Dobner, and R.T. Lee. 2012. Interleukin 33 as a mechanically responsive cytokine secreted by living cells. *J Biol Chem* 287:6941-6948.
- Kuchler, A.M., J. Pollheimer, J. Balogh, J. Sponheim, L. Manley, D.R. Sorensen, P.M. De Angelis, H. Scott, and G. Haraldsen. 2008. Nuclear interleukin-33 is generally expressed in resting endothelium but rapidly lost upon angiogenic or proinflammatory activation. *Am J Pathol* 173:1229-1242.
- Kurowska-Stolarska, M., B. Stolarski, P. Kewin, G. Murphy, C.J. Corrigan, S. Ying, N. Pitman, A. Mirchandani, B. Rana, N. van Rooijen, M. Shepherd, C. McSharry, I.B. McInnes, D. Xu, and F.Y. Liew. 2009. IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. *J Immunol* 183:6469-6477.
- Lefrancais, E., and C. Cayrol. 2012. Mechanisms of IL-33 processing and secretion: differences and similarities between IL-1 family members. *Eur Cytokine Netw* 23:120-127.
- Lefrancais, E., A. Duval, E. Mirey, S. Roga, E. Espinosa, C. Cayrol, and J.P. Girard. 2014. Central domain of IL-33 is cleaved by mast cell proteases for potent activation of group-2 innate lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:15502-15507.
- Lefrancais, E., S. Roga, V. Gautier, A. Gonzalez-de-Peredo, B. Monsarrat, J.P. Girard, and C. Cayrol. 2012. IL-33 is processed into mature bioactive forms by neutrophil elastase and cathepsin G. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:1673-1678.

- Luthi, A.U., S.P. Cullen, E.A. McNeela, P.J. Duriez, I.S. Afonina, C. Sheridan, G. Brumatti, R.C. Taylor, K. Kersse, P. Vandenabeele, E.C. Lavelle, and S.J. Martin. 2009. Suppression of interleukin-33 bioactivity through proteolysis by apoptotic caspases. *Immunity* 31:84-98.
- Martin, N.T., and M.U. Martin. 2016. Interleukin 33 is a guardian of barriers and a local alarmin. *Nat Immunol* 17:122-131.
- Moussion, C., N. Ortega, and J.P. Girard. 2008. The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel 'alarmin'? *PLoS One* 3:e3331.
- Napierska, D., L.C. Thomassen, D. Lison, J.A. Martens, and P.H. Hoet. 2010. The nanosilica hazard: another variable entity. *Particle and fibre toxicology* 7:39.
- Nemmar, A., J.A. Holme, I. Rosas, P.E. Schwarze, and E. Alfaro-Moreno. 2013. Recent advances in particulate matter and nanoparticle toxicology: a review of the in vivo and in vitro studies. *BioMed research international* 2013:279371.
- Nile, C.J., E. Barksby, P. Jitprasertwong, P.M. Preshaw, and J.J. Taylor. 2010. Expression and regulation of interleukin-33 in human monocytes. *Immunology* 130:172-180.
- Oberdorster, G., E. Oberdorster, and J. Oberdorster. 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 113:823-839.
- Oshikawa, K., K. Kuroiwa, K. Tago, H. Iwahana, K. Yanagisawa, S. Ohno, S.I. Tominaga, and Y. Sugiyama. 2001. Elevated soluble ST2 protein levels in sera of patients with asthma with an acute exacerbation. *Am J Respir Crit Care Med* 164:277-281.
- Palmer, G., D. Talabot-Ayer, C. Lamacchia, D. Toy, C.A. Seemayer, S. Viatte, A. Finckh, D.E. Smith, and C. Gabay. 2009. Inhibition of interleukin-33 signaling attenuates the severity of experimental arthritis. *Arthritis Rheum* 60:738-749.
- Pichery, M., E. Mirey, P. Mercier, E. Lefrancais, A. Dujardin, N. Ortega, and J.P. Girard. 2012. Endogenous IL-33 is highly expressed in mouse epithelial barrier tissues, lymphoid organs, brain, embryos, and inflamed tissues: in situ analysis using a novel IL-33-LacZ gene trap reporter strain. *J Immunol* 188:3488-3495.
- Roussel, L., M. Erard, C. Cayrol, and J.P. Girard. 2008. Molecular mimicry between IL-33 and KSHV for attachment to chromatin through the H2A-H2B acidic pocket. *EMBO Rep* 9:1006-1012.
- Sallenave, J.M., G.A. Cunningham, R.M. James, G. McLachlan, and C. Haslett. 2003. Regulation of pulmonary and systemic bacterial lipopolysaccharide responses in transgenic mice expressing human elafin. *Infect Immun* 71:3766-3774.
- Sallenave, J.M., J. Shulmann, J. Crossley, M. Jordana, and J. Gauldie. 1994. Regulation of secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI) and elastase-specific inhibitor (ESI/elafin) in human airway epithelial cells by cytokines and neutrophilic enzymes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 11:733-741.
- Sallenave, J.M., Z. Xing, F. Graham, and J. Gauldie. 1997. In vivo adenovirus-mediated expression of human pre-elafin, a potent neutrophil elastase inhibitor. *Chest* 111:128S-129S.
- Schmitz, J., A. Owyang, E. Oldham, Y. Song, E. Murphy, T.K. McClanahan, G. Zurawski, M. Moshrefi, J. Qin, X. Li, D.M. Gorman, J.F. Bazan, and R.A. Kastelein. 2005. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* 23:479-490.
- Shao, D., F. Perros, G. Caramori, C. Meng, P. Dormuller, P.C. Chou, C. Church, A. Papi, P. Casolari, D. Welsh, A. Peacock, M. Humbert, I.M. Adcock, and S.J. Wort. 2014. Nuclear IL-33 regulates soluble ST2 receptor and IL-6 expression in primary human arterial endothelial cells and is decreased in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Biochem Biophys Res Commun* 451:8-14.
- Shav-Tal, Y., and D. Zipori. 2002. PSF and p54(nrb)/NonO--multi-functional nuclear proteins. *FEBS Lett* 531:109-114.

- Su, Z., J. Lin, F. Lu, X. Zhang, L. Zhang, N.B. Gandhi, C.S. de Paiva, S.C. Pflugfelder, and D.Q. Li. 2013. Potential autocrine regulation of interleukin-33/ST2 signaling of dendritic cells in allergic inflammation. *Mucosal Immunol* 6:921-930.
- Sundnes, O., W. Pietka, T. Loos, J. Sponheim, A.L. Rankin, S. Pflanz, V. Bertelsen, J.C. Sitek, J. Hol, G. Haraldsen, and D. Khnykin. 2015. Epidermal Expression and Regulation of Interleukin-33 during Homeostasis and Inflammation: Strong Species Differences. *J Invest Dermatol* 135:1771-1780.
- Tajima, S., K. Oshikawa, S. Tominaga, and Y. Sugiyama. 2003. The increase in serum soluble ST2 protein upon acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 124:1206-1214.
- Tang, L., and J. Cheng. 2013. Nonporous Silica Nanoparticles for Nanomedicine Application. *Nano today* 8:290-312.
- Townsend, M.J., P.G. Fallon, D.J. Matthews, H.E. Jolin, and A.N. McKenzie. 2000. T1/ST2-deficient mice demonstrate the importance of T1/ST2 in developing primary T helper cell type 2 responses. *J Exp Med* 191:1069-1076.
- Verri, W.A., Jr., F.O. Souto, S.M. Vieira, S.C. Almeida, S.Y. Fukada, D. Xu, J.C. Alves-Filho, T.M. Cunha, A.T. Guerrero, R.B. Mattos-Guimaraes, F.R. Oliveira, M.M. Teixeira, J.S. Silva, I.B. McInnes, S.H. Ferreira, P. Louzada-Junior, F.Y. Liew, and F.Q. Cunha. 2010. IL-33 induces neutrophil migration in rheumatoid arthritis and is a target of anti-TNF therapy. *Ann Rheum Dis* 69:1697-1703.
- Xu, D., H.R. Jiang, Y. Li, P.N. Pushparaj, M. Kurowska-Stolarska, B.P. Leung, R. Mu, H.K. Tay, A.N. McKenzie, I.B. McInnes, A.J. Melendez, and F.Y. Liew. 2010. IL-33 exacerbates autoantibody-induced arthritis. *J Immunol* 184:2620-2626.
- Yazdi, A.S., G. Guarda, N. Riteau, S.K. Drexler, A. Tardivel, I. Couillin, and J. Tschopp. 2010. Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through release of IL-1alpha and IL-1beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:19449-19454.
- Yin, H., X.Y. Li, B.H. Yuan, B.B. Zhang, S.L. Hu, H.B. Gu, X.B. Jin, and J.Y. Zhu. 2011. Adenovirus-mediated overexpression of soluble ST2 provides a protective effect on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Clin Exp Immunol* 164:248-255.
- Zhao, W.H., and Z.Q. Hu. 2012. Up-regulation of IL-33 expression in various types of murine cells by IL-3 and IL-4. *Cytokine* 58:267-273.

1.2 L'axe IL-33/ST2 est précocement impliqué dans la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine

La fibrose pulmonaire est une maladie incurable et dont on ne sait pas grand-chose, notamment en ce qui concerne le rôle que peut jouer l'IL-33 lors de l'inflammation aiguë. Le modèle d'induction de la fibrose par la bléomycine a été utilisé pour l'étude de cette pathologie. En effet, la bléomycine est capable d'induire une fibrose pulmonaire, chez les patients et chez la souris.

Plusieurs études montrent que la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine, est en partie dépendante de l'IL-33.

L'IL-33 est décrite dans la littérature comme étant un facteur aggravant de l'inflammation et de la fibrose pulmonaire dans le modèle bléomycine. Il a également été montré que ce rôle pro-inflammatoire serait dépendant de ST2 puisque les souris ST2^{-/-} et qui sont soumises à la bléomycine, ont une inflammation et une fibrose pulmonaire réduite ([Li et al., 2014b](#)). D'autres articles font aussi état du rôle anti-inflammatoire de ST2 en utilisant une lignée murine qui surexprime le ST2 soluble, ces études montrent que ces souris présentent une inflammation pulmonaire moins importante par rapport aux souris contrôles, ne surexprimant pas de ST2 soluble. Dans ce cas-là, l'action pro-inflammatoire de l'IL-33 est neutralisée par son récepteur soluble ([Mato et al., 2009](#)).

Un des principaux axes de recherche de l'équipe, a été l'étude des mécanismes mis en jeu lors de l'inflammation et la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine. Les travaux précédents ont notamment démontré l'importance de l'IL-1 α et β dans la fibrose et l'inflammation pulmonaire, et ont établi le lien entre ces cytokines et l'activation de l'inflammasome NLRP3 ([Riteau et al., 2010a](#)). De plus l'équipe a pu montrer l'augmentation de l'expression de l'IL-33 dans les poumons après l'instillation de bléomycine, suggérant un rôle de l'IL-33 dans ce modèle, dont la mécanistique lors de la phase aiguë demeure peu claire dans la littérature.

L'objectif de cette étude est donc de préciser le rôle de l'IL-33 et de ST2 dans ce modèle d'une part, mais aussi de montrer, d'autre part, que l'imagerie à résonance magnétique (IRM), méthode non invasive, peut être utilisée en complément des analyses *post mortem* pour suivre l'évolution de la fibrose pulmonaire dans le modèle murin. Vingt-quatre heures après l'instillation de bléomycine, en phase d'inflammation pulmonaire précoce, les souris ST2^{-/-} présentent comme décrit une inflammation plus importante que celle observée chez les souris WT, et ont une activation de la cathepsine G qui est corrélée avec le recrutement de cellules pro-inflammatoires comme les neutrophiles. Lors de la phase de fibrose pulmonaire, l'inflammation est aussi plus importante chez les souris ST2^{-/-}, que celle observée chez les souris WT. Nous observons en plus du recrutement des lymphocytes dans les poumons, une production de cytokines pro-inflammatoires dont l'IL-33. L'instillation de bléomycine induit la production de la forme entière et des formes clivées de l'IL-33. Il semblerait que l'IL-33 puisse alors jouer un rôle anti-inflammatoire, puisque les souris ST2^{-/-} présentent une augmentation de l'inflammation. Mais il est probable que l'IL-33 puisse aussi avoir un rôle pro-inflammatoire qui se rapprocherait de ce que l'on a pu observer dans le modèle d'inflammation pulmonaire aux nanoparticules.

Grâce à l'IRM, la fibrose observée chez les animaux instillés peut être associée à l'apparition d'un œdème pulmonaire au niveau des bronches mais pas des bronchioles de la souris. Cet œdème peut être corrélé à la gravité de la maladie, car plus important chez les souris ST2^{-/-}. Avec cet article, nos résultats suggèrent que l'IL-33 pourrait avoir un rôle anti-inflammatoire dépendant de ST2. Ou alors un rôle pro-inflammatoire dépendant de ST2 mais spécifiquement en intracellulaire. De plus, l'IRM est une technique qui peut être utilisée pour suivre de façon non invasive et *anthé mortem*, l'évolution de la maladie chez la souris, nous permettant de recueillir d'avantages d'informations. Cette technique est à utiliser de concert avec les analyses résultant d'examen *post mortem*, pour permettre une analyse plus complète de la maladie.

L'article ci-dessous est en préparation pour une soumission.

IL-33/ST2 axis regulates pulmonary inflammation and fibrosis to bleomycin

Manoussa Fanny^{1*}, Isabelle Maillet^{1*}, Ludivine Baron¹, Aurélie Gombault¹, Corinne Schricke¹, Jean-Michel Sallenave², Bernhard Ryffel¹, Valérie Quesniaux¹, William Meme³, Sandra Meme³, Isabelle Couillin¹

University of Orleans and CNRS, UMR7355, Orleans, France¹

University Paris Diderot, INSERM, UMR115, Paris, France²

University of Orleans and CNRS, UPR4301, Orleans, France³

Grant support by the French «Région Centre », « Conseil Général du Loiret » and «Fonds de Dotation pour la Recherche en Santé Respiratoire» (France)».

Key words: Bleomycin, Lung, Inflammation, Fibrosis, ST2, IL-33

Running Title:

Address of correspondence to Isabelle Couillin[¶], Experimental and Molecular Immunology and Neurogenetics, UMR7355, 3B rue de la Férollerie 45071 Orleans, France. Phone: 0033 238 25 54 43 Fax: 0033 238 25 79 79.

E-mail: couillin@cnrs-orleans.fr

Abbreviations used in this paper: ST2: Suppression of Tumorigenicity 2; IL-33, Interleukin-33; BLM, Bleomycin; Th2, T helper type 2; sST2, soluble ST2;

Abstract

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a progressive devastating, yet untreatable fibrotic disease of unknown origin. Interleukin (IL)-33, a member of the IL-1 family is constitutively expressed in the nucleus of endothelial or epithelial cells exposed to the environment, released after stress or cell death as an alarmine with has pro-inflammatory properties. Nuclear IL-33 also regulates gene transcription. Here we ask the role of IL-33 in lung inflammation and fibrosis in the bleomycin-induced injury and fibrosis model using deficient mice for the IL-33 receptor chain ST2 (ST2^{-/-}). We report an exacerbated inflammatory response to bleomycin in ST2-deficient mice with increased neutrophil recruitment and chemokine levels in BALF and enhanced IL-1 α and IL-1 β levels in BALF and/or lung at 24h as compared to WT (C57Bl/6) mice. Furthermore, the chronic inflammation and lung fibrosis at day 14 was augmented in absence of ST2. *In vivo* MRI analysis demonstrates a rapid development of edema upon bleomycin administration, which is detectable after 1 day and augments at day 7 and 14. Importantly, the MRI signals are much stronger in the absence of ST2. The data correlate with the inflammatory parameters and microscopic data. In conclusion, magnetic resonance imaging (MRI) allows a rapid non-invasive detection of lung edema and inflammation which is augmented in absence of ST2.

Introduction

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a progressive, chronic, irreversible and lethal lung disease. The disease process is initiated through alveolar epithelial cell microinjuries that lead to a persistent immuno-inflammatory phase with production of cytokines, chemokines and growth factors responsible for the expansion of fibroblast and myofibroblast populations ([Wynn, 2011](#)). This phase is characterized by an important lung's edema associated with a high level of pro-inflammatory cytokine and chemokine production. The expansion of fibroblasts and myofibroblasts leads to the dysregulation of tissue repair, and then induce the parenchyma destruction ([King et al., 2011](#); [Wilson and Wynn, 2009](#)). Many forms of the disease are promoted, at least initially by a strong

inflammatory response ([Wynn, 2011](#)) and studies on the role of inflammation and immunity in fibrotic diseases are needed to better understand the mechanisms involved ([Blackwell et al., 2014](#); [Crystal et al., 2002](#)). Thus far, no therapy is described to be effective enough to prolong survival of the patient. Nowadays, symptoms and CT scan are used together as the best technique to diagnose IPF. We previously showed that bleomycin promotes extracellular ATP as a danger signal through its receptor P2X7 and leads to NLR pyrin domain containing 3 (NLRP3) inflammasome-dependent IL-1 β secretion and lung fibrosis. However the role of interleukin-33 (IL-33) and its receptor ST2 in the fibrosis mediated by bleomycin is poorly referenced into the literature.

IL-33 is an IL-1-like cytokine constitutively produced and expressed in the nucleus of endothelial and/or epithelial cells and involved in maintaining barriers ([Baekkevold et al., 2003](#)). IL-33 acts as a dual-function protein, with both nuclear and extracellular effects when may be released as a danger signal upon cellular damage ([Kuchler et al., 2008](#); [Moussion et al., 2008](#)). After synthesis in the cytosol, IL-33 translocates into the nucleus, where it associates with chromatin ([Carriere et al., 2007](#); [Pichery et al., 2012](#); [Roussel et al., 2008](#); [Sundnes et al., 2015](#)). Extracellular IL-33 interacts with the ST2 receptor which is either expressed on the cell surface (membrane-bound ST2L) or shed from these cells (soluble ST2, sST2), thereby functioning as a “decoy” receptor to bind and efficiently inhibit IL-33 activity ([Hayakawa et al., 2007](#)). ST2L is closely related to the IL-1R1 (IL-1 receptor 1) and binding of IL-33 on ST2L activates NF- κ B pathway ([Schmitz et al., 2005](#)), suggesting that it regulates the response ([Hayakawa et al., 2007](#); [Yin et al., 2011](#)). IL-33 is produced as a precursor or in full-length form (266 in mice) with the typical IL-1-like cytokine domain localized at the C terminal ([Kurowska-Stolarska et al., 2009](#)). Unlike IL-1 β , full-length IL-33 is bioactive and may be processed by serine proteases secreted by activated neutrophils, generating 20 to 30-fold more active forms ([Lefrancais et al., 2014](#)). Using mouse model of bleomycin (BLM)-induced disease, IL-33 was known to promote lung fibrosis in a ST2-dependent manner through the induction of alternatively activated macrophages and innate lymphoid cells ([Li et al., 2014b](#)) and soluble form of ST2 suppressed the initial stage of BLM-induced lung injury ([Mato et al., 2009](#)).

The increased concentration of sST2 in serum was shown to be a biomarker idiopathic pulmonary fibrosis ([Tajima et al., 2003](#)). Full-length IL-33 was shown to have pro-inflammatory and pro-fibrotic effects through its intracellular form, IL-33 remaining predominantly intracellular ([Luzina et al., 2012](#)). However the role of IL-33 and IL-33/ST2 signaling in establishment of pulmonary inflammation and fibrosis is not well understood. In particular, studies using new tool such as magnetic resonance imaging (MRI) may allow analyzing the impact of inflammation on fibrotic development in vivo, following the same animal without during disease progression. MRI is a medical imaging technique used in diagnostic medicine and biomedical research to image body anatomy and physiological processes in both health and disease. MRI is based upon the science of nuclear magnetic resonance. Hydrogen atoms are used to generate a detectable radio-frequency signal. Hydrogen atoms exist naturally in abundance in biological organisms, particularly in water and fat. For this reason, most MRI scans essentially map the location of water and fat in the body. Our study following mouse instilled with bleomycin by both classical immunologic methods and by MRI analyzing indicates that MRI is a good way to monitor pulmonary inflammation and fibrosis in particular through looking at the evolution of edema in mouse lung. In addition, our results showed increasing inflammation and fibrosis in absence of ST2 in absence of extracellular IL-33 suggesting more complex mechanisms involving preferentially intracellular IL-33.

Results

ST2 deficient mice presented an exacerbated inflammatory response to bleomycin 24hrs after exposure.

Bleomycin (BLM) airway instillation caused an acute lung inflammation 24h after exposure as reported before (Couillin et al 2005). Lung inflammation was characterized by increased recruitment of total cells (Fig. 1A), essentially neutrophils (Fig. 1B) in the airway of C57BL/6 (WT) mice, which was drastically augmented in ST2^{-/-} mice. Exacerbated neutrophil recruitment was associated with increased levels of the neutrophilic chemokine CXCL1/KC in lung (Fig. 1C)

and the monocytes chemokine CCL2/MCP-1 in BALF and lung (Fig. 1D-E). In addition, levels of the remodeling factors MMP9 (Fig. 1 F-G) and TIMP-1 (Fig. 1H-I) were more important in BALF and lung of ST2^{-/-} in comparison to WT mice. In view of the drastic increase of neutrophils, we investigated the activity of the neutrophil protease cathepsin G, which is known to activate IL-33 through proteolytic cleavage ([Lefrancais et al., 2012](#)). We found increased protease activity in BALF of BLM-instilled ST2^{-/-} mice compared to WT mice (Fig. 1J).

Pulmonary inflammation and edema were present in bronchus airway but not in bronchioles 14 d after BLM

In order to visualize the BLM-induced lung inflammation and fibrosis, we realized *in vivo* MRI and histological analysis. Noninvasive assessment by MRI was performed to study the time course effects of BLM instillation in WT (C57Bl/6) mice before and after 1, 7 and 14 days after BLM intranasal instillation. MRI recording were done at two levels corresponding to slice 1 and 2 and Fig. 2A shows representative axial slices through the chest of control animals acquired at different time points with respect to vehicle (NaCl) or BLM instillation. Different compartments were identified (Fig. 2B). There was no significant difference in signal intensity in the lungs following NaCl instillation at any time point throughout the duration of the experiment. No change in MRI parameters was observed 24h after BLM instillation. However, axial sections show that a marked edematous signal was detected 14 days following BLM challenge and this signal was increased 14 days after the treatment in control groups (Fig. 2C). BLM-induced edema was observed around bronchi, but not around smaller secondary and tertiary bronchi known as bronchioles indicating inflammation of upper airways (large airways) rather than lower airways (small airways) at these stages. The difference of signals was quantified and represented as a graph (Fig. 2D). Finally, MRI data were completed by microscopic analysis of the lung at day 14 after BLM. Strong inflammatory cell recruitment and interstitial fibrosis with fibroblast foci were observed in BLM-treated to WT

mice in comparison to saline treated mice (Fig. 2E) (scoring). These findings correlated with a significant increase in inflammatory cells in BAL fluid analysis.

Exacerbated lung inflammation and fibrosis in absence of ST2 at day 14 after BLM

To investigate the role of the IL-33 receptor ST2 in BLM-induced chronic inflammation and fibrosis, WT and ST2 deficient (ST2^{-/-}) mice were instilled with one dose of BLM and inflammation. We observed a drastic increase of total cells, macrophages, lymphocytes and neutrophils in BALF (Fig. 3A-D) in ST2^{-/-} mice as compared with WT controls at day 14 after BLM. In addition the neutrophilic chemokine KC and the B cell activating factor or (BAFF) levels were greatly enhanced in BALF of in ST2^{-/-} versus WT mice treated with BLM (Fig. 3E-F). Concomitant with enhanced the lung pathology, ST2^{-/-} mice presented clinical signs of disease as reflect with loss of body weight and absence of recovery during the study (Fig. 3G). In view of the enhanced inflammatory response we assessed the morphology of the lesions by in vivo MRI and compared it to microscopic analysis.

Augmented edema in bronchi in absence of ST2 after BLM instillation at day 14

Thus we performed MRI of ST2^{-/-} mice before or day 1, 7 and 14 after BLM exposure. In absence of ST2 an increased edema was found in the bronchi, but not in bronchioles. This edema was characterized by augmentation of the MRI signal (in white) (Fig. 4A). This difference of signals was quantified as shown in the graph (Fig. 4B). Microscopic investigations revealed a significant increase of inflammation and fibrosis in the absence of ST2 as shown by representative microphotographs and semi-quantitative severity scores (data not shown). This result shows that ST2^{-/-} mice present a stronger edema in bronchus compare to WT mice. Moreover the data remonstrate the inflammation are stronger and develop fast in absence of ST2.

Discussion

We observed reported before that bleomycin (BLM) induced pulmonary inflammation through the inflammasome-dependent release of IL-1 β expression and IL-1R1 signaling ([Gasse et al., 2007](#); [Gasse et al., 2009](#); [Gasse et al., 2011](#); [Luzina et al., 2012](#); [Riteau et al., 2010a](#); [Yazdi et al., 2010](#)). Analyzing the controversial role of IL-33 in BLM-induced mouse pathology, we observed exacerbated inflammation and fibrosis in absence of the IL-33 receptor ST2 with increased neutrophil recruitment and chemokine levels in the bronchoalveolar space and enhanced IL-1 α and IL-1 β pro-inflammatory cytokines in bronchoalveolar space and lung parenchyma as compared to WT (C57Bl/6) mice, 24h after BLM airway instillation. MRI analysis demonstrates a rapid development of edema upon BLM administration, which is detectable after 1 day and augments at day 7 and 14. Importantly, the MRI signals are much stronger in the absence of ST2. IL-33 activates various types of cells by binding to its receptor complex consisting of ST2 and the IL-1 receptor accessory protein (IL-1RAcP). Nevertheless IL-33 was not present in the bronchoalveolar space. Results might be explained by increasing availability of the IL-1RAcP chain for interaction with IL-1R1, enhancing pulmonary inflammation induced by IL-1 α and IL-1 β which are also induced upon nanoparticles. Another possibility is that intracellular IL-33 is involved in the inflammatory processes observed. Indeed, the functional role of nuclear IL-33 in myeloid cell remains poorly studied. Increased IL-33 expression was reported in lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) disease, as well as in BLM injury mouse model but most of the observed IL-33 expression was intracellular and intranuclear ([Luzina et al., 2012](#)). Interestingly, we reported exacerbated pulmonary inflammation upon mouse silica dioxide nanoparticles (nano-SiO₂)-exposure in ST2 deficient mice in comparison to C57Bl/6 mice (Fanny et al, Submitted). ST2-mediated retention of IL-33 in the cytosol as a mechanism to regulate the pro-inflammatory effect of nuclear IL-33 upon nanoparticles (Fanny et al, Submitted). The same mechanisms might be involved in response to BLM instillation since inflammation characteristics induced by nano-SiO₂

or BLM were quite similar. Indeed IL-33 was shown to have pro-inflammatory and pro-fibrotic effects through its intracellular form, IL-33 remaining predominantly intracellular ([Luzina et al., 2012](#)). IL-33 was described as pro-inflammatory and pro-fibrotic regulator acting by stimulating of non-Th2 cytokines gene expression in particular expression of HSP70. Nevertheless BLM-induced changes were not affected by ST2 deficiency ([Luzina et al., 2012](#)). Contradictory results were reported since IL-33 was known to promote BLM-induced lung fibrosis in a ST2-dependent manner through the induction of alternatively activated macrophages and innate lymphoid cells ([Li et al., 2014b](#)) and soluble form of ST2 suppressed the initial stage of BLM-induced lung injury ([Mato et al., 2009](#)). This discrepancy may be explained by differences in experimental protocols. Nevertheless, using both classical immunologic methods and by MRI analyzing, we observed similar results which are increasing inflammation and fibrosis in absence of the extracellular IL-33. In conclusion, magnetic resonance imaging (MRI) allows a rapid non-invasive detection of lung edema and inflammation and is a good way to monitor pulmonary inflammation and fibrosis.

Materiel and Methods

Mice

C57Bl/6J Wild type (WT) mice were purchased from Janvier Labs (Le Genest Saint Isle, France). ST2-deficient mice (ST2^{-/-}) on C57Bl/6J background were generated and provided by Andrew N.J. McKenzie (Medical Research Council Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK) ([Townsend et al., 2000](#))

Treatments. Bleomycin sulfate (3 mg/kg; Bellon Laboratories), in saline or saline alone, were given through the airways by nasal instillation in a volume of 40 µl under light ketamine-xylasine anesthesia. The mice were monitored every day and pass trthrough the MRI machine at Day 0 and day 14 after instillation. 14 days after instillation, mice were sacrificed and BAL was performed as previously described (Gasse et al, 2009).

Differential cell counts were performed on cytopsin preparation (Cytospin 3, Thermo Shandon) after May-Grünwald Giemsa staining (Sigma Aldrich, St Louis, MO) according to the manufacturer's instructions. Differential cell counts were made on 200 cells using standard morphological criteria.

Lung homogenization

After BAL the lungs were perfused with isoton to flush the vascular content. Lungs were homogenized by a rotor-stator (Ultra-turrax®) in 1 ml of PBS. The extract was centrifuged 10 min at 10000 rpm and the supernatant was stored at -80°C before mediator measurements.

Lung histology

The left lobe of lung was fixed in 4% buffered formaldehyde, processed and paraffin embedded under standard conditions. Lung sections of 3 µm were stained with haematoxylin and eosin (H&E). The slides were blindly examined by using a Leica microscope at 200X magnification (Leica, Solms, Germany). Cell infiltration was assessed by a semi-quantitative score (with increasing severity 0-5) by two independent observers.

Mediator measurements

For cytokine determination, BALF supernatants and lung homogenates were analysed by ELISA assay kits for murine KC, CCL2, MMP-9, TIMP-1, BAFF, according to manufacturers' instructions (R&D system, Minneapolis, MN).

Immunoblotting

Protein concentrations were determined in lung tissue by using DCTM protein Assay (BIO-RAD, France, Marnes-la-coquettes). 30 µg of proteins were denatured by boiling (95°C, 5 min) in reducing SDS sample buffer, separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes

(GE Healthcare Life Sciences, Chicago, Illinois, USA). The membranes were blocked 2 hours in 10% non-fat dried milk in Tris-Buffered saline (TBS)-0,1% Tween® 20 and incubated with primary goat anti-IL-33 (R&D Systems Minneapolis; AF3626) antibody or mouse anti-β-actin in 5% non-fat dried milk in TBS-0,1% Tween® 20. Membranes were then washed three times in TBS-0,1% Tween 20 and incubated with the appropriate second antibody conjugated to horseradish peroxidase (anti-goat IgG, and anti-mouse IgG respectively from Sigma Aldrich). Detection was performed with ECL™ Prime Western-blotting system (GE Healthcare Life Sciences). The intensity of bands revealed was quantified by means of densitometry with Multi-application gel imaging system PXi software (Syngene).

Cathepsin G activity dosage

After lung harvest, tissues were homogenized in 1 ml PBS and grinded with FastPrep-24 (MP Biomedicals, 45sec, speed 6, 2 cycles). After centrifugation (10,000 rpm, 10 min, at 4°C), tissue samples, including cathepsin G standards (80pM to 5000pM final concentration) were diluted in Tris-HCL 50 mM, NaCl 150 mM pH 8.1, and assessed for cathepsin G activity in 384 well dark plates, using the specific substrate Boc-Phe-Ser-Arg-MCA (final concentration = 150 μM). Fluorescence (excitation and emission wavelength = 350 nm and 460 nm respectively) was read over a 3 h time period in a *Varioskan™ Flash Multimode Reader* (Thermo scientific) and lung cathepsin G concentration was calculated related to the cathepsin G standard curve.

MRI methodology

MRI was performed on a 9.4T horizontal ultra-shielded superconducting magnet dedicated to small-animal imaging (94/20 USR Bruker Biospec, Wissembourg, France) equipped with a 950mT/m gradient set. A 35 mm Bruker birdcage RF coil was used.

The operational software for acquisition and analysis was Paravision PV5 (Bruker). During MRI acquisition, the mouse was placed in supine position in a cradle made of Plexiglas. The head is

immobilized by means of a bar teeth. Following a short period of induction in a box, anesthesia was maintained with inhaled isoflurane 1.5-2% in a mixture of air/O₂ (1:1) administered with a flow rate of 0.5 l/min via a nose mask. Body temperature was maintained at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ using a warm-water circulation system. Breathing rate was controlled throughout the experiment using a pressure sensor placed on the abdomen. All images were performed by synchronizing the acquisition on the breath of the animal to suppress artifacts caused by movements of the chest. An intragate flash sequence with the following parameters was used throughout the study for the detection of bleomycin-induced lung injury in mice: repetition time 6.9 ms, echo time 3.727 ms, field of view $3 \times 3 \text{ cm}^2$, matrix size 512*512, flip angle=20°, bandwidth 75.7 kHz, slice thickness 570 μm . The total acquisition time was 2mn58s for an axial slice. 3 resolved images (59 x 59 x 570 microns) were recorded with an inter-slice distance of 1mm. The first image is located in the bronchi, and the last in the bronchioles.

MRI image analysis

The area of bleomycin-induced lesions was quantified on each image from the data set. A region of interest (ROI) was drawn to manually segment the lungs. It is worthwhile to mention that this procedure includes vasculature in the segmentation since the signal from oedema and vessels are of comparable intensities particularly in dosed animals. The background noise was measured from each image. Results were expressed as the ratio of the intensity of pixels in the lungs / background noise on each image. The evolution of the intensity of lungs level signal was then studied at the same time point, before (J0) and after instillation of NaCl or bleomycin (J1, 7, 14) in control or ST2ko mice.

Statistical tests

Statistical tests for different populations were analyzed using the Mann-Whitney non-parametric test. The results were considered significant at $p < 0.05$.

Figure legends

Figure 1: ST2 deficient mice presented an exacerbated inflammatory response to bleomycin 24hrs after exposure. Wild type mice and ST2 deficient mice were instilled with 3 mg/kg of bleomycin led to a significant increase of. (A) Total cells (B) and neutrophil influx in the BALF. (C) This influx was correlated in lung with the neutrophil chemoattractant chemokine, KC. (D) monocyte chemoattractant MCP-1 was increased in BALF and lung (E). tissue remodeling factor such as MMP-9 and TIMP-1, were respectively increased in BALF (F-H) and lung (G-I). neutrophil protease activity was measured in BALF (J).

Figure 2: Pulmonary inflammation and edema were present in bronchus airway but not in bronchioles 14 d after BLM. (A) During the MRI experiment 2 slices were made into the lung. (B) On the slides we could see the thoracic aorta, pulmonary veins, the heart and the lung. (C) Compared to WT saline mice, WT bleomycin mice had more edema into the slice 1 of the lung. This edema was quantified and presented as a graph (D). Histology were made and WT bleomycine had an high infiltration of proinflammatory cells into the lung (E).

Figure 3: Exacerbated lung inflammation and fibrosis in absence of ST2 at day 14 after BLM. Wild type mice and ST2 deficient mice were instilled with 3 mg/kg of bleomycin led to a significant increase of: (A) total cells, (B) macrophages, (C) neutrophils and lymphocytes in BALF. The neutrophil influx was correlated with KC level in BALF (E). The B cell activating factor (BAFF) was dosed by ELISA (F) and ST2 deficient mice treated with bleomycin showed higher concentration of BAFF in BALF. (G) 14 days after the instillation, WT treated mice loss more weight than other groups.

Figure 4: Augmented edema in bronchi in absence of ST2 after BLM instillation at day 14.

(A) Compared to ST2 deficient mice intilled with saline mice, ST2 deficient mice treated with bleomycin mice had more edema into the slice 1 of the lung. This edema was quantified and presented as a graph (B).

Figure 1: ST2-deficient mice present an exacerbated inflammatory response to BLM (D1)

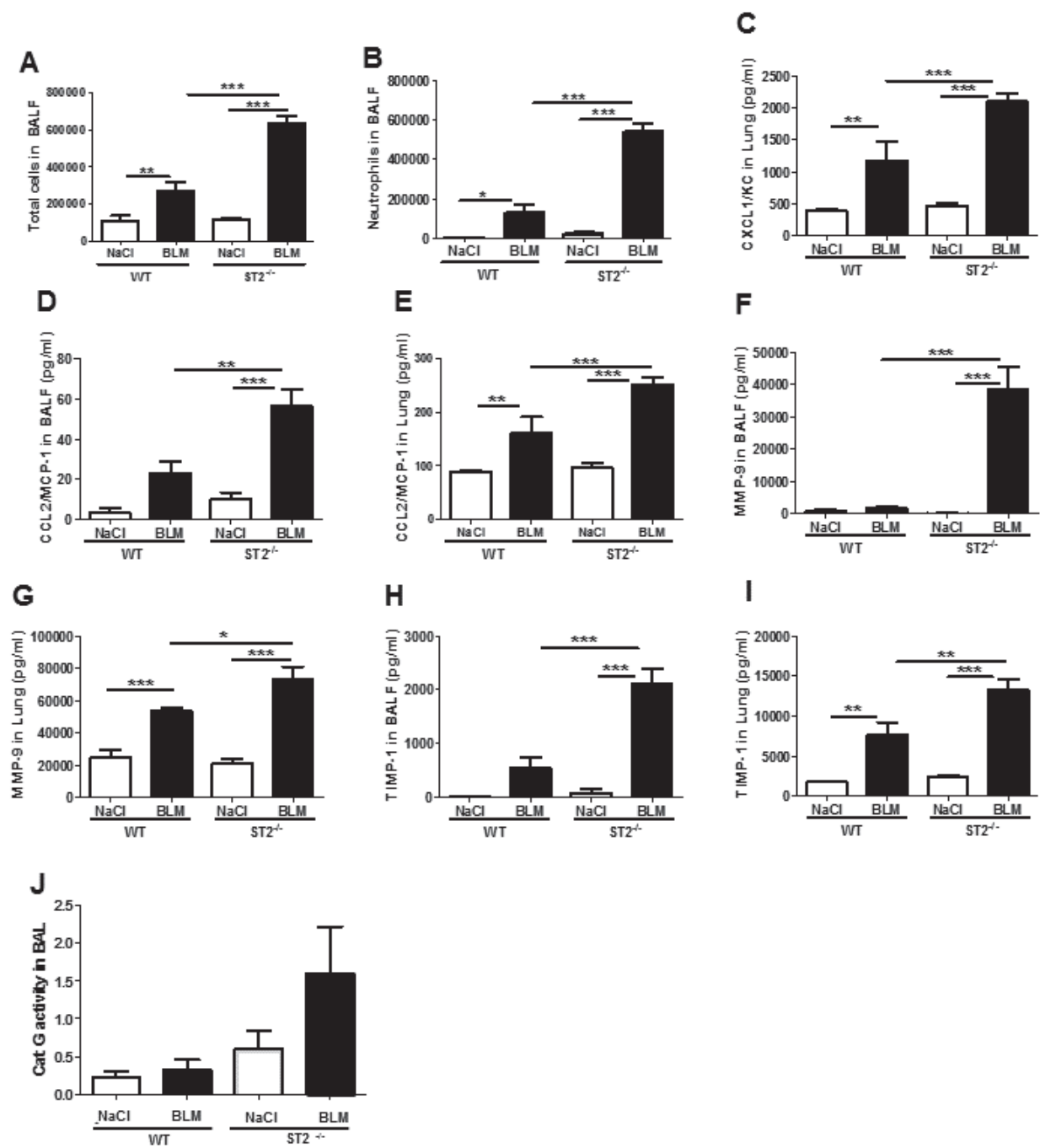


Figure 2: WT mice present exacerbated inflammation to airway BLM (D14)

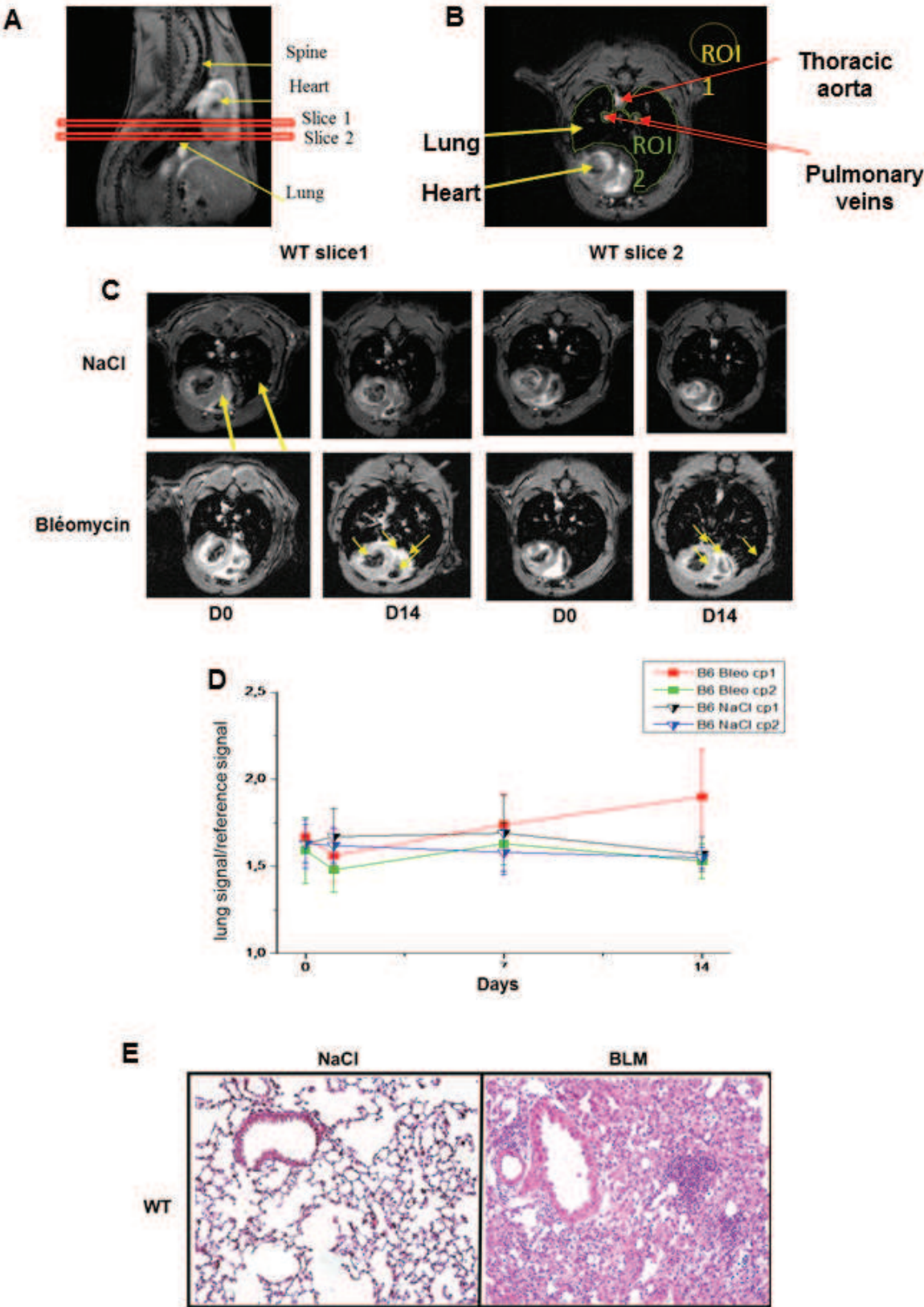


Figure 3: ST2-deficient mice present an exacerbated inflammatory response to BLM (D14)

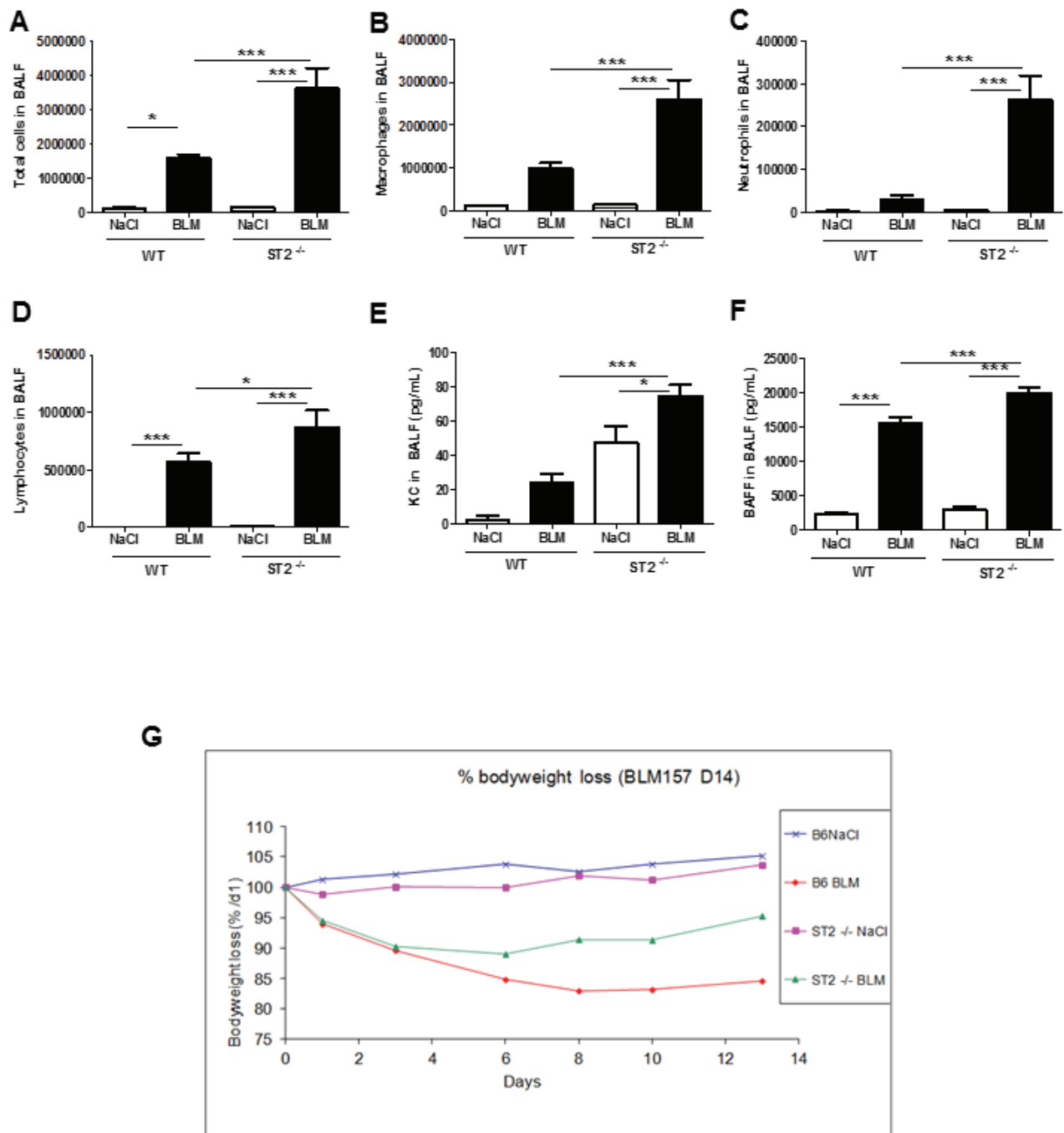
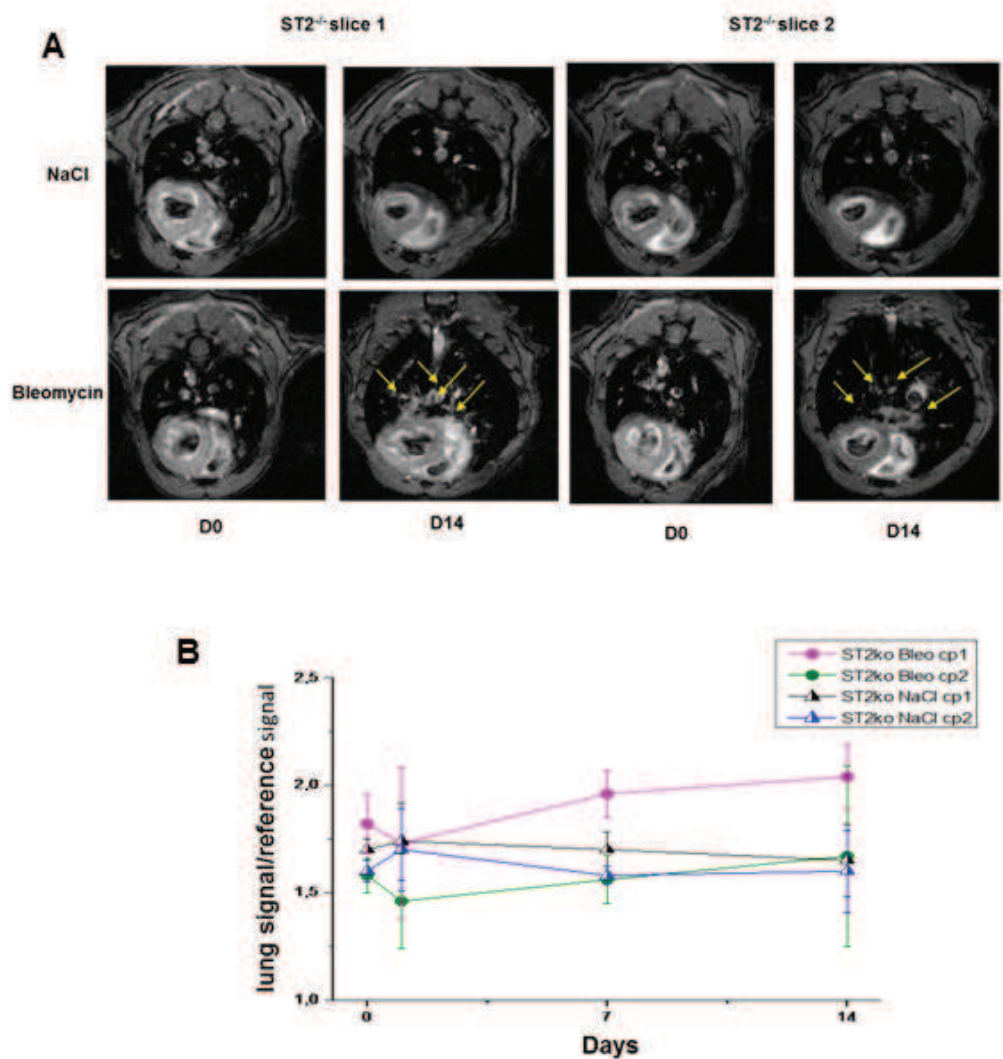


Figure 4 : MRI shows a pulmonary edema in the bronchus airways but not in the bronchioles in ST2-/- mice 14 days after bleomycin instillation



References

- Baekkevold, E.S., M. Roussigne, T. Yamanaka, F.E. Johansen, F.L. Jahnsen, F. Amalric, P. Brandtzaeg, M. Erard, G. Haraldsen, and J.P. Girard. 2003. Molecular characterization of NF-HEV, a nuclear factor preferentially expressed in human high endothelial venules. *Am J Pathol* 163:69-79.
- Blackwell, T.S., A.M. Tager, Z. Borok, B.B. Moore, D.A. Schwartz, K.J. Anstrom, Z. Bar-Joseph, P. Bitterman, M.R. Blackburn, W. Bradford, K.K. Brown, H.A. Chapman, H.R. Collard, G.P. Cosgrove, R. Deterding, R. Doyle, K.R. Flaherty, C.K. Garcia, J.S. Hagood, C.A. Henke, E. Herzog, C.M. Hogaboam, J.C. Horowitz, T.E. King, Jr., J.E. Loyd, W.E. Lawson, C.B. Marsh, P.W. Noble, I. Noth, D. Sheppard, J. Olsson, L.A. Ortiz, T.G. O'Riordan, T.D. Oury, G. Raghu, J. Roman, P.J. Sime, T.H. Sisson, D. Tschumperlin, S.M. Violette, T.E. Weaver, R.G. Wells, E.S. White, N. Kaminski, F.J. Martinez, T.A. Wynn, V.J. Thannickal, and J.P. Eu. 2014. Future Directions in Idiopathic Pulmonary Fibrosis Research. An NHLBI Workshop Report. *Am J Respir Crit Care Med* 189:214-222.
- Carriere, V., L. Roussel, N. Ortega, D.A. Lacorre, L. Americh, L. Aguilar, G. Bouche, and J.P. Girard. 2007. IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:282-287.
- Crystal, R.G., P.B. Bitterman, B. Mossman, M.I. Schwarz, D. Sheppard, L. Almasy, H.A. Chapman, S.L. Friedman, T.E. King, Jr., L.A. Leinwand, L. Liotta, G.R. Martin, D.A. Schwartz, G.S. Schultz, C.R. Wagner, and R.A. Musson. 2002. Future research directions in idiopathic pulmonary fibrosis: summary of a National Heart, Lung, and Blood Institute working group. *Am J Respir Crit Care Med* 166:236-246.
- Gasse, P., C. Mary, I. Guenon, N. Noulain, S. Charron, S. Schnyder-Candrian, B. Schnyder, S. Akira, V.F. Quesniaux, V. Lagente, B. Ryffel, and I. Couillin. 2007. IL-1R1/MyD88 signaling and the inflammasome are essential in pulmonary inflammation and fibrosis in mice. *J Clin Invest* 117:3786-3799.
- Gasse, P., N. Riteau, S. Charron, S. Girre, L. Fick, V. Petrilli, J. Tschopp, V. Lagente, V.F. Quesniaux, B. Ryffel, and I. Couillin. 2009. Uric acid is a danger signal activating NALP3 inflammasome in lung injury inflammation and fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 179:903-913.
- Gasse, P., N. Riteau, R. Vacher, M.L. Michel, A. Fautrel, F. di Padova, L. Fick, S. Charron, V. Lagente, G. Eberl, M. Le Bert, V.F. Quesniaux, F. Huaux, M. Leite-de-Moraes, B. Ryffel, and I. Couillin. 2011. IL-1 and IL-23 mediate early IL-17A production in pulmonary inflammation leading to late fibrosis. *PLoS One* 6:e23185.
- Hayakawa, H., M. Hayakawa, A. Kume, and S. Tominaga. 2007. Soluble ST2 blocks interleukin-33 signaling in allergic airway inflammation. *J Biol Chem* 282:26369-26380.
- King, T.E., Jr., A. Pardo, and M. Selman. 2011. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet* 378:1949-1961.
- Kuchler, A.M., J. Pollheimer, J. Balogh, J. Sponheim, L. Manley, D.R. Sorensen, P.M. De Angelis, H. Scott, and G. Haraldsen. 2008. Nuclear interleukin-33 is generally expressed in resting endothelium but rapidly lost upon angiogenic or proinflammatory activation. *Am J Pathol* 173:1229-1242.
- Kurowska-Stolarska, M., B. Stolarski, P. Kewin, G. Murphy, C.J. Corrigan, S. Ying, N. Pitman, A. Mirchandani, B. Rana, N. van Rooijen, M. Shepherd, C. McSharry, I.B. McInnes, D. Xu, and F.Y. Liew. 2009. IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. *J Immunol* 183:6469-6477.
- Lefrancais, E., A. Duval, E. Mirey, S. Roga, E. Espinosa, C. Cayrol, and J.P. Girard. 2014. Central domain of IL-33 is cleaved by mast cell proteases for potent activation of group-2 innate lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:15502-15507.

- Lefrancais, E., S. Roga, V. Gautier, A. Gonzalez-de-Peredo, B. Monsarrat, J.P. Girard, and C. Cayrol. 2012. IL-33 is processed into mature bioactive forms by neutrophil elastase and cathepsin G. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:1673-1678.
- Li, D., R. Guabiraba, A.G. Besnard, M. Komai-Koma, M.S. Jabir, L. Zhang, G.J. Graham, M. Kurowska-Stolarska, F.Y. Liew, C. McSharry, and D. Xu. 2014. IL-33 promotes ST2-dependent lung fibrosis by the induction of alternatively activated macrophages and innate lymphoid cells in mice. *J Allergy Clin Immunol* 134:1422-1432 e1411.
- Luzina, I.G., E.M. Pickering, P. Kopach, P.H. Kang, V. Lockatell, N.W. Todd, J.C. Papadimitriou, A.N. McKenzie, and S.P. Atamas. 2012. Full-length IL-33 promotes inflammation but not Th2 response in vivo in an ST2-independent fashion. *J Immunol* 189:403-410.
- Mato, N., M. Fujii, Y. Hakamata, E. Kobayashi, A. Sato, M. Hayakawa, H. Ohto-Ozaki, M. Bando, S. Ohno, S. Tominaga, and Y. Sugiyama. 2009. Interleukin-1 receptor-related protein ST2 suppresses the initial stage of bleomycin-induced lung injury. *Eur Respir J* 33:1415-1428.
- Moussion, C., N. Ortega, and J.P. Girard. 2008. The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel 'alarmin'? *PLoS One* 3:e3331.
- Pichery, M., E. Mirey, P. Mercier, E. Lefrancais, A. Dujardin, N. Ortega, and J.P. Girard. 2012. Endogenous IL-33 is highly expressed in mouse epithelial barrier tissues, lymphoid organs, brain, embryos, and inflamed tissues: in situ analysis using a novel IL-33-LacZ gene trap reporter strain. *J Immunol* 188:3488-3495.
- Riteau, N., P. Gasse, L. Fauconnier, A. Gombault, M. Couegnat, L. Fick, J. Kanellopoulos, V.F. Quesniaux, S. Marchand-Adam, B. Crestani, B. Ryffel, and I. Couillin. 2010. Extracellular ATP is a danger signal activating P2X7 receptor in lung inflammation and fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 182:774-783.
- Roussel, L., M. Erard, C. Cayrol, and J.P. Girard. 2008. Molecular mimicry between IL-33 and KSHV for attachment to chromatin through the H2A-H2B acidic pocket. *EMBO Rep* 9:1006-1012.
- Schmitz, J., A. Owyang, E. Oldham, Y. Song, E. Murphy, T.K. McClanahan, G. Zurawski, M. Moshrefi, J. Qin, X. Li, D.M. Gorman, J.F. Bazan, and R.A. Kastelein. 2005. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* 23:479-490.
- Sundnes, O., W. Pietka, T. Loos, J. Sponheim, A.L. Rankin, S. Pflanz, V. Bertelsen, J.C. Sitek, J. Hol, G. Haraldsen, and D. Khnykin. 2015. Epidermal Expression and Regulation of Interleukin-33 during Homeostasis and Inflammation: Strong Species Differences. *J Invest Dermatol* 135:1771-1780.
- Tajima, S., K. Oshikawa, S. Tominaga, and Y. Sugiyama. 2003. The increase in serum soluble ST2 protein upon acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 124:1206-1214.
- Townsend, M.J., P.G. Fallon, D.J. Matthews, H.E. Jolin, and A.N. McKenzie. 2000. T1/ST2-deficient mice demonstrate the importance of T1/ST2 in developing primary T helper cell type 2 responses. *J Exp Med* 191:1069-1076.
- Wilson, M.S., and T.A. Wynn. 2009. Pulmonary fibrosis: pathogenesis, etiology and regulation. *Mucosal Immunol* 2:103-121.
- Wynn, T.A. 2011. Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis. *J Exp Med* 208:1339-1350.
- Yazdi, A.S., G. Guarda, N. Riteau, S.K. Drexler, A. Tardivel, I. Couillin, and J. Tschopp. 2010. Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through release of IL-1alpha and IL-1beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:19449-19454.
- Yin, H., X.Y. Li, B.H. Yuan, B.B. Zhang, S.L. Hu, H.B. Gu, X.B. Jin, and J.Y. Zhu. 2011. Adenovirus-mediated overexpression of soluble ST2 provides a protective effect on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Clin Exp Immunol* 164:248-255.

1.3 Le récepteur NLRP6 régule l'inflammation induite par la fumée de cigarette

L'équipe s'est beaucoup intéressée au rôle de l'inflammasome NLRP3 dans l'inflammation pulmonaire (notamment fibrose). L'ATP a été mis en évidence comme étant un signal de danger produit lors de l'inflammation en réponse à la bléomycine ou aux microparticules. Ce signal conduit à l'activation de l'inflammasome NLRP3, qui augmente l'inflammation en permettant la maturation de l'IL-1 β ([Yazdi et al., 2010](#)). Ce mécanisme a également été mis en évidence sur une lignée de macrophages humains, les THP-1 ([Baron et al., 2015](#)). De nombreux articles font état du rôle controversé que peut avoir l'inflammasome NLRP3. En effet, NLRP3 est décrit comme étant indispensable au développement de la BPCO ([Yang et al., 2015](#)) ([Sobradillo et al., 2014](#)) ; mais la littérature fait peu état de la phase aiguë du développement de cette pathologie. En revanche ce qui est connu, toujours en relation avec NLRP3, c'est qu'il ne serait pas impliqué dans la phase aiguë / subaiguë de la pathologie ([Pauwels et al., 2011](#)) ([Di Stefano et al., 2014a](#)). La première cause connue de BPCO dans le monde est la fumée de cigarette. L'équipe a donc utilisé ce modèle d'induction pour l'étude de cette maladie.

D'autre part, des études sur NLRP6, un autre membre de la famille NLRP, commencent à émerger en particulier dans le contexte intestinal. Ainsi, il a été montré que NLRP6 était fortement exprimé par les cellules épithéliales intestinales et que l'activation de NLRP6 était induite par des métabolites produits par le microbiote intestinal tels que la taurine, l'histamine ou la spermine ([Levy et al., 2015](#)). Une fois activé, NLRP6 adopte la forme d'un inflammasome et régule la sécrétion de mucus dans l'intestin par les cellules caliciformes, la production d'IL-18 et par ce biais, est intimement impliqué dans la composition du microbiote intestinal ([Wlodarska et al., 2014a](#)).

Dans le contexte de la BPCO, les cellules épithéliales pulmonaires sont les premières cellules endommagées par la fumée de cigarette ; au vu de son rôle de régulateur de la sécrétion de mucus dans les intestins, et de ce qui est connu de la phase aiguë de la BPCO, il devient alors intéressant de se demander si ce récepteur NLRP6 serait potentiellement impliqué dans l'inflammation pulmonaire provoqué par l'exposition à la fumée de cigarette.

Nos résultats montrent alors que les souris déficientes pour NLRP6 (NLRP6^{-/-}) sont protégées de l'inflammation induite par la fumée de cigarette. NLRP6 serait donc indispensable à l'inflammation pulmonaire dans ce modèle.

Nous avons d'autre part exposé des souris déficientes pour NLRP3 (NLRP3^{-/-}), ASC (ASC^{-/-}), ou la caspase 1/11 (CASP^{-/-}) et nous avons constaté chez ces souris la même diminution des paramètres pro-inflammatoires que celle observée chez les souris NLRP6^{-/-}.

Conformément à la littérature, nous confirmons donc l'implication de l'inflammasome NLRP3 dans l'inflammation induite par la fumée de cigarette. Cet effet pourrait-il être lié à NLRP6 ?

Nos premiers Western-blot montrent que l'absence de NLRP6 induit également une diminution de l'expression de NLRP3 et de sa molécule adaptatrice ASC. Ceci suggère que NLRP6 serait alors impliqué dans la régulation de l'expression de l'inflammasome NLRP3.

Notre étude permet de montrer également que le rôle de NLRP6 dans l'inflammation est lié à la production des interférons de type I et III.

Afin de mieux comprendre le mécanisme de protection mis en jeu chez les souris déficientes pour les composants de l'inflammasome NLRP6, des souris chimériques ont été utilisées. Cette expérience montre que l'expression de NLRP6 au sein des cellules résidentes est indispensable au recrutement des neutrophiles ainsi qu'à la production d'IL-1 β pendant l'inflammation causée par la fumée de cigarette. Cependant, nous observons également que la sécrétion de chimiokines comme CXCL5 (ou LIX, produite par les cellules épithéliales) est elle aussi dépendante de

l'expression de NLRP6 au sein des cellules résidentes. De plus ses souris présentent aussi une accumulation de CXCL5 dans le l'espace bronchoalvéolaire. Nous pouvons alors supposer que NLRP6 jouerait un rôle indépendant de la formation d'un inflammasome puisqu'il serait plutôt impliqué ici, dans la régulation de sécrétion de CXCL5. Enfin nous avons également pu noter que la régulation de la sécrétion de CXCL5 opérée par NLRP6 était indépendante de caspase 1 ou 11.

L'article montre alors pour la première fois que NLRP6 peut avoir un rôle indépendant de sa structure d'inflammasome dans les poumons. De plus, notre étude permet pour la première fois d'impliquer NLRP6 dans une réponse inflammatoire pulmonaire en réponse à la fumée de cigarette. Il agirait alors comme régulateur du recrutement de neutrophiles et de la sécrétion par les cellules épithéliales de chimiokines pro-inflammatoires.

L'article ci-dessous est en préparation pour une soumission.

NLRP6 controls epithelial chemokines secretion to cigarette smoke exposure through interferon-type III receptor signaling

Manoussa Fanny¹, Mégane Nascimento¹, Corinne Schricke¹, Marc Le Bert¹, François Erard¹, Lionel Apetoh², Fabrice Trovero³, Mathias Chamaillard⁴, Bernhard Ryffel¹, Aurélie Gombault¹ and Isabelle Couillin¹

¹*University of Orleans and CNRS, INEM-UMR7355, Orleans, France*

²*INSERM; UMR 866, Université de Bourgogne, Dijon, France*

³*Artimmune, Orleans, France*

⁴*Institut PASTEUR INSERM U1019, CNRS UMR 8204, Lille, France*

E-mail : couillin@cnrs-orleans.fr

Keywords: COPD, NLRP6, Inflammation, mice

Running Title: An inflammasome-independent role for lung Nlrp6

Address of correspondence to Isabelle Couillin, Molecular and Experimental Immunology and Neurogenetics, UMR 7355, 3B, rue de la Férollerie, 45071 Orleans, France.

Phone: 0033 238 25 54 43 Fax: 0033 238 25 79 79.

E-mail: couillin@cnrs-orleans.fr

Grant support by the French «Région Centre », « Conseil Général du Loiret » and « Association pour la

Abstract

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a major health problem and patients present chronic obstructive bronchiolitis, mucus hypersecretion and emphysema whose main cause is cigarette smoking (CS). The nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor (NLRP) 6-coupled inflammasome controls epithelium self-renewal and orchestrates colonic host-microbial interface by regulating goblet cell mucus secretion. NLRP6 regulates enteric virus infection in an inflammasome-independent manner. However, the role of NLRP6 in lung homeostasis and diseases remains completely unexplored. Using a COPD model of mouse acute cigarette smoke exposure, we report impaired inflammation and remodeling in mice deficient for *Nlrp6*. We report greatly reduced neutrophils, macrophages and lymphocytes influx into the bronchoalveolar space, decreased levels of the pro-inflammatory factors IL-1 β , IL-6 and BAFF and remodeling factors MMP-9, MMP-12 and TIMP-1 in *Nlrp6* deficient mice. Neutrophils influx and IL-1 β production upon CS-exposure depended on NLRP6 expression in resident cells. Acute pulmonary inflammation and remodeling were slightly more reduced in *Asc*, *Casp-1/11* deficient mice. Nevertheless, we report impaired secretion of the epithelial cell-derived neutrophil-activating chemokines CXCL5/LIX and CXCL15/Lungkine in lung of *Nlrp6*^{-/-} mice indicating a specific role for the NLRP6 sensor in the secretion of epithelial-derived neutrophil chemokines. These chemokines drastically accumulated in parenchyma of *Nlrp6*^{-/-} but not of *Asc*^{-/-} or *Casp-1/11*^{-/-} demonstrating that NLRP6 acts independently of inflammasome activation. Moreover, we report that CS exposure induced type III interferon IFN- λ (IL-28) production in lung which was greatly reduced in *Nlrp6*^{-/-} mice. In addition *IL-28R*^{-/-} mice presented impaired neutrophils recruitment into bronchoalveolar space and accumulation of CXCL5/LIX and CXCL15/Lungkine in lung tissue in response to CS. Our data highlight a new inflammasome-independent function for NLRP6 in the secretion of epithelial-derived neutrophilic chemokines through IL-28/IL-28R signaling leading to airways inflammation.

Introduction

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a chronic inflammatory disease leading to impaired lung functions. COPD is a major health problem since 4 to 10% of the worldwide population is touched by this illness, including 3.5 millions of people in France and COPD has been predicted to become the third cause of death in the world by 2020. Cigarette smoking (CS) is major societal cause of COPD including emphysema with more than 95% of cases in industrialized countries. Inflammation can persist when smoking has stopped at late stages, and still be present even decades later. Rendering the disease more complex are the frequent exacerbations mediated in large part by respiratory infections. Again, current treatments have only limited, if not, efficacy in inhibiting chronic inflammation and ensuing tissue destruction. COPD patients present chronic obstructive inflammation, mucus hypersecretion and emphysema. Chronic inflammation is characterized by the recruitment and activation of both innate (neutrophils and macrophages) and adaptive (T and B lymphocytes) immune cells and formation of lymphoid follicles in the small airways. Pulmonary inflammation in COPD is associated with the expression/production of a myriad of inflammatory mediators including cytokines and chemokines (Brusselle GG et al, Lancet. 2011). In particular, the tripeptide motif containing chemokine family (ELR⁺ CXC) have been shown to be essential for neutrophil activation and recruitment to lung tissue and airway (Clark-Lewis et al., 1993). ELR⁺ CXC chemokines act on target cells via the G-protein-coupled transmembrane receptors CXCR1 and CXCR2. Among ELR⁺ CXC chemokine, CXCL5/ENA78 (epithelial cells derived neutrophil-activating peptide-78) and its mouse homologue CXCL5/LIX (LPS-induced CXC chemokine) were shown to be produced by epithelial cells, promoting neutrophil influx in lung tissue and bronchoalveolar space ([Jeyaseelan et al., 2005](#); [Liu et al., 2011](#); [Vanderbilt et al., 2003](#))(Smith et al., 1997; Rovai et al., 1998). CXCL5/LIX plays a dominant role in mediating neutrophil influx upon LPS inhalation in comparison to CXCL1/KC and CXCL2/MIP-2 ELR⁺ chemokines since its expression in bronchoalveolar lavage space is much more persistent ([Liu et al.,](#)

[2011](#)). In contrast to CXCL1/KC and CXCL2/MIP-2, alveolar macrophages do not secrete CXCL5/LIX during lung inflammation ([Jeyaseelan et al., 2005](#)). Another ELR⁺ CXC chemokine CXCL15/Lungkine produced by lung epithelial cells, is secreted into the alveolar space, favoring directed migration of neutrophils from the interstitial spaces into the airway alveolar space ([Chen et al., 2001](#); [Rossi et al., 1999](#)). Contribution of airway epithelial cells-derived chemokines in inflammation support recent evidences on active contribution of tissue cells to immunity ([Holtzman et al., 2014](#); [Whitsett and Alenghat, 2015](#)).

Using mice model of cigarette smoke and elastase-induced injury, we previously showed that interleukin (IL-) 1 β and the inflammasome adaptor molecule ASC are essential to inflammation, remodeling and emphysema suggesting that inflammasomes are involved in establishment of COPD ([Couillin et al., 2009](#); [Doz et al., 2008](#)). Inflammasomes are cytoplasmic multiprotein complexes that orchestrate diverse functions during homeostasis and inflammation ([Broderick et al., 2015](#); [Martinon and Glimcher, 2006](#); [Martinon et al., 2006](#)). These complexes are composed of Nod-like receptors (NLR), in particular of NLRP3 sensor protein, ASC adaptor molecule and Caspase-1 (CASP-1) or Caspase-11 (CASP-11) protease. Activation of the best known inflammasome NLRP3, leads to the recruitment of ASC and pro-caspase-1 leading to auto-activation of pro-caspase-1 and maturation of pro-IL-1 β and pro-IL-18 in biologically active IL-1 β and IL-18 pro-inflammatory cytokines ([Broderick et al., 2015](#); [Martinon and Glimcher, 2006](#); [Martinon et al., 2006](#)). While the role of IL-1R1 in establishment of experimental COPD was demonstrated, the impact of IL-1 β and NLRP3 inflammasome was controversial ([Botelho et al., 2011](#); [Eltom et al., 2014](#); [Eltom et al., 2011](#); [Pauwels et al., 2011](#)). Nevertheless, the formation of ASC specks was observed in BALF of CS-exposed mice and COPD patients suggesting a role for inflammasomes ([Franklin et al., 2014](#)).

Recent studies highlighted the role of a new inflammasome composed by NLRP6, ASC and CASP-1 in regulating microbiota homeostasis and antibacterial immunity in the intestine ([Elinav et al., 2011a](#); [Normand et al., 2011b](#); [Wlodarska et al., 2014b](#)). Importantly NLRP6 inflammasome was

shown to be a critical orchestrator of goblet cell mucin granule exocytosis. Mucus accumulation and impaired mucus secretion were observed in *Nlrp6* deficient goblet cells of the large intestinal lumen ([Wlodarska et al., 2014b](#)). Moreover new identified intestinal sentinel goblet cells were shown to nonspecifically recognize bacterial compounds leading to NLRP6 inflammasome activation and subsequent calcium ion-dependent mucin exocytosis from sentinel and adjacent goblet cells ([Birchenough et al., 2016](#)). In addition, NLRP6 expression in inflammatory monocytes reduced susceptibility to chemically induced intestinal injury ([Seregin et al., 2016](#)). Importantly, an inflammasome independent role of NLRP6 in the control of enteric virus infection was reported through NLRP6 interaction with an RNA sensor, triggering type I and type III interferon antiviral responses ([Wang et al., 2015a](#)). However, the role of NLRP6 in lung inflammation and repair upon injury remains completely undiscovered. Deciphering the mechanisms of CS-induced pulmonary inflammation in mice, we report an unexpected role for the intracytosolic sensor NLRP6 in controlling lung tissue-derived neutrophilic chemokines secretion, independently of inflammasome complex formation and through activation of interferon type III signaling pathway.

Results

***Nlrp3* or *Nlrp6* deficiency impairs inflammation to cigarette smoke exposure in mice**

Since NLRP6 was shown to regulate intestinal epithelium homeostasis and immunity ([Normand et al., 2011b](#); [Wang et al., 2015a](#); [Wlodarska et al., 2014b](#)), we asked whether NLRP6 plays a role in inflammation developed upon lung injury. To better understand the potential role for an NLRP6 forming inflammasome, we compared inflammatory response induced by CS exposure in wild-type (WT), *Nlrp6* and *Nlrp3* deficient mice. Mice were exposed to cigarette smoke (CS) three times a day, four days a week and during six weeks. Sixteen hours after the last exposure mice were euthanized and the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were performed. Total cells (Fig.1A), macrophages (Fig.1B), neutrophils (Fig.1C), lymphocytes (Fig.1D) recruited into the BALF and in addition BALF levels of MPO (Fig.1E) and BAFF (Fig.1G) induced by CS-exposure, were greatly

reduced in both *Nlrp6*^{-/-} and *Nlrp3*^{-/-} mice suggesting non redundant roles for NLRP3 and NLRP6. Nevertheless BALF levels of the neutrophilic chemokine CXCL1/KC were greatly decreased in *Nlrp3*^{-/-} but less importantly in *Nlrp6*^{-/-} mice (Fig. 1F). Moreover myeloperoxidase (MPO) (Fig.1H) and KC (Fig.1I) levels in the lung homogenates were dependent of NLRP3 but independent of NLRP6 suggesting that NLRP3 and NLRP6 regulate differently neutrophils influx upon CS. Expression of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β (Fig. 1J) and IL-6 (Fig. 1K) in lungs was significantly attenuated in both *Nlrp3*^{-/-} and *Nlrp6*^{-/-} mice. In addition IL-18 mRNA expression was induced by CS and greatly reduced in *Nlrp3*^{-/-} mice but not in *Nlrp6*^{-/-} mice (Fig.1L). Analyzing NLRP3 expression, we observed CS-exposure increased *Nlrp3* mRNA (Fig. 1M) and NLRP3 protein (Fig. 1N) expression but less importantly in *Nlrp6*^{-/-} suggesting that NLRP6 may regulate NLRP3 expression. In addition *Nlrp6* mRNA expression was slightly increased upon CS-exposure suggesting expression in poorly represented cell population (data not shown). In addition, CS-exposure during only 4 days confirmed reduced inflammation in *Nlrp6*^{-/-} in comparison to WT mice with a strong reduction of neutrophils influx into BALF (Suppl. Fig.1A), MPO levels in BALF (Suppl. Fig. 1B). In addition, we showed that IL-1 β (Suppl Fig. 1C), BAFF (Suppl Fig. 1D) and LCN2 (Suppl Fig. 1E) levels in lung were also reduced. The same results were obtained with *Nlrp3*^{-/-} mice (not shown). Altogether, these results suggest that *Nlrp3* and *Nlrp6* are both involved in the inflammatory responses to CS exposure in mice but probably play different roles in establishment of pulmonary inflammation.

***Nlrp3* or *Nlrp6* deficiency impairs the expression of remodeling factors induced by cigarette smoke exposure**

Analysis of proteases involved in establishment of COPD and in particular matrix metalloproteinase (MMP) and their inhibitors, showed that MMP-9 protein levels in BALF (Fig. 2A) and lungs (Fig. 2B), TIMP-1 in BALF (Fig. 2C) and lungs (Fig. 2E) were significantly decreased in both *Nlrp6*^{-/-} and *Nlrp3*^{-/-} mice compared to WT mice as MMP-12 mRNA (Fig. 2E) expression in lungs. In

addition, after one week exposure, reduction of MMP-9 protein levels in BALF (Suppl Fig.2A) and lungs (Suppl Fig.2B) and MMP-12 mRNA (Suppl Fig.2C) expression in lungs were also observed. In addition TIMP-1 protein levels in BALF (Suppl Fig.2D) and lungs (Suppl Fig.2E) were significantly decreased in *Nlrp6*^{-/-} mice compared to WT mice. Histology analysis after 6 weeks exposure showed that tissue inflammation was reduced in *Nlrp3*^{-/-} or *Nlrp6*^{-/-} mice in comparison to WT mice (Fig. 2F). Mucus secretion was weakly induced in WT mice in this model and no significantly increased in *Nlrp6*^{-/-} mice (not shown). Interestingly, WT and *Nlrp6*^{-/-} presented increased weigh loss in comparison to *Nlrp3*^{-/-} mice after 6 weeks of CS exposure (Fig. 2G) suggesting that NLRP6 plays a more important role in lung protection upon injury. These results demonstrate that NLRP6 is a key player in inflammation and remodeling upon acute exposure to CS in mice.

Acute pulmonary inflammation and remodeling are decrease in *Nlrp6*, *Asc*, *Casp-1/11* deficient mice

Since both NLRP3 and NLRP6 were involved in the development of inflammation and remodeling induced by CS exposure, we investigated the role of the inflammasome components *Asc* adaptor molecule and caspase-1 and caspase-11 molecules which may interact with *Nlrp3* and/or *Nlrp6* to form activated complexes, using *Asc*^{-/-} and *Casp-1/11* mice. After one week CS exposure, neutrophil influx (Fig. 3A) and MPO levels (Fig. 3B) in BALF were drastically reduced in *Nlrp6*^{-/-} mice but less importantly in *Asc*^{-/-} and *Casp-1/11*^{-/-} mice suggesting a more central role of *Nlrp6* in comparison to *Asc* and *Casp-1/11*. Nevertheless the inflammatory factors lipocalin2 (LCN2) in BALF (Fig. 3C) and lung (Fig. 3D), IL-1 β (Fig. 3E), BAFF in lung (Fig. 3F), GM-CSF (Fig. 3G) and CCL5/RANTES (Fig. 3H) in lung were similarly reduced in all deficient mice. These results show that *Asc* and *Casp-1/11* proteins are involved in the inflammatory response to CS more probably through the formation of a scaffolding complex with *Nlrp3* receptor since *Nlrp6* seems to play a more key role.

NLRP6 expression in resident cells is necessary to neutrophils influx and IL-1 β production upon CS-exposure

In order to investigate in which cellular compartment Nlrp6 is functional, we next addressed the respective role for bone marrow-derived and lung resident cells for the development of the NLRP6-dependent acute inflammation to CS-exposure. WT (CD45.1) and Nlrp6^{-/-} (CD45.2) mice were given a sub-lethal dose of total body irradiation (2x 5.5 Gy, 3h apart). Lethally irradiated Nlrp6^{-/-} (CD45.2) mice were also reconstituted with bone marrow cells from Nlrp6^{-/-} (CD45.2) bone marrow cells from Nlrp6^{-/-} (CD45.2) or WT (CD45.2) mice. The resulting WT/Nlrp6^{-/-} and Nlrp6^{-/-}/WT chimeric mice were tested for reconstitution of pulmonary alveolar macrophages repopulation, 3 month post-irradiation. Mice were exposed to cigarette smoke (CS) three times a day, four days a week during 6 weeks and the inflammatory response was analyzed. We observed that CS-induced neutrophils recruitment (Fig. 4A), MPO levels (Fig. 4B) in BALF and IL-1 β levels (Fig. 4C) in lung were significantly reduced in CD45.1>Nlrp6^{-/-} mice and Nlrp6^{-/-}>Nlrp6^{-/-} but not in Nlrp6^{-/-}>CD45.1 and CD45.1>CD45.1 in comparison to CD45.1>WT. This shows that Nlrp6-dependent neutrophil influx, MPO and IL-1 β productions in response to CS exposure, were dependent on NLRP6 expression by lung resident cells rather than bone marrow-derived cells. In contrast CXCL1/KC levels in lung were not decreased in each CS-exposed mouse group (Fig. 4E) indicating involvement of both cell types. MMP-9 (Fig. 4F) and TIMP-1 (Fig. 4G) levels were decreased in Nlrp6^{-/-}>CD45.1, CD45.1>Nlrp6^{-/-} and Nlrp6^{-/-}>Nlrp6^{-/-} mice in comparison to CD45.1>WT mice suggesting that NLRP6-dependent production of these factors involved both bone marrow-derived and lung resident cells. Our data indicate that neutrophils influx upon CS exposure depends on NLRP6 expression in resident cells and more likely in lung epithelial cells.

Impaired secretion and parenchyma accumulation of epithelial cell derived chemokines in Nlrp6 deficient mice

Since we assumed that NLRP6 expression in pulmonary epithelial cell is responsible for CS-induced NLRP6-dependent neutrophil influx, we analyzed the expression of epithelial-derived inflammatory factors and in particular expression of the ELR⁺-CXCL chemokine CXCL5/LIX which is crucial in lung inflammation ([Balamayooran et al., 2012](#); [Jeyaseelan et al., 2005](#); [Vanderbilt et al., 2003](#)). After 4 day CS exposure, we confirmed that neutrophil influx induced in WT mice, was drastically impaired in *Nlrp6*^{-/-} mice but less importantly in *Casp-1/11*^{-/-} mice (Fig. 5A). In addition CXCL1/KC levels were importantly decreased in BALF (Fig. 5B) and lung (Fig. 5C) of *Casp-1*^{-/-} mice whereas in *Nlrp6*^{-/-}, CXCL1/KC was significantly decreased in BALF but not in lung suggesting a defect in CXCL1/KC secretion in absence of NLRP6. More importantly, analyzing CXCL5/LIX levels showed that CS induced a strong production of this chemokine in BALF (Fig. 5D) and lung (Fig. 5E) in WT mice as reported ([Nikota et al., 2014](#)). CXCL5/LIX levels in BALF were greatly reduced in BALF of mice deficient for *Nlrp6*, *Asc* or *Casp-1* (Fig. 5D). Nevertheless, CXCL5/LIX levels in lung were very high in *Nlrp6*^{-/-} mice exposed or not to CS (Fig. 5E). This constitutive accumulation of CXCL5/LIX in *Nlrp6*^{-/-} mice parenchyma was not observed in lung of *Asc*^{-/-} or *Casp-1/11*^{-/-} mice (Fig. 5E and F). These results indicate NLRP6 is required for the secretion of CXCL5/LIX likely by pulmonary epithelial cells but independently of the formation of CASP-1 or CASP-11 inflammasomes. Accumulation of CXCL1/KC in lung was observed in CS-exposed mice but not in air-exposed mice. These results suggest that NLRP6 in epithelial cells partially regulates CXCL1/KC secretion, this chemokine being also secreted by lung macrophages. In addition, we show that *Nlrp3* (Fig. 5G) and *Mmp12* (Fig. 5H) mRNA expressions were reduced in *Nlrp6*^{-/-} but in not *Casp-1/11*^{-/-} mice whereas *proIL-18* mRNA (Fig. 5I) were not decreased in *Nlrp6*^{-/-} mice. Altogether, our results suggest that NLRP6 expressed by epithelial cells is required for apical secretion of neutrophilic chemokines CXCL5/LIX and CXCL1/KC, independently of inflammasome activation.

NLRP6 signaling induces type III interferon dependent-inflammation upon cigarette smoke-exposure

Since NLRP6 was recently shown to regulate intestinal innate immunity independently of inflammasome activation through type I/III interferon (IFN) signaling ([Wang et al., 2015a](#)), we investigated inflammatory response to CS exposure in mice deficient for the receptor of type III IFN (IL-28R) chain which associates with the accessory chain IL-10R β to form the functional receptor. We used *Ifnar*^{-/-} and *Il-28r*^{-/-} mice in order to investigate the relative contributions of type I IFN (IFN- λ) and type III IFN (IFN- α , IFN- β) in CS-induced inflammation ([Mordstein et al., 2008](#)). Mice deficient for *Il-28r*, *Ifnar* or *Nlrp6* presented impaired neutrophil (Fig. 6A) and reduced lymphocytes (Fig. 6B) recruited into the BALF demonstrating that similarly to NLRP6, IL-28R and IFNAR signaling are involved in inflammatory response to CS-exposure. Moreover we observed significant reduction in CXCL5/LIX levels in BALF of *Nlrp6*, *Il-28r* and *Ifnar* deficient mice (Fig. 6C). In lung the strong accumulation of CXCL5/LIX in air- and CS-exposed *Nlrp6*^{-/-} mice, was also observed, although less significant in lung of *Il-28R*^{-/-} but not in lung of *Ifnar*^{-/-} mice suggesting that IL-28R signaling is functionally linked to NLRP6 (Fig. 6D). Analyzing the production of CXCL15/Lungkine, another CXC chemokine from lung epithelial cells ([Chen et al., 2001](#); [Rossi et al., 1999](#)), we observed significant reduction in BALF (Fig. 6E) but accumulation in lung (Fig. 6F) in both CS-exposed *Nlrp6*^{-/-} and *Il-28r*^{-/-} mice. In addition, impaired CXCL1/KC levels in BALF (Fig. 6G) and lung (Fig. 6H) were observed in *Il-28r*^{-/-} and *Ifnar*^{-/-} mice but very strong levels of CXCL1/KC in lung of *Nlrp6*^{-/-} mice indicating that CXCL1/KC accumulation in lung depend on NLRP6 but not on IL-28R and IFNAR signaling. Importantly we showed that IL-28 is produced in lung upon CS-exposure (Fig. 6I) and is significantly reduced in CS-exposed *Nlrp6*^{-/-} mice, but not in *Il-28r*^{-/-} mice. Altogether these results suggest that NLRP6 signaling induces type III IFN secretion which interacts with IL-28R expressed on epithelial cells, IL-28/IL-28R signaling leading to apical secretion of the neutrophilic chemokine CXCL5/LIX and CXCL15/Lungkine by pulmonary epithelial cells and to neutrophil influx.

DISCUSSION

Investigating the role of the NLRP6 inflammasome in pulmonary diseases, we report here impaired airway inflammation with drastic reduction of neutrophils, macrophages and lymphocytes recruited into the bronchoalveolar space in response to acute cigarette smoke (CS)-exposure in both *Nlrp6*^{-/-} and *Nlrp3*^{-/-} mice indicating non redundant roles for NLRP3 and NLRP6. Nevertheless myeloperoxidase (MPO) and CXCL1/KC neutrophilic chemokine levels in the lung tissue were dependent of NLRP3 but independent of NLRP6 indicating that NLRP3 and NLRP6 regulate differently neutrophils influx. In mouse, involvement of the NLRP3 inflammasome upon CS-exposure was controversial since NLRP3, CASP-1, IL-1 α , IL-1 β and IL-18 were shown to be essential ([Eltom et al., 2014](#); [Eltom et al., 2011](#); [Pauwels et al., 2011](#)) or dispensable with rather a role for IL-1 α ([Botelho et al., 2011](#)). In human, IL-1 α , IL-1 β , IL-18 ([Botelho et al., 2011](#); [Eltom et al., 2014](#); [Pauwels et al., 2011](#)) were implicated but not NLRP3 ([Di Stefano et al., 2014a](#)). In contrast the role of the unexplored NLRP6 sensor was never reported concerning lung diseases and in particular in COPD. We hypothesized that NLRP3 and NLRP6 play different functions related to cell type differential expression. NLRP6 mRNA was slightly increased in response to CS-exposure suggesting expression in poorly represented cell population. Bone marrow chimera data showed that NLRP6 expression in resident cells was responsible of neutrophils influx and IL-1 β production in response to CS-exposure suggesting NLRP6 expression in pulmonary epithelial cells is involved. Nevertheless, we cannot exclude a role for alveolar macrophages which are irradiation-resistant.

Moreover, expression of remodeling factors was dependent of both bone marrow-derived and lung resident cells. Investigating potential role for a functional NLRP6 inflammasome complex, we report more drastic impairment of pulmonary inflammation in absence of *Nlrp6* in comparison to *Asc* or *Casp-1/11* deficiency suggesting that an NLRP3-formed rather than NLRP6-formed inflammasome is more likely involved. In addition, we observed reduced pulmonary *Nlrp3* gene expression in *Nlrp6* deficient mice suggesting that NLRP6 regulates NLRP3 upon CS.

Importantly we highlight a strong and characteristic accumulation of the ELR⁺ CXC epithelial cell-derived chemokine CXCL5/LIX in lung parenchyma of both air and CS-exposed mice and a defect in CXCL5/LIX secretion upon CS in the bronchoalveolar space of *Nlrp6*^{-/-} mice. These results suggest that NLRP6 is involved in the apical secretion of CXCL5/LIX by pulmonary epithelial cells. Indeed, control of inflammatory processes may reside, at least in part, by regulation of the direction (apical versus basal) in which chemokines are secreted. This may represent a mechanism to recruit neutrophils in a fashion that discriminates the site of initial injury. Absence of accumulated in lung of *Asc* or *Casp-1/11* deficient mice exposed or not to CS indicating that NLRP6 regulates CXCL5/LIX secretion independently of *Casp-1* or *Casp-11* inflammasomes. CXCL5/LIX was reported to be essentially produced by epithelial cells promoting neutrophilic inflammation (Jeyaseelan S JI 2005)([Liu et al., 2011](#); [Mei et al., 2010](#)). CXCL5/LIX expression by resident cells was showed to promote pulmonary macrophages influx in one study using a secondhand smoke exposure model in mice ([Balamayooran et al., 2012](#)). In addition, we demonstrated impaired secretion and parenchyma accumulation of another ELR⁺ CXC epithelial cell-derived chemokine, CXCL15/Lungkine reinforcing our conclusion that NLRP6 functions in lung epithelial cells. The ability of pulmonary epithelial cells to secrete CXCL5/LIX, CXCL15/Lungkine and other inflammatory mediators, highlight their active contribution to lung inflammatory response as supported by recent works ([Holtzman et al., 2014](#); [Whitsett and Alenghat, 2015](#)). In addition, epithelial cells probably regulate partially CXCL1/KC secretion which is also produced by alveolar macrophages and inflammatory monocytes.

Since NLRP6 regulates intestinal innate immunity independently of inflammasome activation through type III interferon (IFN) signaling ([Wang et al., 2015a](#)), we analyzed NLRP6-type III IFN relationship in our model. Recently discovered, type III interferon, IFN- λ 2 (IL-28A) and IFN- λ 3 (IL-28B) in mice, were first reported to have antiviral function similarly to type I IFN, IFN- α and IFN- β , and to be highly expressed by epithelial cells upon respiratory virus infection (Crotta et al., 2013; Fox et al., 2015; Jewell et al., 2010; Okabayashi et al., 2011). However IFN- λ also modulate innate and adaptive immunity, autoimmunity and tumor progression (Burkart et al., 2013)(Lazear et al., 2015). IFN- λ (IL28) acts preferentially on cells of epithelial origin through IL-28R (IFNLR) signaling. IL28R is expressed at high levels in respiratory epithelial cells implying a key role for IL-28 in mediating immunity in the respiratory tract (Banos-Lara et al., 2015). *In vitro*, respiratory epithelial cells respond to IFN- λ from both the apical and basolateral surfaces (Fox et al., 2015; Hamming et al., 2013). Importantly we report for the first time that acute inflammation to CS induces type III interferon (IFN- λ or IL-28) production in lung which dependent on NLRP6. In addition, we show that airway inflammation to CS depends on type I and type III interferon signaling. Importantly we observed that epithelial derived chemokines CXCL5/LIX and CXCL15/Lungkine cells also accumulate in lungs of Il-28r but not Ifnar deficient mice upon CS exposure suggesting that IL-28R signaling is functionally linked to NLRP6 whereas involvement of IFNAR signaling more indirectly relay to NLRP6. In addition, CXCL1/KC accumulation in lung depends on NLRP6 but not on IL-28R and IFNAR signaling confirming indirect role of NLRP6 in CXCL1/KC secretion. Altogether these results suggest that NLRP6 signaling induces the type III interferon (IFN- λ or IL-28) secretion by not yet identified airway cells which interacts with IL-28R expressed on epithelial cells, IL-28/IL-28R signaling leading to apical secretion of the neutrophilic chemokine CXCL5/LIX and CXCL15/Lungkine by epithelial cells and to neutrophil influx. Type III interferon may also act on alveolar macrophages bearing IFN receptors possibly leading to CXCL1/KC secretion by alveolar macrophages and amplifying the inflammatory response.

Collectively, our data report for the first time a key role for the unknown NLRP6 sensor in regulating pulmonary inflammation and repair upon lung injury. We show that NLRP6 signaling induces the type III interferon (IFN- λ or IL-28) secretion, IL-28/IL-28R signaling leading to the secretion of the neutrophilic chemokine CXCL5/LIX and CXCL15/Lungkine and to neutrophil influx. NLRP6 acts independently of classical inflammasome, with still unknown partners and activation triggers. We report here new data on the unexplored NLRP6 function in lung in normal and pathologic conditions. This study highlighted NLRP6 as a new target for development of potential therapeutic strategies against human COPD.

METHODS

Mice.

Wild type C57Bl/6J (WT) mice were purchased from the Jackson Laboratory. ASC^{-/-} were provided by Francis Derouet at Lausanne University (), Casp1/11^{-/-} were provided by Seshadri Tara at BASF BioResearch corporation (), Nlrp3^{-/-} were provided by Jürg Tschopp at Lausanne University (), Nlrp6^{-/-} were provided by Mathias Chamaillard at Lille Pasteur Institute (). We used Mx1^{+/+}Il-28r^{-/-} mice in order to investigate the relative contributions of type III IFN (IFN- λ) and type I IFN (IFN- α , IFN- β) in CS-induced inflammation ([Mordstein et al., 2008](#)). Mx1^{+/+}Il-28r^{-/-} were provided by Peter Staeheli from Institute of virology University Medical center Freiburg () and IFNAR^{-/-} by Michel Aguet from Institute of Molecular Biology I, University of Zurich, Switzerland. ([Ehlich et al., 1994](#)). Every mouse line was backcrossed 10 times or made on C57Bl/6J background. All were housed at the animal facility at transgenose institute (TAAM) in CNRS of Orleans, France. For experiments, adults (6-10 weeks old) were kept in sterile, isolated and ventilated cages. All animal experiments followed the French government's ethical and animal experiment regulations (CLE CCO 2015-1088).

Cigarette smoke model

3R4F cigarettes (University of Kentucky, Lexington, KY) were used without filter. Mice were put in a smoke chamber of InExpose system (EMKA Technologies, Paris, France) and smoke four cigarettes per exposition, three times a day during four days for acute inflammation model or four cigarettes per exposition, three times a day during five days for six weeks for chronic inflammation model.

Bronchoalveolar lavage (BAL) and lung tissue were assayed 16 hours after the last exposition.

Broncho-alveolar lavage (BAL)

BAL was performed as previously described ([Gasse et al., 2009](#)). Differential cell counts were performed by counting an average of 250 cells on cytopsin preparations (Shandon CytoSpin 3, Thermo Scientific, Illkirch, France) after May-Grünwald-Giemsa staining (Diff Quick, Medion Diagnostics, Düringen, Switzerland) according to manufacturer's instructions.

Lung homogenates

After BAL the lungs were perfused with isoton® (Beckman Coulter France, Villepinte) to flush the vascular content. Lungs were homogenized by a rotor-stator (Ultra-turrax®) in 1ml of PBS. The extract was centrifuged 10 min 10000 rpm and the supernatant was stored at -80°C before mediator measurement and immunoblotting analysis.

Lung histology

The left lobe of lung was fixed in 4% buffered formaldehyde, processed and paraffin embedded under standard conditions. Lung sections of 3 µm were stained with Periodic acid Schiff (PAS). The slides were blindly examined by using a Leica microscope at 10X magnification (Leica, Solms, Germany). Cell infiltration was assessed by a semi-quantitative score (with increasing severity 0-5) by two independent observers.

Mediator measurements

For cytokine determination, BALF supernatant and lung homogenates were analysed by ELISA assay kits for murine: IL-1 β , KC, MPO, BAFF, LCN2, IL-6, IL-33, GM-CSF, MDC, MMP-9, TIMP-1, LIX, and CCL5 (Mouse DuoSet, R&D system, Minneapolis, USA) according to manufacturer's instructions).

Generation of bone marrow chimeras

Recipient NLRP6^{-/-} and WT mice were lethally irradiated as reported before Chen et al, 2012. A total of 4x10⁶ bone marrow cells flushed from femurs and tibias of NLRP6-deficient and WT mice were injected into the lateral tail vein of the irradiated recipient mice 24h after lethal irradiation. Four chimeric groups were obtained: CD45.1>WT, NLRP6^{-/-}>CD45.1, CD45.1>NLRP6^{-/-}, NLRP6^{-/-}>NLRP6^{-/-}.

Bone marrow reconstitution was checked by flow cytometry using the rate of CD45.1 and CD45.2 with an antibody staining.

Three months after bone marrow reconstitution, mice were exposed to cigarettes smoke as described.

Quantitative RT-PCR

RNA was purified from lung homogenates by using Trizol extraction protocol. Reverse transcription of RNA into cDNA was carried out with Go script reverse kit (Promega). RT-PCR was performed with Fast SYBR Green master mix on a (Stratagene MX3005P, Agilent technologies) primers were synthesized (Qiagen, Hilden, Germany). The expression of pro-IL-18, Nlrp3 and Mmp12 mRNA, relative to housekeeping 18S mRNA, were analyzed using Quantitect

gene expression assays (Qiagen). For all experiments, biological quadruplicate and technical triplicate were performed.

Immunoblotting

Protein concentrations were determined in lung tissue by using DCTM protein Assay (BIO-RAD, France). 30 µg of proteins were denatured by boiling (95°C, 5 min) in reducing SDS sample buffer, separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (GE Healthcare Life Sciences). The membranes were blocked 2 hours in 10% nonfat dried milk in Tris-Buffered saline (TBS)- 0,1% Tween® 20 and incubated with primary mouse anti-NLRP3 (Adipogen, Switzerland) antibody or mouse anti-tubulin in 5% nonfat dried milk in TBS-0,1% Tween® 20. Membranes were then washed three times in TBS- 0,1% Tween® 20 and incubated with the appropriate second antibody conjugated to horseradish peroxidase (anti-mouse IgG) from Sigma Aldrich. Detection was performed with ECL Western-blotting Detection Reagent (GE Healthcare). The intensity of bands revealed was quantified by mean of densitometry with Multi-application gel imaging system PXi software (Syngene).

Statistical analysis

Statistical evaluation of differences between experimental groups was determined by one-way ANOVA, analysis of variance, Bonferroni test for in vivo experiments and one-way ANOVA using Prism software (La Jolla, CA, USA). *P* values <0.05 were considered statistically significant.

FIGURE LEGEND

Figure 1. NLRP3 or NLRP6 deficiency impairs inflammation to cigarette smoke exposure in mice. WT (C57Bl6) mice, *Nlrp3*^{-/-} and *Nlrp6*^{-/-} mice were exposed to cigarette smoke (CS) or air

during 6 weeks. CS exposure led to significant decrease of (A) total cells, (B) macrophages (C) neutrophils and (D) lymphocytes into BALF of Nlrp3^{-/-} and Nlrp6^{-/-} mice compared to exposed WT mice. (E) Myeloperoxidase (MPO) activity and (G) B cell activating factor (BAFF) secretion in BALF were reduced in CS exposure group of Nlrp3^{-/-} and Nlrp6^{-/-} mice compared to exposed WT mice. (F) The chemokine KC was significantly decreased in BALF of Nlrp3^{-/-} mice exposed to CS but not for Nlrp6^{-/-} mice compared to exposed WT mice. (H) MPO and (I) KC levels in lung were significantly decreased in CS group for Nlrp3^{-/-} mice but not for Nlrp6^{-/-} compared to exposed WT mice. Pro-inflammatory cytokines in lung such as (J) IL-1 β and (K) IL-6 levels measured by ELISA were both decreased in CS exposure group of Nlrp3^{-/-} and Nlrp6^{-/-} mice compared to exposed WT mice. mRNA relative expression was performed in lung of WT, Nlrp3^{-/-} and Nlrp6^{-/-} mice for (L) pro IL-18 and (M) Nlrp3 genes. (N) Western-blot assay was performed to detect NLRP3 protein level in lung homogenates of WT and Nlrp6^{-/-} mice exposed to CS or air. The signal was quantified using Tubuline signal.

Data are representative of two experiments and are expressed as mean values $\pm$ SD (n= 4-6 mice per group, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 using an Anova one way analyse of variance Bonferroni test). ns = not significant.

Figure S1. NLRP6 deficient mice have reduced pulmonary inflammation after one week cigarette smoke exposure. WT (C57Bl6) mice, and Nlrp6^{-/-} mice were exposed to cigarette smoke (CS) or air during 4 days. (A) Neutrophils count and (B) MPO level in BALF were decreased in response to CS exposure in Nlrp6^{-/-} mice compared to exposed WT mice. (C) IL-1 β levels in lung were measured by ELISA showing a slight diminution in Nlrp6^{-/-} exposed to CS compared to CS WT mice. (D) BAFF in lung was significantly reduced in CS exposure Nlrp6^{-/-} mice compared to exposed WT mice. (E) Lipocalin-2 (LCN2) production in lung was impaired in smoke CS group of Nlrp6^{-/-} compared to exposed WT mice.

Data are representative of four experiments and are expressed as mean values $\pm$ SD (n= 4-6 mice per group, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 using an Anova one way analyse of variance Bonferroni test).

Figure 2. Nlrp3 or Nlrp6 deficiency impairs the expression of remodeling factors induced by cigarette smoke exposure. WT (C57Bl6), Nlrp3^{-/-} and Nlrp6^{-/-} mice were exposed to cigarette smoke (CS) or air during 6 weeks and remodeling factor such as (A-B) MMP-9 and (C-D) TIMP-1 were measured in BALF and lung by ELISA. All these parameters were decreased in response to CS exposure in Nlrp3^{-/-} and Nlrp6^{-/-} mice compared to exposed WT mice. (E) mRNA relative expression was performed in lung of WT, Nlrp3^{-/-} and Nlrp6^{-/-} mice for Mmp12. CS exposure led to a decrease of Mmp12 expression in Nlrp3^{-/-} and Nlrp6^{-/-} mice compared to exposed WT mice. (F) Inflammation score was evaluated was evaluated from histology sections. (G) Body loss weight was daily measured during CS exposure.

Data are representative of two experiments and are expressed as mean values $\pm$ SD (n= 4-6 mice per group, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 using an Anova one way analyse of variance Bonferroni test).

Figure S2. NLRP6 deficient mice have reduced remodelling after one week of cigarette smoke exposure. WT (C57Bl6), Nlrp3^{-/-} and Nlrp6^{-/-} mice were exposed to cigarette smoke (CS) or air during 4 days and remodeling factor such as (A-B) MMP-9 and (C-D) TIMP-1 were measured in BALF and lung by ELISA. All these parameters were decreased in response to CS exposure in Nlrp6^{-/-} mice compared to exposed WT mice. (C) mRNA relative expression was performed in lung of WT and Nlrp6^{-/-} mice for Mmp12. CS exposure led to a significant decrease of Mmp12 expression in Nlrp6^{-/-} mice compared to exposed WT mice.

Data are representative of four experiments and are expressed as mean values $\pm$ SD (n= 4-6 mice per group, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 using an Anova one way analyse of variance Bonferroni test).

Figure 3. Acute pulmonary inflammation and remodeling are decrease in Nlrp6, Asc, Casp-1/11 deficient mice. WT (C57Bl6), Asc^{-/-}, Casp1/11^{-/-} and Nlrp6^{-/-} mice were exposed to cigarette smoke or air during 4 days. CS exposure led to significant decrease of (A) neutrophil influx and (B) MPO levels into BALF of Asc^{-/-}, Casp1/11^{-/-} and Nlrp6^{-/-} mice compared to exposed WT mice. (C) LCN2 in BALF and (D) lung, (E) IL-1 β , (F) BAFF, (G) GM-CSF (Granulocyte Macrophages Colony Stimulating Factor) and (H) CCL5 levels in lung were measured by ELISA and were decreased in response to CS exposure in Asc^{-/-}, Casp1/11^{-/-} and Nlrp6^{-/-} mice compared to exposed WT mice.

Data are representative of four experiments and are expressed as mean values $\pm$ SD (n= 4-6 mice per group, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 using an Anova one way analyse of variance Bonferroni test).

Figure 4. Nlrp6 expression in resident cells is necessary to neutrophils influx and IL-1 β production upon CS-exposure. Recipient Nlrp6^{-/-} and WT mice were lethally irradiated. Bone marrow cells of Nlrp6^{-/-} and WT mice were injected into the irradiated recipient mice 24h after lethal irradiation. Four chimeric groups were obtained: CD45.1>WT, Nlrp6^{-/-} >CD45.1, CD45.1>Nlrp6^{-/-}, Nlrp6^{-/-} > Nlrp6^{-/-}. Three months after bone marrow reconstitution, mice were exposed to CS or air as a control group. (A) Neutrophil influx and (B) MPO levels in BALF after CS exposure were dramatically decreased when NLRP6 was not expressed in resident cells. (C) Proinflammatory cytokine IL-1 β was also strongly decreased when NLRP6 was not expressed in resident cells. (D) KC production in lung was increased after CS compared to CD45.1>WT air group but there is no modification of KC level between all exposed groups. (E) MMP-9 secretion in

BALF was also dependent of resident and recruited cells together. (F) Loss of NLRP6 expression in resident or recruited cells was enough to decrease TIMP-1 production in lung.

Data are representative of two experiments and are expressed as mean values $\pm$ SD (n= 4-6 mice per group, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 using an Anova one way analyse of variance Bonferroni test).

Figure 5. Accumulation of the epithelial cell-derived neutrophil-activating chemokine CXCL5/LIX in Nlrp6 deficient mice. WT (C57Bl6), Casp1/11^{-/-} and Nlrp6^{-/-} mice were exposed to cigarette smoke (CS) or air during 4 days. CS exposure led to significant decrease of (A) neutrophil influx and (B) KC into BALF of Casp1/11^{-/-} and Nlrp6^{-/-} mice compared to exposed WT mice. (C) KC production in lung after CS exposure was reduced only in Casp1/11^{-/-} but not in Nlrp6^{-/-} mice compared to exposed WT mice. (D) LIX secretion level was assessed by ELISA and was decreased in Casp1/11^{-/-} and Nlrp6^{-/-} mice compared to exposed WT mice. (E) LIX production in lung was up regulated in Nlrp6^{-/-} but not in Casp1/11^{-/-} exposed group. mRNA relative expression was performed in lung of WT, Casp1/11^{-/-} and Nlrp6^{-/-} mice for (G) Nlrp3 and (H) Mmp12. CS exposure led to an up regulation of Nlrp3 and Mmp12 in Casp1/11^{-/-} but not in Nlrp6^{-/-} mice compared to exposed WT mice. (I) After CS exposure mRNA Il-18 expression in lung was not dependent of Casp1/11^{-/-} and Nlrp6^{-/-} mice compared to exposed WT mice.

Data are representative of four experiments and are expressed as mean values $\pm$ SD (n= 4-6 mice per group, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 using an Anova one way analyse of variance Bonferroni test).

Figure 6. Cigarette smoke-induced pulmonary inflammation was greatly reduced in mice deficient for type I and type III IFN receptor deficient mice. WT (C57Bl6), IL28^{-/-}, IFNAR^{-/-} and Nlrp6^{-/-} mice were exposed to cigarette smoke (CS) or air during 4 days. (A) CS exposure led to dramatically decrease of neutrophil influx into BALF of IL28^{-/-}, IFNAR^{-/-} and Nlrp6^{-/-} mice

compared to exposed WT mice. (B) Lymphocytes count in BALF was significantly decreased in response to CS exposure in IL28^{-/-} and IFNAR^{-/-} mice compared to exposed WT mice. (C) LIX secretion level was assessed by ELISA and it was decreased in IL28^{-/-}, IFNAR^{-/-} and Nlrp6^{-/-} mice compared to exposed WT mice. (D) LIX production after CS exposure was decreased, IL28^{-/-}, IFNAR^{-/-} while it was increased in Nlrp6^{-/-} mice compared to exposed WT mice. (E) CXCL15 in BALF was strongly decreased in Il-28r^{-/-}, Ifnar^{-/-} and Nlrp6^{-/-} mice compared to exposed WT mice. (F) CXCL15 in lung was accumulated in Il-28r^{-/-}, Ifnar^{-/-} and Nlrp6^{-/-} mice compared to exposed WT mice. KC level in (G) BALF and (H) lung was abolished in Il-28r^{-/-}, Ifnar^{-/-} mice compared to exposed WT mice. (I) IL-28 production in lung after CS exposure was reduced in Ifnar^{-/-} and Nlrp6^{-/-} mice but not in Il28r^{-/-} mice.

Data are representative of four experiments and are expressed as mean values $\pm$ SD (n= 4-6 mice per group, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 using an Anova one way analyse of variance Bonferroni test).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Florence Savigny (Orleans, France) for technical assistance. We thank the following grant supports : «Région Centre » «Association de Recherche sur les Nicotianées (ARN)» and «Conseil Général du Loiret ».

Figure 1: Pulmonary inflammation upon CS exposure is impaired in Nlrp6 and Nlrp3 deficient mice

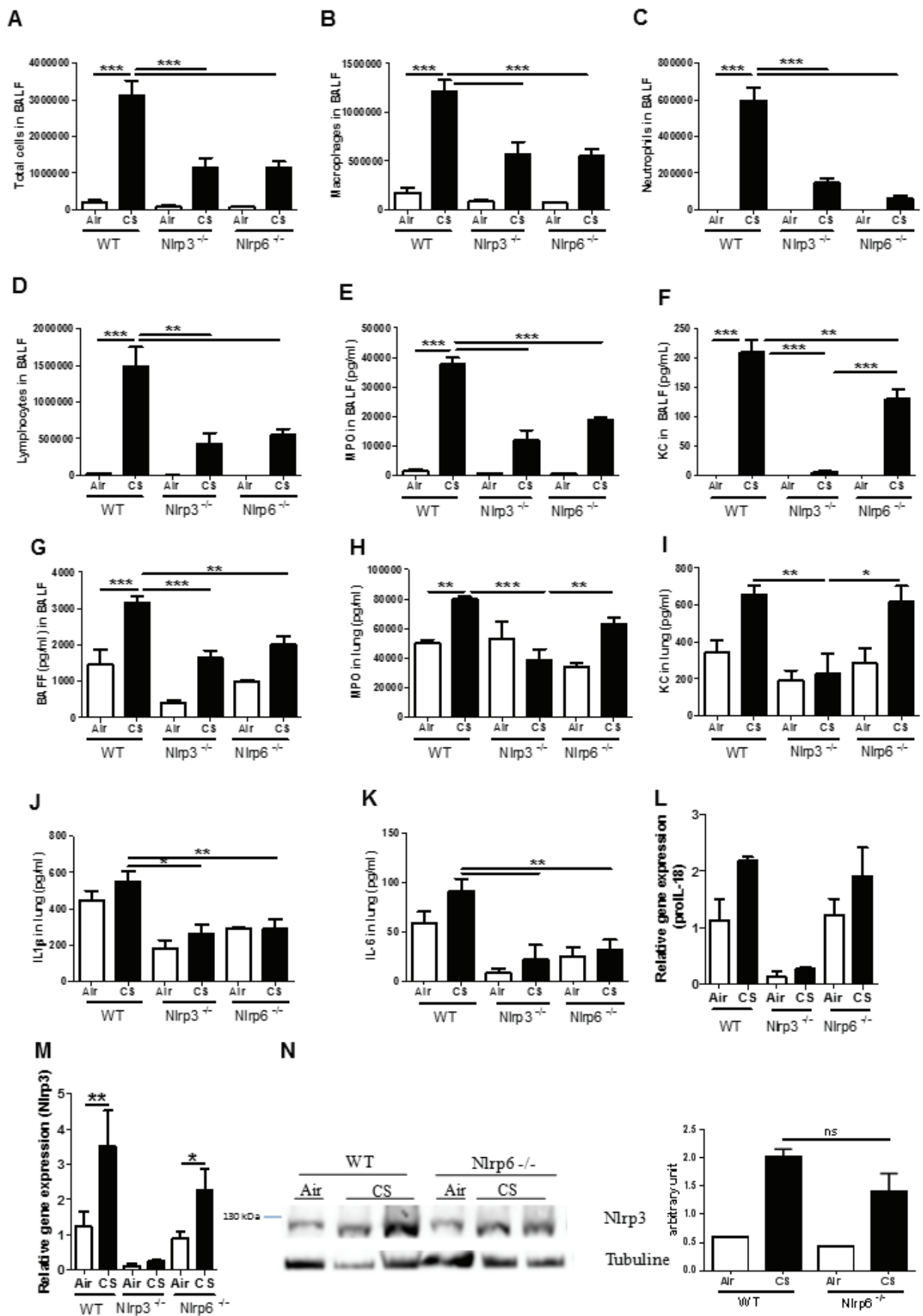


Figure 2: Airway remodeling was reduced in *Nlrp6* and *Nlrp3* deficient mice after 6 wk exposure to CS

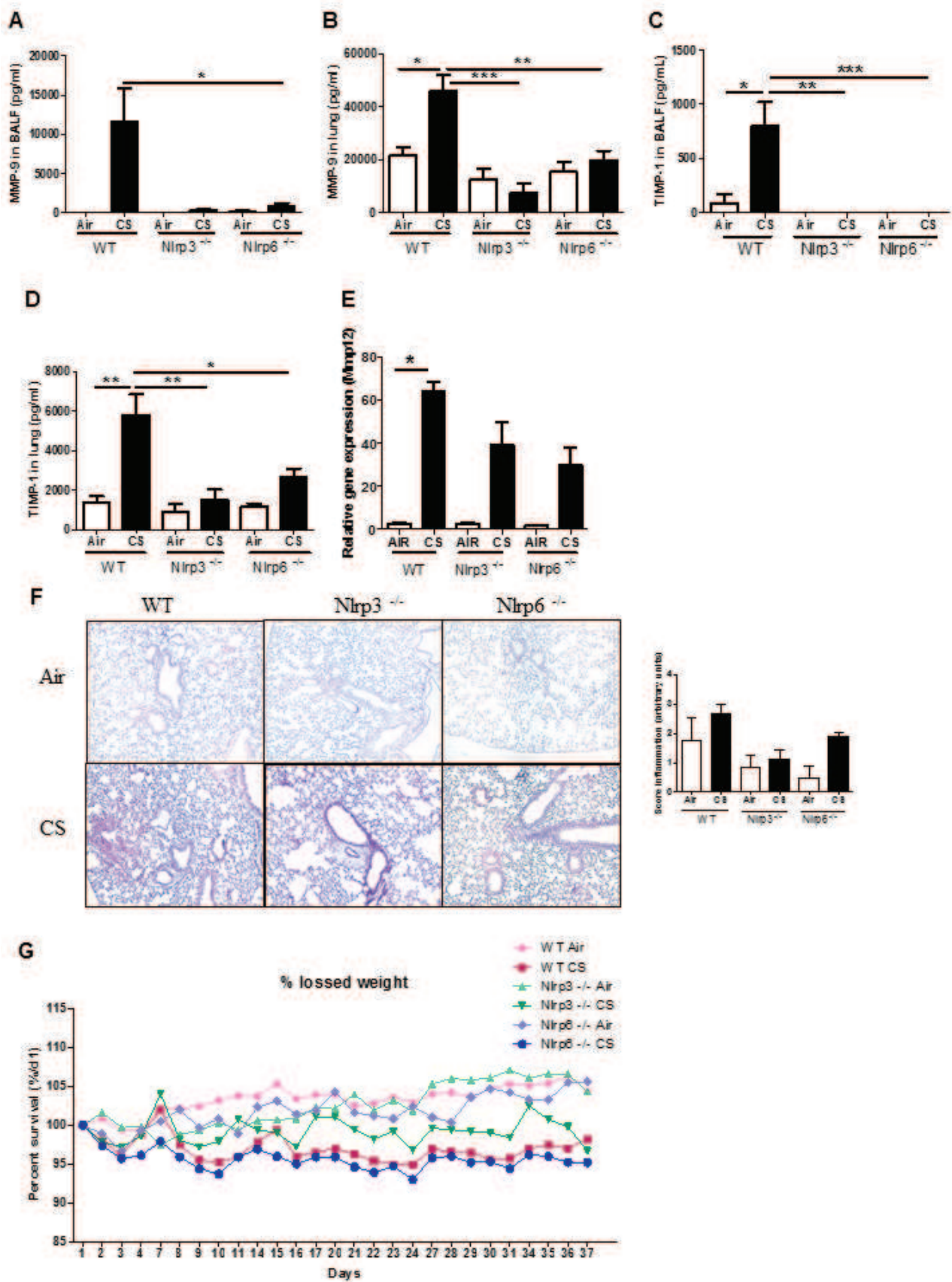


Figure 3: Nlrp6, Asc, Casp-1/11 deficient mice: lung inflammation to after 1 wk CS exposure

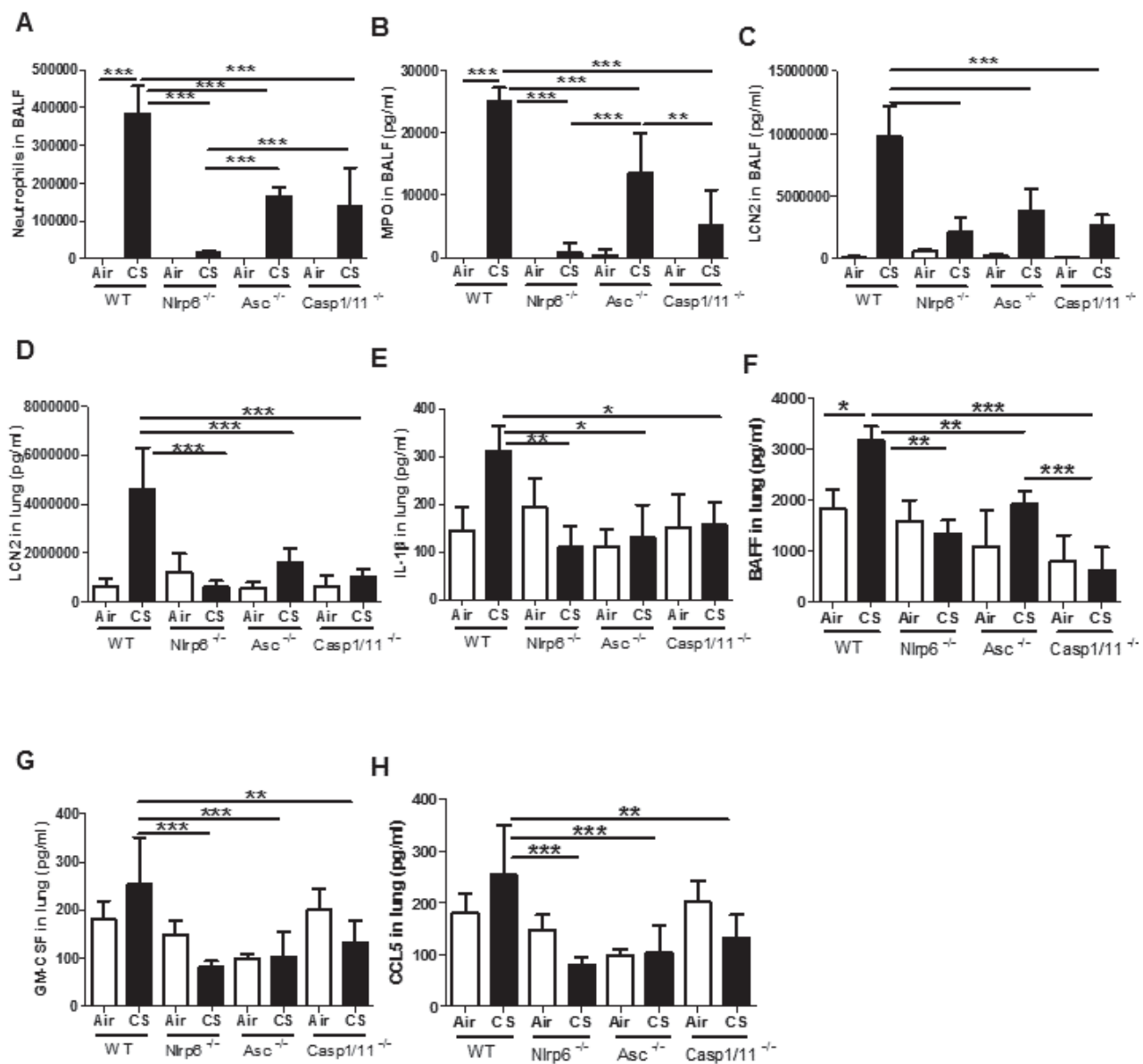


Figure 4: Cells expressing Nlrp6 and involved in neutrophil recruitment are resident cells (bone-marrow chimera)

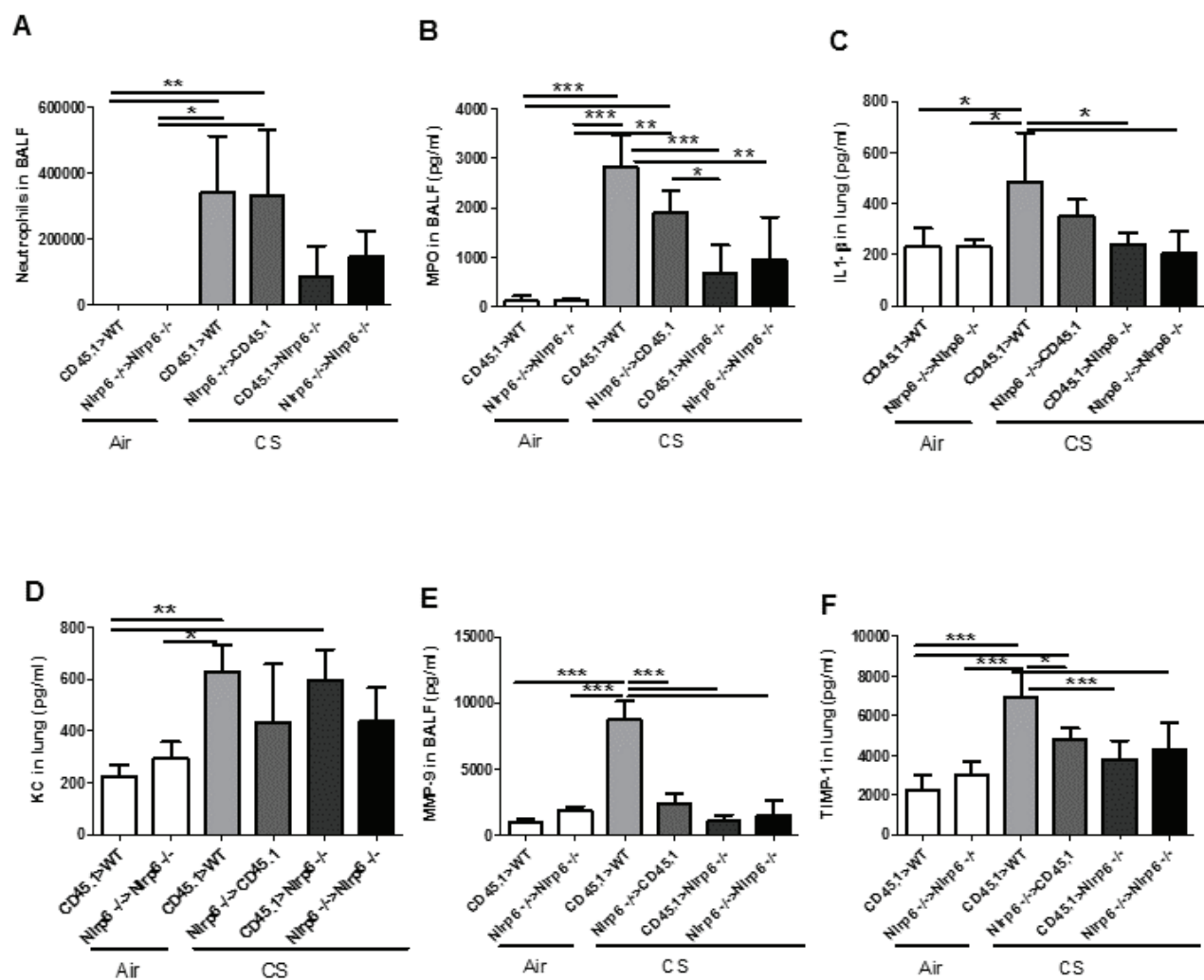


Fig 5: Accumulation of CXCL5/LIX chemokine in Nlrp6 deficient mice

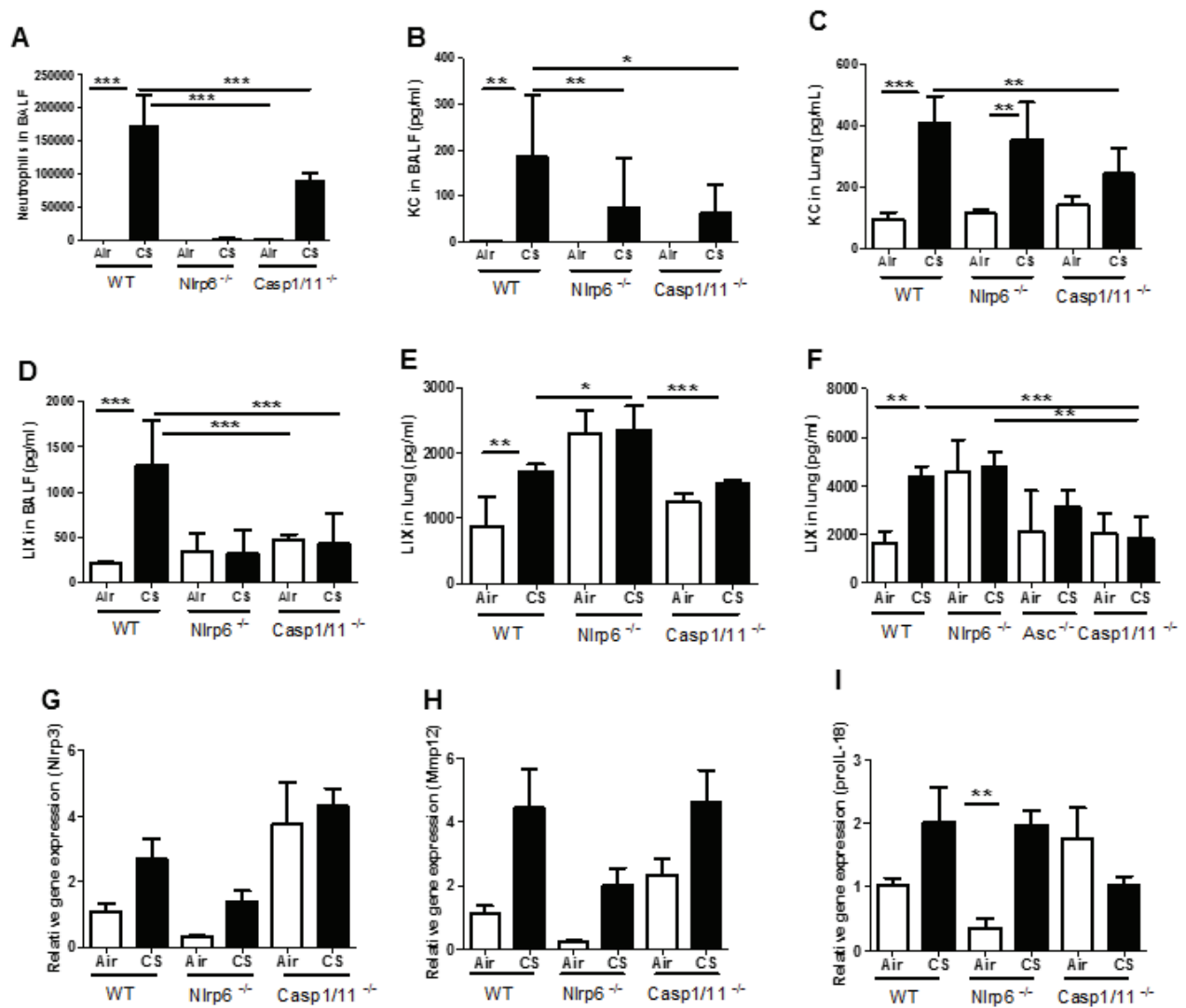
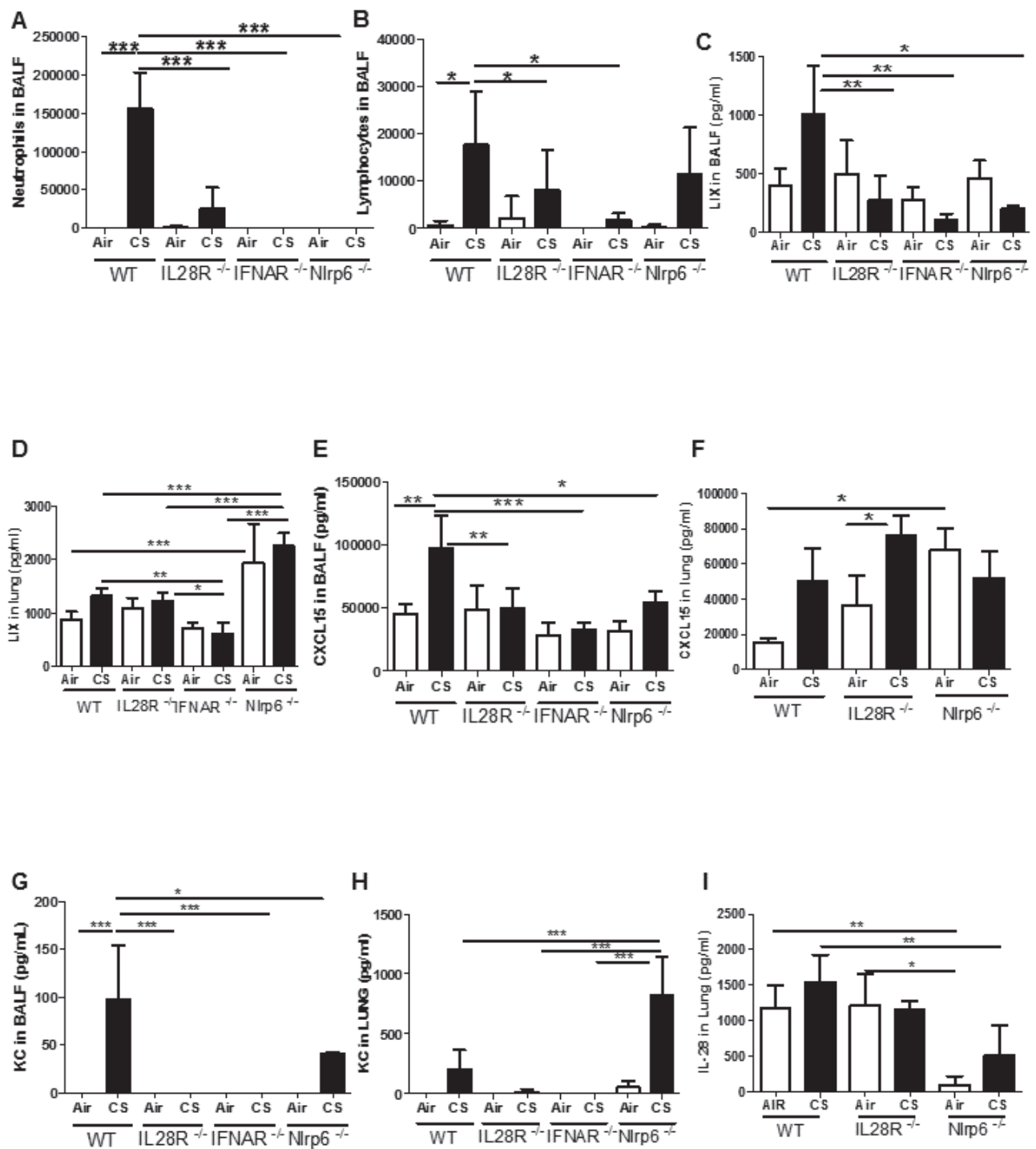
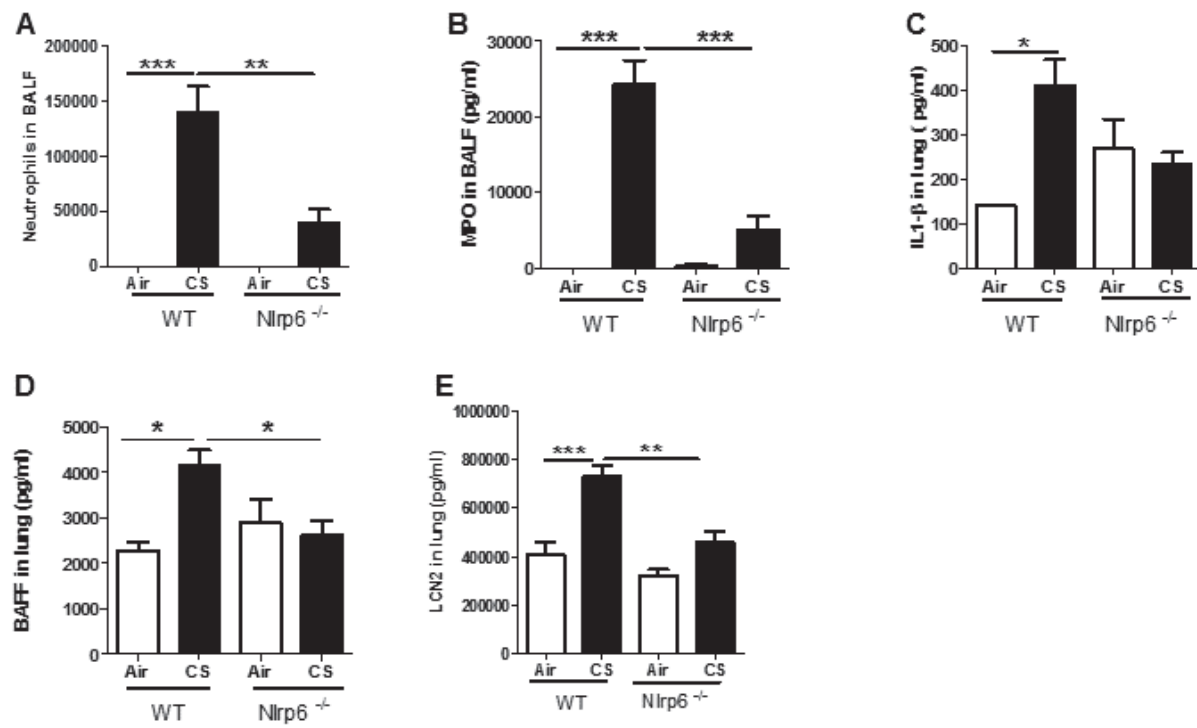


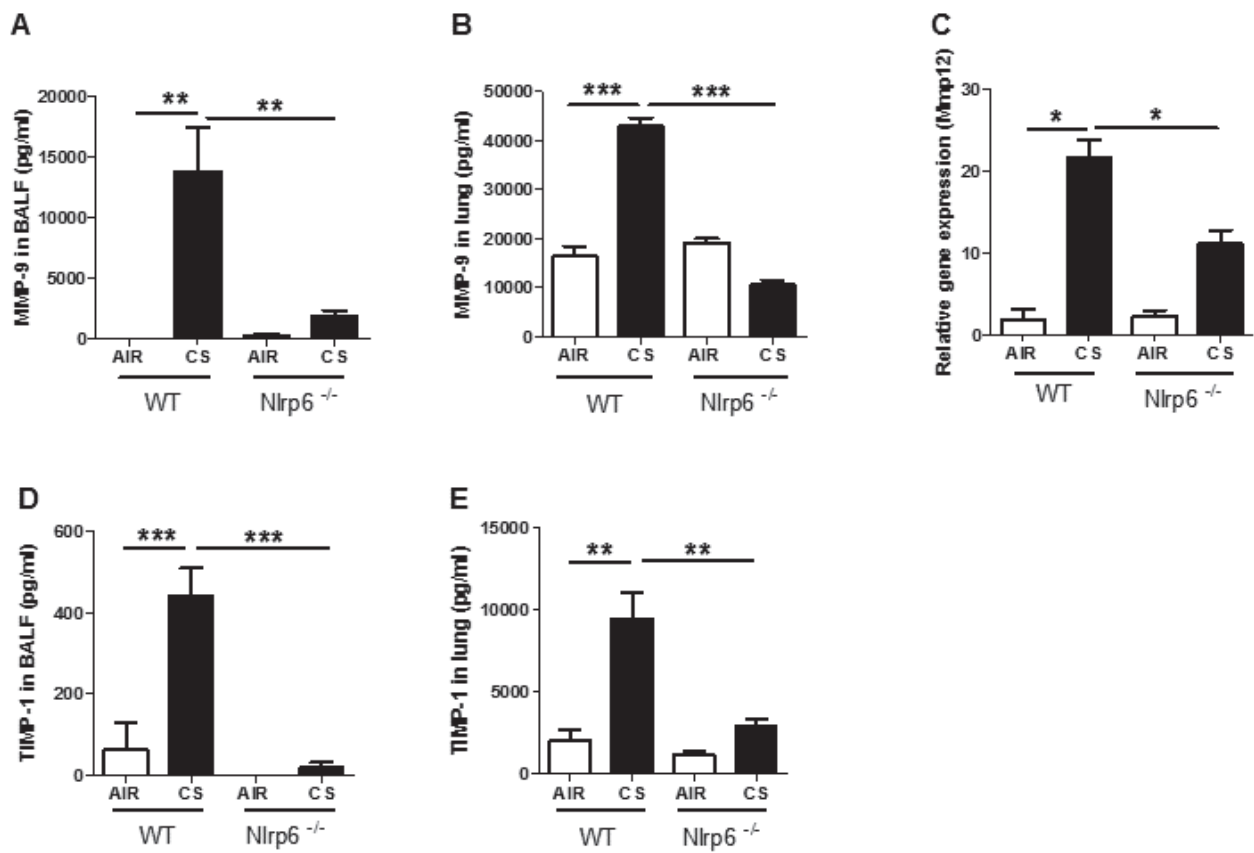
Figure 6: Airway inflammation to CS exposure was strongly reduced in both IL-28R and IFNAR ko mice



Suppl 1Figure 1: Nlrp6 deficient mice have reduced pulmonary inflammation after 1 wk CS exposure



Supp Figure 2: Nlrp6 deficient mice have reduced remodeling after 1wk CS exposure



REFERENCES

- Balamayooran, G., S. Batra, S. Cai, J. Mei, G.S. Worthen, A.L. Penn, and S. Jeyaseelan. 2012. Role of CXCL5 in leukocyte recruitment to the lungs during secondhand smoke exposure. *Am J Respir Cell Mol Biol* 47:104-111.
- Birchenough, G.M., E.E. Nystrom, M.E. Johansson, and G.C. Hansson. 2016. A sentinel goblet cell guards the colonic crypt by triggering Nlrp6-dependent Muc2 secretion. *Science* 352:1535-1542.
- Botelho, F.M., C.M. Bauer, D. Finch, J.K. Nikota, C.C. Zavitz, A. Kelly, K.N. Lambert, S. Piper, M.L. Foster, J.J. Goldring, J.A. Wedzicha, J. Bassett, J. Bramson, Y. Iwakura, M. Sleeman, R. Kolbeck, A.J. Coyle, A.A. Humbles, and M.R. Stampfli. 2011. IL-1alpha/IL-1R1 expression in chronic obstructive pulmonary disease and mechanistic relevance to smoke-induced neutrophilia in mice. *PLoS One* 6:e28457.
- Broderick, L., D. De Nardo, B.S. Franklin, H.M. Hoffman, and E. Latz. 2015. The inflammasomes and autoinflammatory syndromes. *Annu Rev Pathol* 10:395-424.
- Chen, S.C., B. Mehrad, J.C. Deng, G. Vassileva, D.J. Manfra, D.N. Cook, M.T. Wiekowski, A. Zlotnik, T.J. Standiford, and S.A. Lira. 2001. Impaired pulmonary host defense in mice lacking expression of the CXC chemokine lungkine. *J Immunol* 166:3362-3368.
- Couillin, I., V. Vasseur, S. Charron, P. Gasse, M. Tavernier, J. Guillet, V. Lagente, L. Fick, M. Jacobs, F.R. Coelho, R. Moser, and B. Ryffel. 2009. IL-1R1/MyD88 signaling is critical for elastase-induced lung inflammation and emphysema. *J Immunol* 183:8195-8202.
- Di Stefano, A., G. Caramori, A. Barczyk, C. Vicari, P. Brun, A. Zanini, F. Cappello, E. Garofano, A. Padovani, M. Contoli, P. Casolari, A.L. Durham, K.F. Chung, P.J. Barnes, A. Papi, I. Adcock, and B. Balbi. 2014. Innate immunity but not NLRP3 inflammasome activation correlates with severity of stable COPD. *Thorax* 69:516-524.
- Doz, E., N. Noulin, E. Boichot, I. Guenon, L. Fick, M. Le Bert, V. Lagente, B. Ryffel, B. Schnyder, V.F. Quesniaux, and I. Couillin. 2008. Cigarette smoke-induced pulmonary inflammation is TLR4/MyD88 and IL-1R1/MyD88 signaling dependent. *J Immunol* 180:1169-1178.
- Elinav, E., T. Strowig, J. Henao-Mejia, and R.A. Flavell. 2011. Regulation of the antimicrobial response by NLR proteins. *Immunity* 34:665-679.
- Eltom, S., M.G. Belvisi, C.S. Stevenson, S.A. Maher, E. Dubuis, K.A. Fitzgerald, and M.A. Birrell. 2014. Role of the inflammasome-caspase1/11-IL-1/18 axis in cigarette smoke driven airway inflammation: an insight into the pathogenesis of COPD. *PLoS One* 9:e112829.
- Eltom, S., C.S. Stevenson, J. Rastrick, N. Dale, K. Raemdonck, S. Wong, M.C. Catley, M.G. Belvisi, and M.A. Birrell. 2011. P2X7 receptor and caspase 1 activation are central to airway inflammation observed after exposure to tobacco smoke. *PLoS One* 6:e24097.
- Franklin, B.S., L. Bossaller, D. De Nardo, J.M. Ratter, A. Stutz, G. Engels, C. Brenker, M. Nordhoff, S.R. Mirandola, A. Al-Amoudi, M.S. Mangan, S. Zimmer, B.G. Monks, M. Fricke, R.E. Schmidt, T. Espevik, B. Jones, A.G. Jarnicki, P.M. Hansbro, P. Busto, A. Marshak-Rothstein, S. Hornemann, A. Aguzzi, W. Kastentmuller, and E. Latz. 2014. The adaptor ASC has extracellular and 'prionoid' activities that propagate inflammation. *Nat Immunol* 15:727-737.
- Gasse, P., N. Riteau, S. Charron, S. Girre, L. Fick, V. Petrilli, J. Tschopp, V. Lagente, V.F. Quesniaux, B. Ryffel, and I. Couillin. 2009. Uric acid is a danger signal activating NALP3 inflammasome in lung injury inflammation and fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 179:903-913.
- Holtzman, M.J., D.E. Byers, J. Alexander-Brett, and X. Wang. 2014. The role of airway epithelial cells and innate immune cells in chronic respiratory disease. *Nat Rev Immunol* 14:686-698.

- Jeyaseelan, S., R. Manzer, S.K. Young, M. Yamamoto, S. Akira, R.J. Mason, and G.S. Worthen. 2005. Induction of CXCL5 during inflammation in the rodent lung involves activation of alveolar epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 32:531-539.
- Lazear, H.M., T.J. Nice, and M.S. Diamond. 2015. Interferon-lambda: Immune Functions at Barrier Surfaces and Beyond. *Immunity* 43:15-28.
- Liu, Y., J. Mei, L. Gonzales, G. Yang, N. Dai, P. Wang, P. Zhang, M. Favara, K.C. Malcolm, S. Guttentag, and G.S. Worthen. 2011. IL-17A and TNF-alpha exert synergistic effects on expression of CXCL5 by alveolar type II cells in vivo and in vitro. *J Immunol* 186:3197-3205.
- Martinon, F., and L.H. Glimcher. 2006. Gout: new insights into an old disease. *J Clin Invest* 116:2073-2075.
- Martinon, F., V. Petrilli, A. Mayor, A. Tardivel, and J. Tschopp. 2006. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 440:237-241.
- Mei, J., Y. Liu, N. Dai, M. Favara, T. Greene, S. Jeyaseelan, M. Poncz, J.S. Lee, and G.S. Worthen. 2010. CXCL5 regulates chemokine scavenging and pulmonary host defense to bacterial infection. *Immunity* 33:106-117.
- Mordstein, M., G. Kochs, L. Dumoutier, J.C. Renauld, S.R. Paludan, K. Klucher, and P. Staeheli. 2008. Interferon-lambda contributes to innate immunity of mice against influenza A virus but not against hepatotropic viruses. *PLoS Pathog* 4:e1000151.
- Nikota, J.K., P. Shen, M.C. Morissette, K. Fernandes, A. Roos, D.K. Chu, N.G. Barra, Y. Iwakura, R. Kolbeck, A.A. Humbles, and M.R. Stampfli. 2014. Cigarette smoke primes the pulmonary environment to IL-1alpha/CXCR-2-dependent nontypeable *Haemophilus influenzae*-exacerbated neutrophilia in mice. *J Immunol* 193:3134-3145.
- Normand, S., A. Delanoye-Crespin, A. Bressenot, L. Huot, T. Grandjean, L. Peyrin-Biroulet, Y. Lemoine, D. Hot, and M. Chamaillard. 2011. Nod-like receptor pyrin domain-containing protein 6 (NLRP6) controls epithelial self-renewal and colorectal carcinogenesis upon injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:9601-9606.
- Pauwels, N.S., K.R. Bracke, L.L. Dupont, G.R. Van Pottelberge, S. Provoost, T. Vanden Berghe, P. Vandenabeele, B.N. Lambrecht, G.F. Joos, and G.G. Brusselle. 2011. Role of IL-1alpha and the Nlrp3/caspase-1/IL-1beta axis in cigarette smoke-induced pulmonary inflammation and COPD. *Eur Respir J* 38:1019-1028.
- Rossi, D.L., S.D. Hurst, Y. Xu, W. Wang, S. Menon, R.L. Coffman, and A. Zlotnik. 1999. Lungkine, a novel CXC chemokine, specifically expressed by lung bronchoepithelial cells. *J Immunol* 162:5490-5497.
- Seregin, S.S., N. Golovchenko, B. Schaf, J. Chen, K.A. Eaton, and G.Y. Chen. 2016. NLRP6 function in inflammatory monocytes reduces susceptibility to chemically induced intestinal injury. *Mucosal Immunol*
- Vanderbilt, J.N., E.M. Mager, L. Allen, T. Sawa, J. Wiener-Kronish, R. Gonzalez, and L.G. Dobbs. 2003. CXC chemokines and their receptors are expressed in type II cells and upregulated following lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 29:661-668.
- Wang, P., S. Zhu, L. Yang, S. Cui, W. Pan, R. Jackson, Y. Zheng, A. Rongvaux, Q. Sun, G. Yang, S. Gao, R. Lin, F. You, R. Flavell, and E. Fikrig. 2015. Nlrp6 regulates intestinal antiviral innate immunity. *Science* 350:826-830.
- Whitsett, J.A., and T. Alenghat. 2015. Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. *Nat Immunol* 16:27-35.
- Wlodarska, M., C.A. Thaiss, R. Nowarski, J. Henao-Mejia, J.P. Zhang, E.M. Brown, G. Frankel, M. Levy, M.N. Katz, W.M. Philbrick, E. Elinav, B.B. Finlay, and R.A. Flavell. 2014. NLRP6 inflammasome orchestrates the colonic host-microbial interface by regulating goblet cell mucus secretion. *Cell* 156:1045-1059.

Discussion

1.1 Les nanoparticules de silices induisent une inflammation pulmonaire dépendante de l'IL-33 intracellulaire

Une première partie de ma thèse a porté sur l'étude du rôle de l'IL-33 dans l'inflammation pulmonaire provoquée par l'exposition aux nanoparticules de silice. Les nanoparticules de silice se retrouvent dans notre environnement quotidien. De très petites tailles, elles peuvent s'infiltrer dans les organes et y induire une toxicité cellulaire pouvant conduire à la fibrose, comme dans le cas du foie par exemple. Les personnes les plus exposées sont celles travaillant dans la production de ces nanoparticules : en effet, le poumon représente une voie d'entrée importante et lorsqu'elles sont inhalées, les nanoparticules vont se déposer dans différentes régions des poumons et en particulier dans les alvéoles ([Oberdorster et al., 2005](#)). L'équipe a pris le parti d'étudier la phase aiguë d'exposition à ces nanoparticules car il y a peu d'indications mécanistiques dans la littérature sur le déroulement de cette étape. Comprendre ce qui se passe avant l'établissement de la fibrose pourrait permettre non seulement d'empêcher l'évolution de la pathologie mais aussi d'identifier d'éventuels marqueurs pour un diagnostic plus précoce de la maladie, et par conséquent une prise en charge plus rapide des patients.

Différentes études montrent qu'à l'état basal, l'IL-33 est stocké dans les cellules non immunes comme les cellules épithéliales et endothéliales. Cette cytokine est libérée comme alarmine après la mort cellulaire ([Lefrancais et al., 2012](#)) ou suite à mécanisme de sécrétion non conventionnel ([Kakkar and Lee, 2008](#)).

Suite à l'instillation de nanoparticules de silice nous avons constaté au bout de 24h une inflammation pulmonaire corrélée avec le recrutement de cellules inflammatoires comme les neutrophiles et les macrophages, ainsi que la production de chimiokines et cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β et l'IL-33. L'équipe a déjà montré que l'instillation de nanoparticules entraîne la production d'IL-1 α et la sécrétion d'IL-1 β mature via l'activation de l'inflammasome NLRP3, ces deux cytokines participant activement à l'inflammation pulmonaire ([Yazdi et al., 2010](#)). De plus, l'équipe a également montré, *in vitro* que l'inflammasome NLRP3 est activé par les nanoparticules dans les macrophages via l'action de ATP, ADP et/ou adénosine sur les récepteurs purinergiques ([Baron et al., 2015](#)).

Toujours dans le même modèle d'inflammation, l'équipe a ensuite étudié le rôle de l'IL-33. Nous avons observé *in vivo* que l'instillation d'IL-1 β recombinant permettait la potentialisation de l'inflammation pulmonaire induite par les nanoparticules. Nous avons aussi noté, que l'IL-1 β était suffisant pour augmenter l'expression d'IL-33 dans les poumons.

Ensuite toujours dans l'optique de savoir si l'action de l'IL-33 était dépendante de ST2, nous avons administré de l'IL-33 exogène, connu pour provoquer une inflammation dépendante du ST2 membranaire. L'éosinophilie observée chez les souris WT traitées uniquement avec l'IL-33 recombinant nous a permis de confirmer ce point. Puis nous avons pu observer chez les souris WT traité à la fois avec de l'IL-33 recombinant et des nanoparticules, que nous avions une potentialisation de la réponse éosinophilique. Enfin nous avons alors constaté que les nanoparticules administrées seules n'induisaient pas d'éosinophilie. Nous sommes donc en l'absence d'une réponse inflammatoire classique de type Th2. Ces résultats suggèrent alors que l'action de l'IL-33 dans notre modèle est donc indépendante du ST2 membranaire. La production d'IL-33 induite suite à l'instillation de nanoparticules de silice serait donc intracellulaire.

La littérature comporte un grand nombre d'articles démontrant l'absence d'IL-33 dans la matrice extracellulaire, sauf dans deux cas particuliers. Tout d'abord le modèle d'asthme induit par l'allergène *Alternaria* ; en effet, *Alternaria* induit l'activation de protéases à sérines qui provoquent un dommage cellulaire important et donc la libération par les cellules épithéliales de l'IL-33 dans la matrice extracellulaire ([Snelgrove et al., 2014](#)). Ensuite, dans un modèle d'atteinte pulmonaire

avec une surinfection virale : le virus cause alors une nécrose cellulaire et donc une libération de l'IL-33 nucléaire stockée dans les cellules épithéliales ou endothéliales dans l'espace broncho alvéolaire ([Le Goffic et al., 2011](#)).

Dans notre modèle, les nanoparticules pourraient être toxiques et induire la mort cellulaire par nécrose. Nous ne pouvons donc pas totalement exclure la possibilité d'une libération de l'IL-33 dans le milieu extracellulaire. Mais le fait qu'on ne la détecte pas peut s'expliquer par deux mécanismes majeurs :

- L'IL-33 est bien libérée dans la matrice extracellulaire mais se retrouve très rapidement capturée et stockée par d'autres cellules comme les plaquettes et les hématies (aujourd'hui connues pour capturer l'IL-33) ([Wei et al., 2015](#)) ([Takeda et al.](#)).
- L'IL-33 est libérée en très faible quantité et l'ELISA n'est pas assez sensible pour la détecter et donc une très faible quantité de cette cytokine serait suffisante pour induire une inflammation via ST2.

Des deux hypothèses, la première semble la plus plausible. En effet, nous avons tenté de bloquer les actions de l'IL-33 extracellulaire en utilisant un anticorps anti IL-33 ou du ST2 recombinant et nos observations ne dénotent d'aucune différence entre les groupes de WT instillés aux nanoparticules avec ou sans traitement pour bloquer l'IL-33. Nous en avons donc conclu que l'effet de l'IL-33 observé était *stricto sensu* intracellulaire.

Dans les modèles d'allergies utilisés pour l'étude du rôle de l'IL-33, il a été montré que l'effet pro-inflammatoire de l'IL-33 est souvent dépendant de ST2 ([Li et al., 2014a](#)). Nous nous attendions donc à observer une diminution de l'inflammation chez les souris ST2^{-/-}, or nos résultats montrent que l'inflammation médiée par l'IL-33 est exacerbée en l'absence de ST2.

Plusieurs articles montrent que l'expression de l'IL-33 est constitutivement intracellulaire et nucléaire dans les cellules non inflammatoires (cellules endothéliales, cellules épithéliales). Il y a pour le moment peu d'articles qui décrivent le mode de « stockage » de l'IL-33 au sein des cellules proinflammatoires.

Certains papiers montrent que l'IL-33 peut être observée dans les macrophages uniquement en intracellulaire ([Martin and Martin, 2016b](#)). Par exemple dans le modèle d'inflammation induite par du lipopolysaccharide (LPS), il a été observé *in-vitro* que l'IL-33 est exprimée de façon intracellulaire dans les THP-1 et également dans le noyau et le cytoplasme des cellules endothéliales ([Nile et al., 2010a](#)).

Notre étude a montré pour la première fois, à notre connaissance, que l'inflammation médiée par les nanoparticules induit chez les macrophages alvéolaires de souris la production d'IL-33 intracellulaire ainsi que le recrutement et l'accumulation d'une forme clivée de l'IL-33 (18 KDa environ) au niveau des noyaux des THP-1.

Parce que les neutrophiles et les macrophages sont les cellules qui sont recrutées en plus grand nombre 24 heures après l'instillation de nanoparticules, et que les neutrophiles possèdent des enzymes capables de cliver l'IL-33 ([Lefrançais et al., 2012](#)), nous avons vérifié si les clivages de l'IL-33 étaient médiés par ces protéases neutrophiliques. Des souris Elafin Tg ont permis de montrer que la neutrophile élastase et la protéinase 3 sont des acteurs essentiels de l'inflammation médiée par les nanoparticules. Cependant, observant par Western blot une diminution de la forme entière de l'IL-33 et par conséquent des formes clivées, nous n'avons pas été en mesure de statuer sur leur implication dans la régulation du clivage de l'IL-33. On peut supposer que, étant impliquées dans d'autres mécanismes que le clivage de l'IL-33, par exemple dans la dégranulation des neutrophiles, la neutrophile élastase tout comme la protéinase 3 jouent un rôle dans l'établissement même du processus inflammatoire, mais pas particulièrement via un mécanisme dépendant de l'IL-33.

En étudiant *in vitro* les macrophages, deuxième type cellulaire recruté pendant l'inflammation, nos résultats montrent pour la première fois à notre connaissance que les macrophages humains (THP-1) possèdent comme les mastocytes (tryptase), une activité « trypsin-like » dans leur cytoplasme qui pourrait être à l'origine de la forme clivée de l'IL-33 recrutée dans le noyau.

Puisque l'inflammation est dépendante de ST2 et que l'action de l'IL-33 semble être intracellulaire, ST2 devrait aussi être actif dans les cellules. L'expression de ST2 dans le cytoplasme d'une lignée de macrophages humains (THP-1) a pu être observée par immunofluorescence. Il se trouve que ST2 est exprimé dans le cytoplasme des THP-1 et semble en partie co-localiser avec l'IL-33. Ce type d'interaction n'avait à notre connaissance jamais été observée dans les macrophages.

L'hypothèse est donc qu'en absence de ST2 intracellulaire, l'IL-33 alors bio-disponible va pouvoir être clivée et transloquée dans le noyau, augmentant potentiellement la réponse pro-inflammatoire induite par les nanoparticules. Une telle implication de ST2 intracellulaire comme acteur potentiel dans la régulation de l'inflammation pulmonaire médiée par l'IL-33, n'a apparemment encore jamais été décrite.

Il faudrait cependant pouvoir être en mesure de vérifier un certain nombre de choses :

- En effet, les immunofluorescences ayant été réalisées avec un anticorps polyclonal, il faudrait pouvoir vérifier ces résultats avec un anticorps monoclonal ; le problème est que les anticorps monoclonaux disponibles sont préconisés pour être utilisés en cytométrie en flux. Avec nos THP-1, il est difficilement envisageable de pouvoir vérifier la translocation nucléaire de l'IL-33 par cytométrie de flux. Il est également impossible de confirmer une colocalisation entre IL-33 et ST2, au niveau du cytoplasme avec cette technique.
- On peut également se demander sous quelle forme se retrouve le ST2 intracellulaire : s'agit-il de la forme soluble ou d'une forme capable de pouvoir induire une signalisation intracellulaire ? Malheureusement nous ne disposons pas encore des moyens techniques nécessaires à la vérification de cette information.

On trouve aussi dans la littérature, une publication qui fait état de la possibilité que l'IL-33 se lie à la sous unité p65 de NF- κ B pour réguler négativement la transcription du gène NF- κ B et par extension l'inflammation ([Ali et al., 2011b](#)).

Nous avons donc regardé à quoi pouvait se lier l'IL-33 dans le noyau. Après immunoprécipitation avec un anticorps anti-IL-33 qui reconnaît la partie C terminale de la protéine, trois bandes protéiques ont été identifiées, isolées et séquencées, montrant ainsi l'implication de 3 protéines dans l'interaction avec l'IL-33. Le facteur d'épissage riche en proline et glutamine, le facteur d'élongation 1 alpha et une ribonucléoprotéine sont des partenaires potentiels de l'IL-33 nucléaire. Nos résultats peuvent donc suggérer l'implication de ce complexe protéique dans la transcription de gènes proinflammatoires. Il apparaît alors, après l'étude de ces interactions qu'un autre partenaire du complexe puisse être une hélicase dépendante de l'ATP. Or les hélicases sont décrites dans la littérature comme des protéines qui sont notamment capables de réguler la transcription de gènes proinflammatoires ([Ranji and Boris-Lawrie, 2010](#)).

Pour confirmer et consolider cette hypothèse on peut imaginer les expériences suivantes :

- Réaliser un Western blot sur la fraction nucléaire pour confirmer la présence de ladite hélicase, avant de réaliser une immunoprécipitation à l'IL-33 et de cibler l'hélicase, et inversement.
- Utiliser des siRNA dirigés contre l'hélicase et voir si on a une diminution de l'expression de NF- κ B ou même une inhibition du recrutement de l'IL-33 dans le noyau suite aux nanoparticules de silice ou même au final, une inhibition de l'inflammation.
- Il faudrait également faire du fractionnement sur les macrophages alvéolaires des souris B6 et des souris déficientes pour ST2, afin de vérifier qu'effectivement la forme clivée présente

en quantité plus importante dans des souris déficientes pour ST2 par rapport aux souris WT.

- Il faudrait idéalement pouvoir séquencer le fragment nucléaire d'IL-33 que nous avons identifié pour entre autre, déterminer son site de clivage.

Une autre hypothèse pouvant expliquer l'inflammation observée chez les souris déficientes pour ST2, est à vérifier. En effet, on peut supposer qu'en inhibant ST2, on augmente la disponibilité de la chaîne IL-1RaCP qui lui est associée et qui est utilisée pour la signalisation d'autres cytokines comme l'IL-1 β , IL-1 α , augmentant l'inflammation.

Parce qu'il est majoritairement décrit dans la littérature que la partie N-terminale de l'IL-33 est celle qui se retrouve en général dans le noyau, nous ne pouvons exclure un moyen de régulation orchestré par cette partie fonctionnelle de l'IL-33. Pour confirmer cette hypothèse il faudrait répéter les expériences de fractionnement puis Western-blot en utilisant un anticorps anti-IL-33 spécifique de la partie N-terminale.

En outre, nous montrons que la production et l'expression de l'IL-1 β , joue un rôle dans l'expression de l'IL-33 attestant d'une possible boucle d'amplification entre l'IL-33 et l'IL-1 β . Pour confirmer cela il faudrait faire une expérience avec les souris déficientes pour l'IL-1 β et/ou le récepteur de l'IL-1 β et voir si suite à l'instillation de nanoparticules, nous observons une modification de la quantité d'IL-33 produite dans le tissu pulmonaire.

Notre étude montre également que les macrophages sont des cellules qui sont en mesure de jouer un rôle important dans la régulation de la réponse inflammatoire par le biais de l'IL-33. Cette régulation est plutôt fine puisque nous montrons qu'elle met en jeu, non pas la quantité intracellulaire d'IL-33 dans son ensemble mais l'importance de ses formes clivées et du recrutement de celles-ci dans le noyau pour potentiellement agir en tant que facteur de transcription.

Nous pouvons ainsi évaluer le potentiel thérapeutique de cette découverte ; en effet nous pouvons penser que dans ce processus inflammatoire un inhibiteur spécifique de la forme clivée de l'IL-33 ou de la translocation nucléaire de l'IL-33 pourrait permettre de diminuer l'inflammation médiée par l'IL-33, et ainsi de peut-être pouvoir prévenir la fibrose pulmonaire. Néanmoins, pour l'utilisation d'un tel traitement, un dépistage et un diagnostic très précoces sont absolument nécessaires, et manquent encore cruellement aujourd'hui.

L'identification de biomarqueurs se fait donc durement ressentir dans le contexte de la fibrose pulmonaire. Notre modèle d'inflammation pulmonaire induit par les nanoparticules de silices ne nous a pas permis d'identifier un biomarqueur de l'inflammation spécifique des nanoparticules, ni d'induire une fibrose pulmonaire à plus long terme (15 jours). La modélisation de cette pathologie par les nanoparticules est donc délicate et ceci pourrait en partie expliquer les difficultés rencontrées pour l'identification de marqueurs spécifiques.

Des études montrent que le polyacrylate était capable d'induire une effusion pleurale, une fibrose pulmonaire et le développement de granulomes ([Song et al., 2009](#)). La structure des nanoparticules est très importante dans le déclenchement de la fibrose pulmonaire. Toutefois dans notre modèle, nous n'avons pas été capable d'induire une fibrose pulmonaire avec nos nanoparticules de silices 15 jours après une seule et unique instillation. On pourrait alors imaginer que pour les nanoparticules dont nous disposons, 15 jours est une durée trop courte pour observer une fibrose pulmonaire, et/ou alors qu'il faudrait en instiller une quantité plus importante en plusieurs instillations. La question de la cohérence de la dose se pose alors, à savoir si la dose qui induirait potentiellement une fibrose pulmonaire serait une dose à laquelle un être humain pourrait être soumise dans la vie courante ?

D'autre part, il existe une grande variété de nanoparticules de silice, et plusieurs études toxicologiques ont pu montrer que selon la porosité, la capacité d'agrégation et de dissolution des

nanoparticules leur toxicité varie. Ainsi, il est envisageable qu'en changeant de type de nanoparticules de silice, nous soyons en mesure d'induire une fibrose pulmonaire chez la souris. De plus, administrées avec une autre nano structure comme les polyacrylates, on modifie également la réponse inflammatoire médiée par les nanoparticules. Il est donc important de bien rapporter les résultats observés aux nanoparticules avec lesquelles on travaille et de bien faire attention lorsque l'on compare les résultats obtenus dans différents modèles.

Pour conclure, nous avons donc montré que les nanoparticules de silices (15nm de diamètre) sont en mesure d'induire une inflammation pulmonaire qui fait intervenir l'IL-33. Nous montrons aussi qu'à l'état basal cette cytokine est répartie dans les cellules inflammatoires comme les macrophages (dans le cytoplasme), et dans les cellules non inflammatoires comme les cellules endothéliales (localisation nucléaire) de façon différente. Nous suggérons également une boucle d'amplification de l'IL-33 via l'IL-1 β . Enfin, nos résultats montrent que les nanoparticules de silices induisent le recrutement d'une forme clivée de l'IL-33 dans le noyau où associé à un complexe multiprotéique elle va être en mesure de moduler la transcription de gènes proinflammatoires. Ce mécanisme exclusivement intracellulaire de l'IL-33 est dépendant de ST2.

1.2 Rôle anti-inflammatoire de l'IL-33, dans un modèle de fibrose induite par la bléomycine

Le deuxième aspect de ma thèse a concerné l'étude du rôle de l'IL-33 et de son récepteur ST2 dans l'inflammation pulmonaire et la fibrose modélisée par l'instillation de bléomycine en nous servant non seulement du suivi classique des animaux mais également de l'IRM comme méthode de suivi de l'œdème pulmonaire.

Il existe dans la littérature plusieurs études qui montrent l'utilisation de l'IRM chez le rat et la souris pour le suivi de pathologies pulmonaires ([Egger et al., 2013](#)). Bien que controversée, l'utilisation de l'IRM comme technique de suivi est utile dans l'étude de l'inflammation et la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine car cette méthode permet notamment aux expérimentateurs d'appliquer la règle éthique des 3 R en réduisant les effectifs expérimentaux : en effet, les mêmes animaux sont utilisés non seulement pour l'étude de l'inflammation et de la fibrose mais aussi pour le sacrifice et le prélèvement d'échantillons biologiques.

Certes, chez l'Homme l'IRM pour le suivi de la fibrose pulmonaire ou en tant qu'outil diagnostique est très peu utilisée. En effet, les poumons humains étant dotés d'une surface plus importante que celle des poumons de souris, les images obtenues par cette technique sont moins précises. De par ce biais, la tomodensitométrie est de loin la technique de première intention utilisée pour le diagnostic de la fibrose pulmonaire chez les patients ; l'IRM ne peut donc être considérée comme une technique d'imagerie qui va pouvoir être extrapolée à l'Homme tant que les problèmes de résolutions d'images ne seront pas réglés. Cependant malgré ses points faibles, cette technique permet tout de même de comparer l'évolution de la pathologie chez la souris à celle de l'Homme et constitue donc un bon moyen pour valider le modèle.

Si dans la littérature des articles montrent que bloquer la protéine kinase C zeta (PKC ζ) permet de réduire la fibrose pulmonaire ([Vargas Buonfiglio et al., 2016](#)), le rôle joué par l'IL-33 dans la fibrose pulmonaire n'est pas clair. En effet tandis qu'un premier article montre le rôle pro-inflammatoire de l'IL-33, dépendant de ST2 avec une diminution de l'inflammation chez les souris déficientes pour le récepteur ([Li et al., 2014b](#)), un autre article montre l'effet anti-inflammatoire de ST2 en utilisant des souris qui sur-expriment ST2 et chez qui il y a une diminution de l'inflammation et de la fibrose après l'instillation de bléomycine. ([Mato et al., 2009](#)).

Au laboratoire, l'équipe a longtemps travaillé sur le modèle de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine et notamment le rôle de l'inflammasome NLRP3 dans ce processus inflammatoire. Le peu de données présentes dans la littérature sur le rôle de l'IL-33 dans la phase aiguë de la maladie, nous a encouragés à poursuivre l'étude du rôle de cette cytokine et de son activité dans

un modèle autre que celui des nanoparticules. L'étude a alors abouti à l'observation d'un phénotype similaire à celui trouvé dans le modèle nanoparticules, à savoir que la bléomycine induit une inflammation et une fibrose pulmonaire qui sont plus importantes chez les souris déficientes pour ST2 en comparaison aux souris de type sauvage. Cette étude montre également que la bléomycine induit la formation de formes clivées d'IL-33. Ces résultats suggèrent plutôt un effet anti-inflammatoire de l'IL-33.

Le début de cette étude a également permis la mise en place de l'IRM chez la souris de façon efficace et a constitué un bon outil pour suivre l'évolution de la maladie en nous permettant de corréler l'évolution de la pathologie à l'apparition d'œdème pulmonaire au niveau des bronches.

Aux vu des résultats obtenus lors de cette étude il faudrait davantage pousser la recherche mécanistique afin de savoir si dans ce cas l'IL-33 agit de la même façon que dans le modèle nanoparticules afin d'apporter de la robustesse à nos observations.

1.3 NLRP6 est impliqué dans la régulation de l'inflammation en réponse à la fumée de cigarette

Le dernier aspect abordé lors de ma thèse a concerné le rôle du récepteur NLRP6 et/ou de l'inflammasome NLRP6 dans l'inflammation pulmonaire provoquée par la fumée de cigarette.

Dans la littérature de nombreux articles décrivent les mécanismes de la phase chronique de la BPCO et le rôle joué par les cellules T dans cette pathologie ([Chen et al., 2016](#)) ([Saetta et al., 1993](#)). D'autres se focalisent sur la phase d'exacerbation de la pathologie avec des surinfections bactériennes ou virales ([Wilson, 1998](#)). Cependant très peu d'études concernent la phase aiguë de la BPCO. Le choix de travailler sur un modèle aigu d'exposition a été fait afin d'essayer de comprendre comment s'installe l'inflammation et quels sont les acteurs et mécanismes de cette inflammation.

C'est donc sur ce dernier point que l'équipe a décidé de centrer ses recherches et plus particulièrement sur l'étude du rôle de l'inflammasome NLRP6.

Il est connu dans la littérature que lors de la phase aiguë, la fumée de cigarette active les macrophages et les cellules épithéliales via les TLR et la libération de chimiokines due à l'induction du stress oxydatif.

Notre étude montre que le récepteur NLRP6 est impliqué dans l'établissement de l'inflammation pulmonaire en réponse à la fumée de cigarette. En effet, les souris déficientes pour ce récepteur NLRP6, présentent une diminution drastique de l'inflammation cellulaire avec la diminution notamment des neutrophiles recrutés dans l'espace broncho-alvéolaire, ainsi qu'une diminution importante de la production de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires tels que la MPO, LCN2, BAFF, KC, l'IL-6 et l'IL-1 β au sein de l'organe.

Nous avons également montré pour la première fois que l'expression de NLRP6 par les cellules résidentes est nécessaire au recrutement de neutrophiles lors de la réponse inflammatoire pulmonaire à la fumée de cigarette. NLRP6 est également impliqué dans la régulation de l'activation des cellules épithéliales, pour leur permettre de sécréter des chimiokines telles que LIX et KC.

Il existe un papier paru en novembre 2015 qui montre que lors d'une infection virale le récepteur NLRP6 est capable de se fixer à l'ARN viral via l'ARN hélicase DhX15 pour induire la production d'interférons de type I et III (IL-28) ([Wang et al., 2015a](#)). Or nous avons pu observer une diminution du recrutement cellulaire au sein des poumons mais aussi une diminution de CXCL5 dans le lavage broncho-alvéolaire des souris déficientes pour le récepteur aux interférons de type I et III (IL-28R). De surcroît nous notons une diminution d'IL-28 chez les souris déficientes pour

NLRP6. Nous supposons alors que NLRP6 jouerait éventuellement un rôle dans la production d'interférons de types I et III.

Un profil inflammatoire similaire chez les souris déficientes pour NLRP3 a été constaté ; à savoir une réduction importante du nombre de neutrophiles recrutés dans les poumons, ainsi qu'une diminution globale de la réponse inflammatoire. Nos résultats suggèrent alors que l'inflammasome NLRP3 serait impliqué dans la réponse inflammatoire liée à la fumée de cigarette. De plus les premiers résultats de Western-blot que nous avons obtenus semblent indiquer une diminution de l'expression de NLRP3 chez les souris déficientes pour NLRP6 en comparaison aux WT exposées à la fumée de cigarette, ce qui pourrait indiquer une régulation de NLRP3 par NLRP6.

D'autre part, dans cette pathologie, NLRP6 semble jouer un rôle indépendant de la formation d'un complexe inflammasome classique. En effet, certains paramètres inflammatoires très dépendants de NLRP6 comme la sécrétion de la chimiokine LIX, et Lungkine, sont indépendants d'ASC et des caspases 1 et 11. Il n'est pas exclu que l'accumulation intracellulaire de ces chimiokines dans les poumons des souris déficientes pour NLRP6 et donc leur absence dans le lavage bronchoalvéolaire, puisse expliquer l'absence de recrutement des neutrophiles. De même que le peu d'inflammation observée chez ces souris traitées par la fumée de cigarette. Il faut alors noter que cette absence de sécrétion concorde avec ce qui a pu être observé dans l'intestin de souris déficientes pour NLRP6, où le mucus produit par les cellules caliciformes, via des mécanismes associant les autophagosomes, ne pouvait pas être exporté ([Wlodarska et al., 2014b](#)). Ici NLRP6 agirait alors en s'associant à d'autres partenaires pour induire la signalisation conduisant à l'inflammation et indirectement au recrutement de cellules inflammatoires. La caractérisation de ces voies de signalisations et des mécanismes cellulaires induits impliquant NLRP6, permettrait de valider cette hypothèse.

De plus, il serait important de pouvoir visualiser l'expression de NLRP6 au niveau des poumons des souris exposées. Comme ce qui a déjà été démontré dans les intestins ([Elinav et al., 2011b](#)), NLRP6 pourrait également être impliqué de façon plus directe sur le microbiote pulmonaire. Ainsi, en permettant le maintien de l'équilibre d'une certaine flore pulmonaire, NLRP6 pourrait être impliqué dans la surinfection bactérienne ou virale lors de la BPCO.

Il est aussi possible que l'expression de NLRP6 dans les cellules résidentes de l'intestin et le microbiote intestinal agisse de façon indirecte sur la réponse inflammatoire pulmonaire. En effet plusieurs articles montrent l'action que peut avoir le microbiote intestinal sur la réponse inflammatoire pulmonaire ([Schuijt et al., 2016](#)). Par exemple plusieurs chercheurs ont montrés que NLRP6 est impliqué dans la régulation du microbiote intestinal pour empêcher le développement de colites ou de tumeurs ([Normand et al., 2011b](#)). Ces articles montrent également que l'effet de NLRP6 sur le microbiote est transmissible en effectuant un transfert de microbiote ([Elinav et al., 2011b](#)).

Afin de prouver que dans notre modèle d'exposition à la fumée de cigarette le phénotype observé chez les souris déficientes pour NLRP6 résulte d'un dérèglement intestinal, il faudrait mettre en contact des souris axéniques avec des fèces de souris déficientes pour NLRP6 pour leur transférer le microbiote intestinal. Après exposition de ces souris reconstituées, à la fumée de cigarette l'évaluation de leur phénotype permettrait ou non de valider l'hypothèse de départ. Il s'agirait alors de la première démonstration de l'influence du contrôle du microbiote intestinal par NLRP6 sur une pathologie pulmonaire.

Un article paru en juin 2016 dans *mucosal immunology* montre que l'expression de NLRP6 dans les monocytes inflammatoires Ly6C⁺ est capable de réduire l'inflammation intestinale causée par le sodium Sulfate dextran (DSS) ([Seregin et al., 2016](#)). Il devient alors tout aussi important d'étudier dans notre modèle, le rôle que peut avoir NLRP6 sur les monocytes inflammatoires au sein du poumon.

Dans la publication de Latz et al, paru en juin 2014 dans « *Nature Immunology* », il est montré que, suite à une stimulation de l'inflammasome NLRC4, une accumulation de la molécule

adaptatrice ASC dans la matrice extracellulaire sous forme de « ASC speck » (ASC induisant sa propre oligomérisation) se produit ([Franklin et al., 2014](#)). Cette structure est active et agit comme signal de danger pour induire la maturation de la caspase-1 et donc par extension, de l'activation de l'IL-1 β . Il serait alors très intéressant de voir si dans notre modèle, NLRP3 et ou NLRP6 sont capables ou non de se comporter de la même façon et ainsi de contrôler l'inflammation. Dans ce cas NLRP3 et/ou 6 agiraient comme un inflammasome permettant la formation de « specks » et l'activation de la caspase-1.

D'autre part il a été observé la formation de follicules lymphoïdes chez les patients atteints de BPCO. Notre équipe a par ailleurs démontré l'implication du « B cell activating factor » (BAFF) dans le modèle bléomycine ([Francois et al., 2015](#)) et d'autres papiers ont fait état de son implication dans la BPCO. En effet BAFF, une cytokine de la superfamille du TNF, est surexprimée dans les poumons des patients atteints de BPCO et induit la formation de follicules lymphoïdes ([Seys et al., 2015](#)). Comme mentionné plus haut peu d'études s'intéressent à la phase aiguë de cette pathologie; il serait alors intéressant de comparer l'étude du rôle de NLRP6 et de BAFF dans ce modèle, afin de mieux comprendre le mécanisme mis en place lors de la réponse aiguë. Les résultats préliminaires obtenus sur des souris inactivées pour BAFF, montrent que celui-ci joue également un rôle dans le processus inflammatoire, puisque ces dernières présentent une diminution de l'inflammation.

En conclusion, nous montrons que NLRP6 joue un rôle important dans l'inflammation pulmonaire aiguë en réponse à la fumée de cigarette. Les mécanismes mis en jeu doivent être d'avantage explorés pour comprendre le mode de régulation opéré par NLRP6. Cette découverte pourrait suggérer l'importance de NLRP6 en tant que régulateur de l'inflammation au niveau pulmonaire, et pourrait constituer une nouvelle cible thérapeutique et peut-être un nouveau facteur de diagnostic du stade précoce de la BPCO.

Il faudrait également envisager d'étudier le rôle de NLRP6 dans un modèle *in vitro* d'extrait de fumée de cigarette pour permettre de mieux appréhender la mécanistique et le rôle de NLRP6 sur différents types cellulaires isolés.

Il serait bien entendu intéressant d'étudier le rôle de NLRP6 lors de la phase chronique de la BPCO afin de voir s'il influence la réponse adaptative en jouant sur la différenciation des cellules T.

Nous avons montré que les souris déficientes pour NLRP6 présentent une baisse très importante de l'inflammation en réponse à la fumée de cigarette ; par contre nous ne savons pas si elles finiront par développer un emphysème ou non. Il serait donc important d'effectuer des expériences *ex vivo* sur des cellules épithéliales pulmonaires ou trachéales issues de souris déficientes pour NLRP6 par exemple ou encore *in vivo* sur des modèles d'emphysème pulmonaire comme l'instillation intranasale d'élastase de porc (PPE) ou de particules de noir de carbone.

1.4 BPCO et fibrose pulmonaire, les enjeux thérapeutiques actuels

Tout au long de ce travail, deux pathologies pulmonaires majeures ont été étudiées : la BPCO et la fibrose pulmonaire.

La BPCO est une maladie pour laquelle il n'existe à ce jour aucun moyen thérapeutique capable de réduire de façon significative l'évolution de la maladie. Les substances utilisées actuellement sont les bronchodilatateurs, des agonistes des récepteurs adrénergiques- β 2 (l'indacaterol ou l'olodaterol) ainsi que des antagonistes des récepteurs muscariniques (glycopyrrolate ou l'umeclidinium). Ces derniers sont connus pour être impliqués dans la broncho relaxation et la vasodilatation. Cependant bien que ces molécules réduisent les effets mécaniques induits par la BPCO, celles-ci ne sont pas en mesure d'atténuer l'inflammation pulmonaire présente lors de la maladie. D'autre part, les corticostéroïdes prescrits pour les patients asthmatiques se sont avérés inefficaces pour ceux atteints de BPCO. En effet pour que les corticostéroïdes puissent avoir un

effet anti-inflammatoire, il est nécessaire que leur récepteur soit désacétylé par l'histone désacétylase 2 (HDAC2). Or l'expression et l'activité de HDAC2 est diminuée chez les patients atteints de BPCO ; cela explique en partie pourquoi les patients sont résistants au traitement. ([Jiang and Zhu, 2016](#))

Il est donc primordial de trouver un traitement anti-inflammatoire pour réduire, l'évolution de la maladie. Récemment un inhibiteur de la phosphodiesterase 4 (Roflumilast) a été testé comme traitement de l'inflammation ; mais son utilisation reste limitée à cause d'un effet secondaire majeur que sont les fortes nausées induites chez des patients souvent dénutris et qui donc tend à aggraver l'état général du patient.

La BPCO fait donc aujourd'hui l'objet de plus en plus d'études en recherche fondamentale et appliquée pour tenter de mettre en évidence des cibles thérapeutiques potentielles. Ainsi, différents moyens sont à l'étude pour empêcher l'évolution de l'inflammation chez les patients (**Figure 38**) ([Barnes, 2013](#)) :

- Arrêter la principale cause de la BPCO connue à ce jour, à savoir le tabagisme (cependant l'inflammation peut perdurer même après la cessation de la cigarette) ([Hogg, 2006](#)).
- L'utilisation d'antioxydants pour bloquer l'action des ROS qui sont fortement induits dans la BPCO.
 - o comme des réducteurs de l'expression du facteur de transcription « nuclear factor erythroid 2-related factor 2 » (NRF2)
 - o des activateurs de la NADPH oxydase
 - o des activateurs des myéloperoxydases
 - o des réducteurs de l'expression de la superoxyde dismutase
- Développer des inhibiteurs de différents inflammasomes (NLRP3 notamment) car il est fait état dans cette maladie d'une importante production d'IL-1 β dépendante des inflammasomes.
 - o Cela implique donc l'utilisation d'inhibiteurs de l'IL-1 α et β (anakinra)
 - o Des inhibiteurs de la caspase 1 (VX765)
 - o Des anticorps dirigés contre l'IL-18 (GSK1070806)
 - o Des anticorps dirigés contre l'IL-1 β (canakinumab)
- Essayer d'abolir la résistance aux corticostéroïdes pour diminuer l'inflammation.
 - o En utilisant des antioxydants comme des activateurs de NRF2
 - o Des inhibiteurs des oxydes nitriques
 - o Utilisation de macrolides pour augmenter l'expression de l'ARNm de l'histone désacétylase 2 (HDAC2)
- Utiliser des antibiotiques pour éviter la phase d'exacerbation, souvent associée à une colonisation bactérienne ou virale.
- Utiliser des antagonistes des chimiokines pour empêcher le recrutement des cellules pro-inflammatoires.
- L'utilisation d'anti-protéases (anti-MMP9 et anti-élastase de neutrophile) pour empêcher la dégradation excessive du tissu pulmonaire.

- Des traitements anti-inflammatoires comme les inhibiteurs de la phosphodiesterase 4.
- Des agonistes ou antagonistes des cytokines impliquées dans la pathologie (anti-TNF par exemple).
- Développer des molécules capables d'inhiber le développement de la fibrose en ciblant le TGF- β par exemple.
- Bloquer l'emphysème en favorisant la régénération du tissu pulmonaire par une stimulation des cellules souches pulmonaires et de l'acide rétinolique.
- Bloquer la sécrétion excessive de mucus en jouant sur les muco-régulateurs comme EGFR (« epidermal growth factor receptor ») et les mucines.

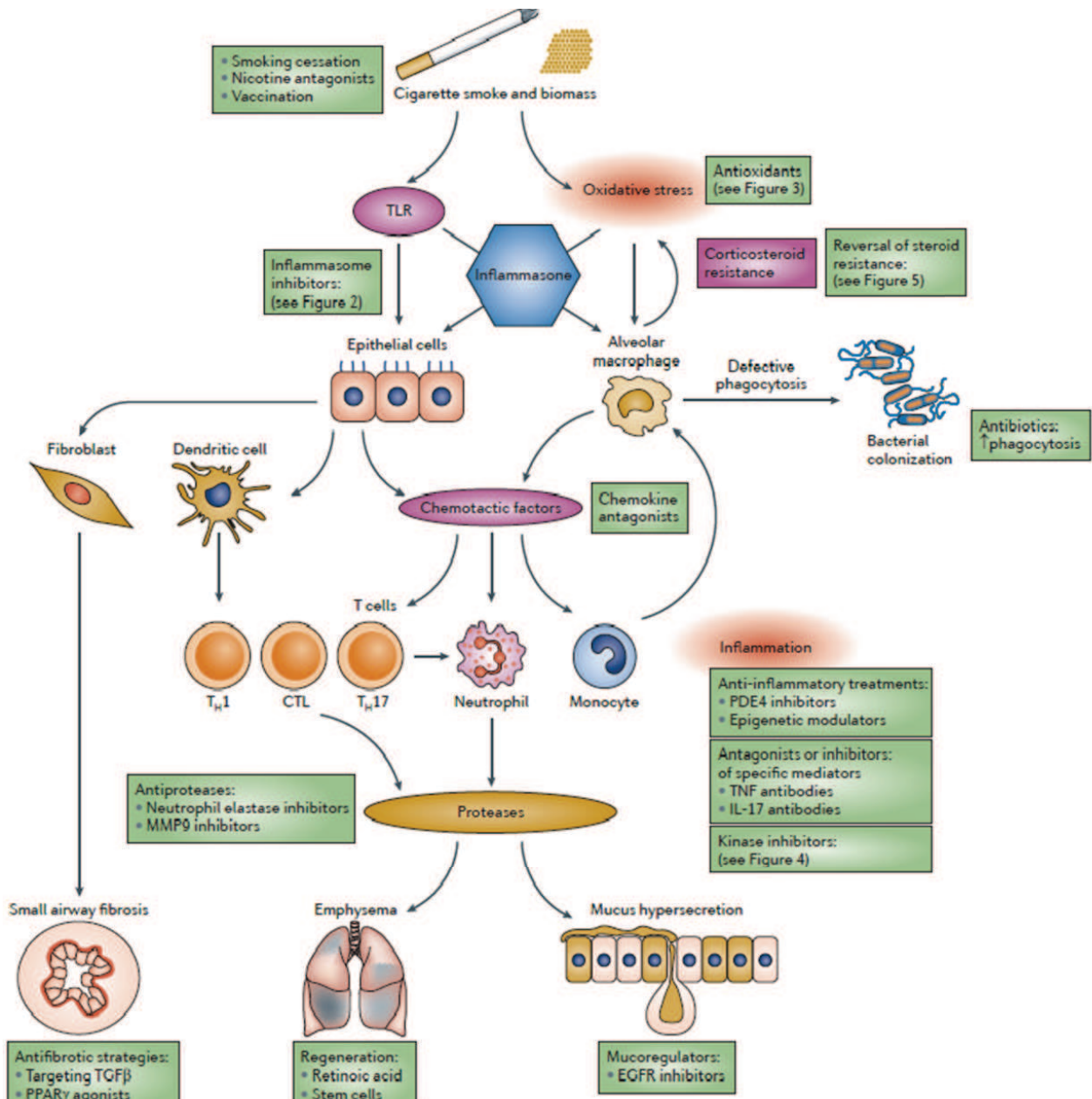


Figure 38 : Présentation des cibles thérapeutiques en cours de développement contre la BPCO.

(Barnes, 2013)

Dans ce contexte notre étude sur NLRP6 prend tout son sens. En effet, si NLRP6 agit bien en tant que régulateur de l'inflammation en réponse à la fumée de cigarette, comme le suggère nos

résultats, la neutralisation de ce récepteur permettrait de bloquer en amont le développement de l'emphysème chez la souris et potentiellement chez les patients.

Cependant plusieurs obstacles majeurs mettent un frein à l'identification de biomarqueurs spécifiques et au développement de thérapies efficaces chez l'Homme :

- Le manque d'information sur les différentes phases inflammatoires chez les patients. En effet, il y a de plus en plus d'informations sur les phases d'exacerbation de la BPCO mais peu en revanche sur les phases inflammatoires plus précoces de la maladie.
- L'hétérogénéité de la maladie ; en effet la BPCO possède différents stades (classification de GOLD) associés à un statut inflammatoire et symptomatique différent ce qui rend difficile l'utilisation d'un médicament unique pour le traitement des patients.
- Manque d'identification de marqueurs pouvant être utilisés pour diagnostiquer la maladie ou suivre son évolution. A ce jour la BPCO se diagnostique très tard chez les patients et cela constitue un vrai problème dans la mise en place du traitement car le plus souvent les poumons sont déjà beaucoup trop endommagés pour envisager un traitement curatif efficace. Il n'existe pas à notre connaissance de marqueurs biologiques utilisable pour effectuer un diagnostic précoce qui permettrait la mise en place d'un traitement curatif.
- La durée des études cliniques et précliniques menées pour pouvoir démontrer l'efficacité clinique d'un composant.
- Les effets des médicaments utilisés ne sont pas immédiats et demandent un certain temps pour attester de leur efficacité ; temps que grand nombre de patients n'ont pas au moment du diagnostic.

La BPCO reste une maladie incurable et constitue un enjeu thérapeutique majeur, il est donc nécessaire de poursuivre et d'approfondir la recherche fondamentale afin de pouvoir solutionner les problèmes évoqués ci-dessus et trouver un moyen de réguler l'inflammation. Ainsi, dans ce contexte, mieux comprendre l'implication de NLRP6 dans cette maladie peut constituer un moyen d'améliorer l'efficacité des traitements qui sont en cours de développement.

La fibrose pulmonaire idiopathique est une maladie pulmonaire qui engage le pronostic vital des patients et pour laquelle il n'y a pas encore à ce jour de traitement efficace. La fibrose pulmonaire fait également l'objet d'études afin de trouver un ou plusieurs traitements efficaces qui pourraient ralentir ou résorber la progression de la maladie.

Parce que des études ont montré l'implication de la coagulation dans la pathologie, la warfarine, un anticoagulant est utilisé dans le traitement de la fibrose pulmonaire mais il a été constaté lors d'essais cliniques, que cela induisait une surmortalité dans le groupe des patients atteints de fibrose pulmonaire. ([Adegunsoye and Strek](#))

La bithérapie constituée de prednisone et d'azathioprine était déjà utilisée dans les essais cliniques par les médecins pour atténuer l'évolution de la maladie. Les effets de la bithérapie n'étant pas assez efficaces, une trithérapie mettant en jeu les immunosuppresseurs comme le N-acetylcystéine en plus de la prednisone et de l'azathioprine pour réduire la pathologie a été mis en place. Malgré cela les études cliniques ont montré que la trithérapie mise en place augmentait la mortalité des patients en comparaison du groupe placebo. ([Adegunsoye and Strek](#))

Les scientifiques sont à la recherche de molécules pouvant atténuer l'évolution de la fibrose. La pirfenidone par exemple est un médicament qui, lors des essais clinique réduit la fibrose ; il s'agit d'un analogue de la pyridone qui agit à différents niveaux comme l'inhibition de cytokines impliquées dans l'inflammation et la fibrose (TNF- α et TGF- β). ([Adegunsoye and Strek](#))

Un autre médicament, le nintedanib a été développé ; il s'agit d'un inhibiteur des tyrosines kinases qui bloque la prolifération des cellules endothéliales et des cellules du muscle lisse. Sur les

myofibroblastes des patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique, le nintedanib augmente l'expression des métalloprotéinases tout en réduisant la prolifération cellulaire et la sécrétion de collagène. Les études cliniques menées à ce jour montrent des résultats contradictoires sur le blocage éventuel de l'exacerbation de la fibrose chez les patients sous traitement ; ce composé est donc toujours à l'étude. ([Adegunsoye and Strek](#))

D'autres médicaments potentiels sont à l'étude aujourd'hui comme l'inhibiteur de l'enzyme LOXL2, le simtuzumab. En effet les chercheurs ont pu montrer que LOXL2 et la SERPINH1 sont impliqués dans la biosynthèse du collagène ; leur inhibition par des micro-ARN aboutit à la diminution de la fibrose pulmonaire. ([Kamikawaji et al., 2016](#))

La fibrose pulmonaire est donc encore aujourd'hui une maladie incurable dont le diagnostic précoce reste très difficile à établir du fait du manque d'identification de biomarqueurs et pour laquelle il n'existe toujours pas de traitement efficace. Notre étude permet d'envisager l'IL-33 comme cible thérapeutique lors de la phase précoce de l'inflammation pulmonaire afin d'empêcher le développement de la fibrose. Cependant il est nécessaire de poursuivre les investigations sur cette molécule car, étant impliquée dans de nombreuses pathologies inflammatoires, il est indispensable de bien comprendre son rôle pour pouvoir éviter une éventuelle aggravation de l'état général du patient.

Par conséquent, en se penchant sur NLRP6 dans la BPCO d'une part et sur l'IL-33 dans la fibrose pulmonaire d'autre part, mes travaux de thèse ont potentiellement mis en évidence deux cibles intéressantes et dont la mécanistique reste à creuser plus en détails pour déterminer si elles constitueraient des stratégies thérapeutiques efficaces.

1.5 Pertinence du modèle murin utilisé dans l'étude de la fibrose pulmonaire et la BPCO

Pour l'étude de la fibrose pulmonaire et de la BPCO, le modèle expérimental murin est celui qui a été choisi. Comme nous avons pu le voir au début de l'introduction, l'arbre bronchique de cet animal est proche de celui de l'homme ; de plus, l'étude de ces pathologies dans le modèle murin avait déjà été mise en place au laboratoire.

Pour l'étude de ces pathologies, un modèle idéal serait un modèle qui possède une anatomie et une pathologie identique en tous points à celle de l'Homme, mais malheureusement un tel modèle n'existe pas. Il faut donc essayer de s'en approcher le plus possible en utilisant un modèle qui possède une anatomie pulmonaire proche de l'Homme et chez qui on peut reproduire la pathologie humaine en réunissant toutes ou du moins, la plupart des caractéristiques de la maladie pour que les conclusions expérimentales puissent être étendues à l'Homme.

Pour l'étude de la fibrose pulmonaire les principales études sont réalisées sur le rat et la souris. En plus des deux espèces précédemment citées, pour l'étude de la BPCO en revanche, d'autres rongeurs sont utilisés en expérimentation animale comme le cochon d'inde. Ces espèces ont chacune des particularités développementales (proportions en cellules ciliées et non ciliées, développement embryonnaire des alvéoles pulmonaires) qui différencient leurs poumons de celui de l'Homme, mais qui permettent néanmoins l'étude de la BPCO. ([Wright et al., 2008](#))

Avant de choisir un modèle d'expérimentation animale, il est important de prendre en considération que l'un de nos objectifs en tant que chercheur est de se rapprocher le plus possible de la règle éthique des 3 R : Remplacer en évitant d'utiliser le modèle animal quand cela est possible, Réduire en diminuant au maximum le nombre d'animaux dans nos cohortes expérimentales, Raffiner en évitant de faire souffrir les animaux et en veillant à leur bien-être.

Cependant suivre ces règles représente aussi certaines contraintes ; par exemple afin de « Réduire » tout en travaillant avec le modèle le plus proche possible de l'homme, on pourrait considérer que le primate non humain constitue un excellent modèle d'étude car la structure et la composition des poumons se rapprochent davantage de celle de l'Homme. Néanmoins, travailler sur un primate non humain, représente un coût certain (achat et élevage) par rapport à celui d'utiliser la souris ; des contraintes expérimentales, car les groupes expérimentaux sont réduits et qu'il est aussi plus difficile de « manipuler » un primate non humain qu'une souris, car cela peut nécessiter au préalable un conditionnement comportemental et présenter des risques non négligeables pour l'intégrité physique de l'expérimentateur. De plus l'expérimentation sur les primates non humains exclut d'office l'utilisation de primates génétiquement modifiés (pas de vente de primates « knock-out »).

Le fait de travailler sur la souris peut également soulever des doutes sur la valeur scientifique des découvertes, à savoir sera-t-il possible de transposer les mécanismes identifiés chez l'Homme ? A cela nous pouvons faire état de grandes découvertes comme celle des « Toll-like receptors » par Jules Hoffman, Bruce Beutler et Ralph Steinman, qui constitue une des plus grandes avancées planétaires d'un point de vue immunologique. Cette découverte majeure a été faite en 1996 sur la drosophile, une mouche qui de prime abord se trouve être bien différente de l'Homme.

De ce fait, travailler sur la souris au regard de cette avancée majeure semble être acceptable ; mais ça ne veut pas pour autant dire que l'on va pouvoir systématiquement transposer à l'Homme ce que l'on découvre chez la souris.

Les modèles mis en place pour l'étude de pathologies comportent une autre particularité ; en effet l'induction de la pathologie dans nos modèles se fait de façon très rapide en comparaison à ce qui se passe chez l'Homme. La BPCO par exemple est une maladie qui est souvent diagnostiquée chez les personnes âgées et donc après de longues années de vies, tandis que chez la souris cette pathologie est modélisée en quelques semaines. Il est donc aussi important de replacer temporellement les découvertes afin de mieux évaluer les risques encourus par les individus.

En ce qui concerne l'étude des maladies pulmonaires, nous cherchons à modéliser une atteinte respiratoire alors que les souris n'éternuent ni ne toussent ; en cela elles sont très différentes des hommes. Malgré l'absence de toux et d'éternuement, les souris présentent une atteinte pulmonaire qui est similaire à celle de l'Homme au sens où, non seulement nous pouvons modéliser une inflammation pulmonaire, une fibrose et également un emphysème pulmonaire. La modélisation de ces atteintes pulmonaires se traduit par une modification tissulaire et une réponse immunitaire proche de celle observée chez l'homme.

De plus, travailler sur la souris comporte un avantage certain qui est celui d'avoir accès à un très large panel si ce n'est le plus grand, de souris génétiquement modifiées pour mieux étudier les mécanismes biologiques mis en jeu dans les différents modèles.

Il nous incombe aussi en tant que chercheur de toujours garder un point de vue critique sur l'utilisation de modèles animaux pour pouvoir contextualiser au mieux les éventuelles découvertes effectuées.

Par exemple en ce qui concerne le modèle d'inflammation pulmonaire avec des nanoparticules, nous pouvons nous poser la question de la pertinence d'utiliser une seule instillation d'une unique sorte de nanoparticules. En effet, dans l'environnement nous sommes soumis tous les jours à l'inhalation de différentes variétés de nanoparticules, étant sous-entendu que l'effet observé est potentiellement un effet de plusieurs nanoparticules combinées et due à une exposition répétée.

Comme premier élément de réponse, il est nécessaire de remonter aux effets observés suite à l'inhalations de microparticules de silice. Il avait alors été constaté que les employés qui travaillaient à la confection de matériaux mettant en jeu ces microparticules, avaient tendance à développer une silicose. Une seule et unique sorte de microparticule est donc en mesure d'induire une fibrose pulmonaire. Sachant cela, il devient important de décortiquer l'effet exact de chaque agent potentiellement impliqué dans la pathologie, afin de pouvoir mieux comprendre le(s)

mécanisme(s) mis en place et ainsi mieux appréhender les conséquences de la combinaison de plusieurs agents étiologiques sur la santé.

Pour ce qui est du modèle d'exposition à la fumée de cigarette utilisé pour modéliser la BPCO, l'une des critiques qui pourrait être formulée à juste titre, serait qu'avec le modèle d'exposition dont nous disposons, nous observons les effets d'un tabagisme passif et pas celui d'un tabagisme actif, les souris ne pouvant pas fumer toutes seules. La réponse apportée est la suivante : au vu des résultats dramatiques que nous observons sur les poumons avec ce mode d'exposition on pourrait raisonnablement penser que les effets d'un tabagisme actif seraient d'autant plus importants ; cette observation élargit aussi considérablement le nombre de personnes qui pourraient être touchées par les effets de la cigarette.

En conclusion, nous pouvons difficilement statuer sur le meilleur modèle à utiliser pour étudier par exemple la BPCO car ils ont tous leurs avantages (modélisation possible et rapide de la pathologie) et leurs inconvénients (composition différente de l'épithélium trachéal par exemple). En revanche, les gros avantages de travailler sur le modèle murin sont qu'il y a déjà un grand nombre de données dans la littérature sur ce modèle qui permet la comparaison de résultats. De plus un accès à un grand nombre de souris génétiquement modifiées est possible. Cela permet de davantage décortiquer les mécanismes mis en jeu chez un animal présentant une atteinte tissulaire et une réponse immunologique proche de celle observée chez l'homme. Il est nécessaire quand cela est possible et pertinent, d'en avoir plusieurs pour confronter les résultats et aboutir aux bonnes conclusions.

Conclusion

Les bronchopneumopathies ont toujours existé et représentent à elles seules 3,1 millions de décès de par le monde. Parmi elles la fibrose pulmonaire et la BPCO représentent aujourd'hui un problème majeur de santé publique ; incurables elles sont associées à un taux de mortalité élevé des patients dès le diagnostic. De plus il n'existe à ce jour aucun moyen de traitement efficace pour lutter contre la BPCO et la fibrose pulmonaire, en dehors d'une transplantation pulmonaire souvent associée à une transplantation cardiaque.

Au cours de ma thèse ces deux pathologies ont été étudiées. Ainsi plusieurs aspects de l'inflammation pulmonaire ont pu être explorés, d'abord dans un modèle d'inflammation induit par les nanoparticules puis la bléomycine et enfin la fumée de cigarette.

Nous avons pu établir l'importance de l'axe IL-33/ST2 dans deux modèles bien distincts, et mis en évidence le mode de régulation de l'IL-33 bien différent au sein des cellules inflammatoires comme les macrophages en comparaison à ce qui est connu dans la littérature sur les cellules épithéliales par exemple ; nous montrons ainsi que l'expression de l'IL-33 et de ST2 en intracellulaire notamment au niveau nucléaire (pour l'IL-33) joue un rôle très important dans l'inflammation.

D'autre part mes résultats de thèse ont permis de montrer l'implication de NLRP6 dans l'inflammation médiée par la fumée de cigarette et son rôle non pas en tant qu'inflammasome mais en tant que régulateur de l'activation des cellules épithéliales et du recrutement des neutrophiles au sein du tissu pulmonaire. Rôle qui implique NLRP3 mais également les interférons de types I et III. Il serait alors intéressant d'approfondir la recherche sur NLRP6 pour permettre d'expliquer son mode d'action dans les poumons lors de l'inflammation.

Les travaux menés pendant ces trois années de thèse permettent, par l'étude approfondie de l'inflammation, notamment de la phase aigüe de la fibrose pulmonaire et la BPCO, de faire émerger des pistes thérapeutiques qui pourraient éventuellement être couplées aux cibles thérapeutiques déjà existantes afin de ralentir et peut-être bloquer l'évolution de la maladie chez l'homme.

(1993). Mice that lack the interferon-gamma receptor have profoundly altered responses to infection with *Bacillus Calmette-Guerin* and subsequent challenge with lipopolysaccharide. *The Journal of Experimental Medicine* 178, 1435-1440.

Aachoui, Y., and Miao, E.A. (2016). Down with doublespeak: NAIP/NLRC4 inflammasomes get specific. *The Journal of Experimental Medicine* 213, 646-646.

Abonia, J.P., Austen, K.F., Rollins, B.J., Joshi, S.K., Flavell, R.A., Kuziel, W.A., Koni, P.A., and Gurish, M.F. (2005). Constitutive homing of mast cell progenitors to the intestine depends on autologous expression of the chemokine receptor CXCR2. *Blood* 105, 4308-4313.

Adegunsoye, A., and Strek, M.E. Therapeutic Approach to Adult Fibrotic Lung Diseases. *Chest*.

Agence National de sécurité du médicament (2013). Résumé des caractéristiques du produit. <http://agence-prdansmsantefr/php/ecodex/rcp/R0229435htm>.

Aggarwal, B.B. (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 3, 745-756.

Aghilinejad, M., Naserbakht, A., Naserbakht, M., and Attari, G. (2012). Silicosis among Stone-Cutter Workers: A Cross-Sectional Study. *Tanaffos* 11, 38-41.

Ali, S., Mohs, A., Thomas, M., Klare, J., Ross, R., Schmitz, M.L., and Martin, M.U. (2011a). The dual function cytokine IL-33 interacts with the transcription factor NF-kappaB to dampen NF-kappaB-stimulated gene transcription. *J Immunol* 187, 1609-1616.

Ali, S., Mohs, A., Thomas, M., Klare, J., Ross, R., Schmitz, M.L., and Martin, M.U. (2011b). The Dual Function Cytokine IL-33 Interacts with the Transcription Factor NF-kB To Dampen NF-kB-Stimulated Gene Transcription. *The Journal of Immunology* 187, 1609-1616.

Anand, P.K., and Kanneganti, T.-D. (2013). NLRP6 in infection and inflammation. *Microbes and Infection* 15, 661-668.

Anand, P.K., Malireddi, R.K., Lukens, J.R., Vogel, P., Bertin, J., and Lamkanfi, M. (2012). NLRP6 negatively regulates innate immunity and host defence against bacterial pathogens. *Nature* 488.

Ara, T., Tokoyoda, K., Sugiyama, T., Egawa, T., Kawabata, K., and Nagasawa, T. Long-Term Hematopoietic Stem Cells Require Stromal Cell-Derived Factor-1 for Colonizing Bone Marrow during Ontogeny. *Immunity* 19, 257-267.

Arellano-Orden, E., Calero-Acuna, C., Moreno-Mata, N., Gomez-Izquierdo, L., Sanchez-Lopez, V., Lopez-Ramirez, C., Tobar, D., Lopez-Villalobos, J.L., Gutierrez, C., Blanco-Orozco, A., *et al.* (2016). Cigarette Smoke Decreases the Maturation of Lung Myeloid Dendritic Cells. *PLoS One* 11, e0152737.

Auerbuch, V., Brockstedt, D.G., Meyer-Morse, N., O'Riordan, M., and Portnoy, D.A. (2004). Mice Lacking the Type I Interferon Receptor Are Resistant to *Listeria monocytogenes*. *The Journal of Experimental Medicine* 200, 527-533.

Auffan, M., Rose, J., Bottero, J.Y., Lowry, G.V., Jolivet, J.P., and Wiesner, M.R. (2009). Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nat Nanotechnol* 4, 634-641.

- Baekkevold, E.S.**, Roussigne, M., Yamanaka, T., Johansen, F.E., Jahnsen, F.L., Amalric, F., Brandtzaeg, P., Erard, M., Haraldsen, G., and Girard, J.P. (2003). Molecular characterization of NF-HEV, a nuclear factor preferentially expressed in human high endothelial venules. *Am J Pathol* 163, 69-79.
- Balamayooran, G.**, Batra, S., Cai, S., Mei, J., Worthen, G.S., Penn, A.L., and Jeyaseelan, S. (2012). Role of CXCL5 in leukocyte recruitment to the lungs during secondhand smoke exposure. *Am J Respir Cell Mol Biol* 47, 104-111.
- Barnes, P.J.** (2013). New anti-inflammatory targets for chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Drug Discov* 12, 543-559.
- Barnes, P.J.** (2016). Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol* 138, 16-27.
- Baron, L.**, Gombault, A., Fanny, M., Villeret, B., Savigny, F., Guillou, N., Panek, C., Le Bert, M., Lagente, V., Rassendren, F., *et al.* (2015). The NLRP3 inflammasome is activated by nanoparticles through ATP, ADP and adenosine. *Cell Death Dis* 6, e1629.
- Bekisz, J.**, Baron, S., Balinsky, C., Morrow, A., and Zoon, K.C. (2010). Antiproliferative Properties of Type I and Type II Interferon. *Pharmaceuticals* 3, 994-1015.
- Bessa, J.**, Meyer, C.A., de Vera Mudry, M.C., Schlicht, S., Smith, S.H., Iglesias, A., and Cote-Sierra, J. (2014). Altered subcellular localization of IL-33 leads to non-resolving lethal inflammation. *J Autoimmun* 55, 33-41.
- Bhat, T.A.**, Panzica, L., Kalathil, S.G., and Thanavala, Y. (2015). Immune Dysfunction in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Annals of the American Thoracic Society* 12, S169-S175.
- Birchenough, G.M.**, Nystrom, E.E., Johansson, M.E., and Hansson, G.C. (2016). A sentinel goblet cell guards the colonic crypt by triggering Nlrp6-dependent Muc2 secretion. *Science* 352, 1535-1542.
- Black, R.A.**, Rauch, C.T., Kozlosky, C.J., Peschon, J.J., Slack, J.L., Wolfson, M.F., Castner, B.J., Stocking, K.L., Reddy, P., Srinivasan, S., *et al.* (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-[alpha] from cells. *Nature* 385, 729-733.
- Blackwell, T.S.**, Tager, A.M., Borok, Z., Moore, B.B., Schwartz, D.A., Anstrom, K.J., Bar-Joseph, Z., Bitterman, P., Blackburn, M.R., Bradford, W., *et al.* (2014). Future Directions in Idiopathic Pulmonary Fibrosis Research. An NHLBI Workshop Report. *Am J Respir Crit Care Med* 189, 214-222.
- Blasi, F.**, Aliberti, S., Pappalettera, M., and Tarsia, P. (2007). 100 years of respiratory medicine: Pneumonia. *Respiratory medicine* 101, 875-881.
- Blidberg, K.**, Palmberg, L., James, A., Billing, B., Henriksson, E., Lantz, A.-S., Larsson, K., and Dahlén, B. (2013). Adhesion molecules in subjects with COPD and healthy non-smokers: a cross sectional parallel group study. *Respiratory research* 14, 1-10.
- Botelho, F.M.**, Bauer, C.M., Finch, D., Nikota, J.K., Zavitz, C.C., Kelly, A., Lambert, K.N., Piper, S., Foster, M.L., Goldring, J.J., *et al.* (2011). IL-1alpha/IL-1R1 expression in chronic obstructive pulmonary disease and mechanistic relevance to smoke-induced neutrophilia in mice. *PLoS One* 6, e28457.
- Bourdenx, M.**, Daniel, J., Genin, E., Soria, F.N., Blanchard-Desce, M., Bezard, E., and Dehay, B. (2016). Nanoparticles restore lysosomal acidification defects: Implications for Parkinson and other lysosomal-related diseases. *Autophagy* 12, 472-483.

- Bracke, K.R.**, D'Hulst A, I., Maes, T., Moerloose, K.B., Demedts, I.K., Lebecque, S., Joos, G.F., and Brusselle, G.G. (2006). Cigarette smoke-induced pulmonary inflammation and emphysema are attenuated in CCR6-deficient mice. *J Immunol* 177, 4350-4359.
- Broderick, L.**, De Nardo, D., Franklin, B.S., Hoffman, H.M., and Latz, E. (2015). The inflammasomes and autoinflammatory syndromes. *Annu Rev Pathol* 10, 395-424.
- Bruchard, M.**, Rebe, C., Derangere, V., Togbe, D., Ryffel, B., Boidot, R., Humblin, E., Hamman, A., Chalmin, F., Berger, H., *et al.* (2015). The receptor NLRP3 is a transcriptional regulator of TH2 differentiation. *Nat Immunol* 16, 859-870.
- Brunner, S.M.**, Schiechl, G., Falk, W., Schlitt, H.J., Geissler, E.K., and Fichtner-Feigl, S. (2011). Interleukin-33 prolongs allograft survival during chronic cardiac rejection. *Transplant International* 24, 1027-1039.
- Caramori, G.**, Casolari, P., Barczyk, A., Durham, A.L., Di Stefano, A., and Adcock, I. (2016). COPD immunopathology. *Semin Immunopathol* 38, 497-515.
- Caramori, G.**, Casolari, P., Di Gregorio, C., Saetta, M., Baraldo, S., Boschetto, P., Ito, K., Fabbri, L.M., Barnes, P.J., Adcock, I.M., *et al.* (2009). MUC5AC expression is increased in bronchial submucosal glands of stable COPD patients. *Histopathology* 55, 321-331.
- Caramori, G.**, Romagnoli, M., Casolari, P., Bellettato, C., Casoni, G., Boschetto, P., Fan, C., Barnes, P., Adcock, I., Ciaccia, A., *et al.* (2003). Nuclear localisation of p65 in sputum macrophages but not in sputum neutrophils during COPD exacerbations. *Thorax* 58, 348-351.
- Carmi, Y.**, Dotan, S., Rider, P., Kaplanov, I., White, M.R., Baron, R., Abutbul, S., Huszar, M., Dinarello, C.A., Apte, R.N., *et al.* (2013). The role of IL-1 β in the early tumor cell-induced angiogenic response. *J Immunol* 190, 3500-3509.
- Carriere, V.**, Roussel, L., Ortega, N., Lacorre, D.A., Americh, L., Aguilar, L., Bouche, G., and Girard, J.P. (2007). IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 282-287.
- Carswell, E.A.**, Old, L.J., Kassel, R.L., Green, S., Fiore, N., and Williamson, B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72, 3666-3670.
- Cayrol, C.**, and Girard, J.P. (2009). The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 9021-9026.
- Cayrol, C.**, and Girard, J.P. (2014). IL-33: an alarmin cytokine with crucial roles in innate immunity, inflammation and allergy. *Curr Opin Immunol* 31, 31-37.
- CDC** (2015). Pneumococcal Disease Symptoms and complications. <http://www.cdc.gov/pneumococcal/about/symptoms-complications.html>.
- Chadwick, W.**, Magnus, T., Martin, B., Keselman, A., Mattson, M.P., and Maudsley, S. (2008). Targeting TNF- α receptors for neurotherapeutics. *Trends in Neurosciences* 31, 504-511.
- Chen, G.Y.** (2014). Role of Nlrp6 and Nlrp12 in the maintenance of intestinal homeostasis. *European journal of immunology* 44, 321-327.
- Chen, G.Y.**, Liu, M., Wang, F., Bertin, J., and Nunez, G. (2011). A functional role for Nlrp6 in intestinal inflammation and tumorigenesis. *J Immunol* 186, 7187-7194.

- Chen, L.**, Chen, G., Zhang, M.-Q., Xiong, X.-Z., Liu, H.-J., Xin, J.-B., Zhang, J.-C., Wu, J.-H., Meng, Z.-J., and Sun, S.-W. (2016). Imbalance between subsets of CD8(+) peripheral blood T cells in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *PeerJ* 4, e2301.
- Chen, S.C.**, Mehrad, B., Deng, J.C., Vassileva, G., Manfra, D.J., Cook, D.N., Wiekowski, M.T., Zlotnik, A., Standiford, T.J., and Lira, S.A. (2001). Impaired pulmonary host defense in mice lacking expression of the CXC chemokine lungkine. *J Immunol* 166, 3362-3368.
- Chen, Y.**, and Junger, W.G. (2012). Measurement of Oxidative Burst in Neutrophils. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ) 844, 115-124.
- Cohen, E.S.**, Scott, I.C., Majithiya, J.B., Rapley, L., Kemp, B.P., England, E., Rees, D.G., Overed-Sayer, C.L., Woods, J., Bond, N.J., *et al.* (2015). Oxidation of the alarmin IL-33 regulates ST2-dependent inflammation. *Nat Commun* 6, 8327.
- Cook, P.C.**, and MacDonald, A.S. (2016). Dendritic cells in lung immunopathology. *Seminars in Immunopathology* 38, 449-460.
- Correa, Ricardo G.**, Milutinovic, S., and Reed, John C. (2012). Roles of NOD1 (NLRC1) and NOD2 (NLRC2) in innate immunity and inflammatory diseases. *Bioscience Reports* 32, 597-608.
- Cosio, B.G.**, Soriano, J.B., López-Campos, J.L., Calle-Rubio, M., Soler-Cataluna, J.J., de-Torres, J.P., Marín, J.M., Martínez-Gonzalez, C., de Lucas, P., Mir, I., *et al.* (2016). Defining the Asthma-COPD Overlap Syndrome in a COPD Cohort. *Chest* 149, 45-52.
- Cosio, M.G.**, Sassetta, M., and Agustí, A. (2009). Immunologic Aspects of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *New England Journal of Medicine* 360, 2445-2454.
- Couillin, I.**, Vasseur, V., Charron, S., Gasse, P., Tavernier, M., Guillet, J., Lagente, V., Fick, L., Jacobs, M., Coelho, F.R., *et al.* (2009). IL-1R1/MyD88 signaling is critical for elastase-induced lung inflammation and emphysema. *J Immunol* 183, 8195-8202.
- Crystal, R.G.**, Bitterman, P.B., Mossman, B., Schwarz, M.I., Sheppard, D., Almasry, L., Chapman, H.A., Friedman, S.L., King, T.E., Jr., Leinwand, L.A., *et al.* (2002). Future research directions in idiopathic pulmonary fibrosis: summary of a National Heart, Lung, and Blood Institute working group. *Am J Respir Crit Care Med* 166, 236-246.
- D'Osualdo, A.**, Anania, V.G., Yu, K., Lill, J.R., Kaufman, R.J., Matsuzawa, S.-i., and Reed, J.C. (2015). Transcription Factor ATF4 Induces NLRP1 Inflammasome Expression during Endoplasmic Reticulum Stress. *PLoS ONE* 10, e0130635.
- Dan, G.**, Guoxin, X., and Jianbin, L. (2014). Mechanical properties of nanoparticles: basics and applications. *Journal of Physics D: Applied Physics* 47, 013001.
- Desai, T.J.**, Brownfield, D.G., and Krasnow, M.A. (2014). Alveolar progenitor and stem cells in lung development, renewal and cancer. *Nature* 507, 190-194.
- Devi, S.**, Wang, Y., Chew, W.K., Lima, R., A-González, N., Mattar, C.N.Z., Chong, S.Z., Schlitzer, A., Bakocevic, N., Chew, S., *et al.* (2013). Neutrophil mobilization via plerixafor-mediated CXCR4 inhibition arises from lung demargination and blockade of neutrophil homing to the bone marrow. *The Journal of Experimental Medicine* 210, 2321-2336.
- Di Comite, G.**, Grazia Sabbadini, M., Corti, A., Rovere-Querini, P., and Manfredi, A.A. (2007). Conversation galante: How the immune and the neuroendocrine systems talk to each other. *Autoimmunity Reviews* 7, 23-29.

Di Stefano, A., Caramori, G., Barczyk, A., Vicari, C., Brun, P., Zanini, A., Cappello, F., Garofano, E., Padovani, A., Contoli, M., *et al.* (2014a). Innate immunity but not NLRP3 inflammasome activation correlates with severity of stable COPD. *Thorax* 69, 516-524.

Di Stefano, A., Caramori, G., Barczyk, A., Vicari, C., Brun, P., Zanini, A., Cappello, F., Garofano, E., Padovani, A., Contoli, M., *et al.* (2014b). Innate immunity but not NLRP3 inflammasome activation correlates with severity of stable COPD. *Thorax* 69, 516-524.

Di Stefano, A., Caramori, G., Gnemmi, I., Contoli, M., Vicari, C., Capelli, A., Magno, F., D'Anna, S.E., Zanini, A., Brun, P., *et al.* (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, 316-324.

Doz, E., Noulin, N., Boichot, E., Guenon, I., Fick, L., Le Bert, M., Lagente, V., Ryffel, B., Schnyder, B., Quesniaux, V.F., *et al.* (2008). Cigarette smoke-induced pulmonary inflammation is TLR4/MyD88 and IL-1R1/MyD88 signaling dependent. *J Immunol* 180, 1169-1178.

Droemann, D., Goldmann, T., Tiedje, T., Zabel, P., Dalhoff, K., and Schaaf, B. (2005). Toll-like receptor 2 expression is decreased on alveolar macrophages in cigarette smokers and COPD patients. *Respiratory research* 6, 68-68.

Dupaul-Chicoine, J., Arabzadeh, A., Dagenais, M., Douglas, T., Champagne, C., Morizot, A., Rodrigue-Gervais, Ian G., Breton, V., Colpitts, Sara L., Beauchemin, N., *et al.* The Nlrp3 Inflammasome Suppresses Colorectal Cancer Metastatic Growth in the Liver by Promoting Natural Killer Cell Tumoricidal Activity. *Immunity* 43, 751-763.

Dupin, I., Allard, B., Ozier, A., Maurat, E., Ousova, O., Delbrel, E., Trian, T., Bui, H.-N., Dromer, C., Guisset, O., *et al.* Blood fibrocytes are recruited during acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease through a CXCR4-dependent pathway. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 137, 1036-1042.e1037.

Dussurget, O., Bierne, H., and Cossart, P. (2014). The bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* and the interferon family: type I, type II and type III interferons. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 4, 50.

Egger, C., Cannet, C., Gérard, C., Jarman, E., Jarai, G., Feige, A., Suply, T., Micard, A., Dunbar, A., Tigani, B., *et al.* (2013). Administration of Bleomycin via the Oropharyngeal Aspiration Route Leads to Sustained Lung Fibrosis in Mice and Rats as Quantified by UTE-MRI and Histology. *PLoS ONE* 8, e63432.

Ehlich, A., Martin, V., Muller, W., and Rajewsky, K. (1994). Analysis of the B-cell progenitor compartment at the level of single cells. *Curr Biol* 4, 573-583.

Elinav, E., Strowig, T., Henao-Mejia, J., and Flavell, R.A. (2011a). Regulation of the antimicrobial response by NLR proteins. *Immunity* 34, 665-679.

Elinav, E., Strowig, T., Kau, A.L., Henao-Mejia, J., Thaiss, C.A., Booth, C.J., Peaper, D.R., Bertin, J., Eisenbarth, S.C., Gordon, J.I., *et al.* (2011b). NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. *Cell* 145, 745-757.

Eltom, S., Belvisi, M.G., Stevenson, C.S., Maher, S.A., Dubuis, E., Fitzgerald, K.A., and Birrell, M.A. (2014). Role of the inflammasome-caspase1/11-IL-1/18 axis in cigarette smoke driven airway inflammation: an insight into the pathogenesis of COPD. *PLoS One* 9, e112829.

Eltom, S., Stevenson, C.S., Rastrick, J., Dale, N., Raemdonck, K., Wong, S., Catley, M.C., Belvisi, M.G., and Birrell, M.A. (2011). P2X7 receptor and caspase 1 activation are central to airway inflammation observed after exposure to tobacco smoke. *PLoS One* 6, e24097.

ExPASy, and **ViralZone** Virus endocytosis by host.
http://viralzoneexpasyorg/all_by_protein/977html.

Faner, R., Cruz, T., Casserras, T., López-Giraldo, A., Noell, G., Coca, I., Tal-Singer, R., Miller, B., Rodriguez-Roisin, R., Spira, A., *et al.* (2016). Network Analysis of Lung Transcriptomics Reveals a Distinct B-Cell Signature in Emphysema. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 193, 1242-1253.

Fiedler, K., and Brunner, C. (2012). Mechanisms controlling hematopoiesis, hematology science and practice, Dr Lawrie. In Tech.

Fink, S.L., Bergsbaken, T., and Cookson, B.T. (2008). Anthrax lethal toxin and Salmonella elicit the common cell death pathway of caspase-1-dependent pyroptosis via distinct mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 4312-4317.

Food and Agriculture Organisation, F. (2010). International conference on food and agriculture applications of Nanotechnologies.
http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/pdf/nanoagri_2010pdf.

Food and Agriculture Organisation, F., and World Health Organisation, W. (2010). The application of nanotechnologies in the food and agriculture sectors : potential food safety implications. <http://www.fao.org/docrep/012/i1434e/i1434e00pdf>.

Foronjy, R.F., Salathe, M.A., Dabo, A.J., Baumlin, N., Cummins, N., Eden, E., and Geraghty, P. (2016). TLR9 expression is required for the development of cigarette smoke-induced emphysema in mice. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 311, L154.

Francois, A., Gombault, A., Villeret, B., Alsaleh, G., Fanny, M., Gasse, P., Adam, S.M., Crestani, B., Sibilia, J., Schneider, P., *et al.* (2015). B cell activating factor is central to bleomycin- and IL-17-mediated experimental pulmonary fibrosis. *J Autoimmun* 56, 1-11.

Franklin, B.S., Bossaller, L., De Nardo, D., Ratter, J.M., Stutz, A., Engels, G., Brenker, C., Nordhoff, M., Mirandola, S.R., Al-Amoudi, A., *et al.* (2014). The adaptor ASC has extracellular and 'prionoid' activities that propagate inflammation. *Nat Immunol* 15, 727-737.

Fullerton, C., and Shane, S. (1946). the treatment of acute and chronic pulmonary disease with penicillin aerosol. *Canadian Medical Association Journal*, 535-539.

Gadgil, A., and Duncan, S.R. (2008). Role of T-lymphocytes and pro-inflammatory mediators in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease* 3, 531-541.

Galli, S.J., and Tsai, M. (2012). IgE and mast cells in allergic disease. *Nat Med* 18, 693-704.

Galli, S.J., Tsai, M., and Piliponsky, A.M. (2008). The development of allergic inflammation. *Nature* 454, 445-454.

Garlanda, C., Dinarello, C.A., and Mantovani, A. (2013). The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity* 39, 1003-1018.

Gasse, P., Mary, C., Guenon, I., Noulin, N., Charron, S., Schnyder-Candrian, S., Schnyder, B., Akira, S., Quesniaux, V.F., Lagente, V., *et al.* (2007). IL-1R1/MyD88 signaling and the inflammasome are essential in pulmonary inflammation and fibrosis in mice. *J Clin Invest* 117, 3786-3799.

Gasse, P., Riteau, N., Charron, S., Girre, S., Fick, L., Petrilli, V., Tschopp, J., Lagente, V., Quesniaux, V.F., Ryffel, B., *et al.* (2009). Uric acid is a danger signal activating NALP3 inflammasome in lung injury inflammation and fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 179, 903-913.

Gasse, P., Riteau, N., Vacher, R., Michel, M.L., Fautrel, A., di Padova, F., Fick, L., Charron, S., Lagente, V., Eberl, G., *et al.* (2011). IL-1 and IL-23 mediate early IL-17A production in pulmonary inflammation leading to late fibrosis. *PLoS One* 6, e23185.

Geddes, K., Magalhaes, J.G., and Girardin, S.E. (2009). Unleashing the therapeutic potential of NOD-like receptors. *Nat Rev Drug Discov* 8, 465-479.

Global initiative for chronic obstructive lung disease (2016). Global strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease updates 2016. <http://goldcopd.org>.

Go, H., Koh, J., Kim, H.S., Jeon, Y.K., and Chung, D.H. Expression of toll-like receptor 2 and 4 is increased in the respiratory epithelial cells of chronic idiopathic interstitial pneumonia patients. *Respiratory medicine* 108, 783-792.

Gregory, A.E., Titball, R., and Williamson, D. (2013). Vaccine delivery using nanoparticles. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 3, 13.

Grenier, J.M., Wang, L., Manji, G.A., Huang, W.J., Al-Garawi, A., Kelly, R., Carlson, A., Merriam, S., Lora, J.M., Briskin, M., *et al.* (2002). Functional screening of five PYPAF family members identifies PYPAF5 as a novel regulator of NF-kappaB and caspase-1. *FEBS Lett* 530, 73-78.

Griffith, J.W., Sokol, C.L., and Luster, A.D. (2014). Chemokines and Chemokine Receptors: Positioning Cells for Host Defense and Immunity. *Annual Review of Immunology* 32, 659-702.

Grumelli, S., Corry, D.B., Song, L.-Z., Song, L., Green, L., Huh, J., Hacken, J., Espada, R., Bag, R., Lewis, D.E., *et al.* (2004). An Immune Basis for Lung Parenchymal Destruction in Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Emphysema. *PLoS Medicine* 1, e8.

Guo, H., Callaway, J.B., and Ting, J.P.Y. (2015). Inflammasomes: Mechanism of Action, Role in Disease, and Therapeutics. *Nature medicine* 21, 677-687.

Halle, A., Hornung, V., Petzold, G.C., Stewart, C.R., Monks, B.G., Reinheckel, T., Fitzgerald, K.A., Latz, E., Moore, K.J., and Golenbock, D.T. (2008). The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid- β . *Nature immunology* 9, 857-865.

Hamming, O.J., Terczyńska-Dyla, E., Vieyres, G., Dijkman, R., Jørgensen, S.E., Akhtar, H., Siupka, P., Pietschmann, T., Thiel, V., and Hartmann, R. (2013). Interferon lambda 4 signals via the IFN λ receptor to regulate antiviral activity against HCV and coronaviruses. *The EMBO Journal* 32, 3055-3065.

Hardman, C.S., Panova, V., and McKenzie, A.N. (2013). IL-33 citrine reporter mice reveal the temporal and spatial expression of IL-33 during allergic lung inflammation. *Eur J Immunol* 43, 488-498.

Hardy, G.A.D., Sieg, S., Rodriguez, B., Anthony, D., Asaad, R., Jiang, W., Mudd, J., Schacker, T., Funderburg, N.T., Pilch-Cooper, H.A., *et al.* (2013). Interferon- α Is the Primary Plasma Type-I IFN in HIV-1 Infection and Correlates with Immune Activation and Disease Markers. *PLoS ONE* 8, e56527.

Hayakawa, H., Hayakawa, M., Kume, A., and Tominaga, S. (2007). Soluble ST2 blocks interleukin-33 signaling in allergic airway inflammation. *J Biol Chem* 282, 26369-26380.

- Hehlhans, T.**, and Pfeffer, K. (2005). The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 115, 1-20.
- Hess, A.**, Axmann, R., Rech, J., Finzel, S., Heindl, C., Kreitz, S., Sergeeva, M., Saake, M., Garcia, M., Kollias, G., *et al.* (2011). Blockade of TNF- α rapidly inhibits pain responses in the central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 3731-3736.
- Heusser, S.**, and Dupuy, H.G. (2008). *Atlas de biologie animale*. DUNOD 2.
- Hilzendeger, C.**, da Silva, J., Henket, M., Schleich, F., Corhay, J.L., Kebabze, T., Edwards, M.R., Mallia, P., Johnston, S.L., and Louis, R. (2016). Reduced sputum expression of interferon-stimulated genes in severe COPD. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease* 11, 1485-1494.
- Hogan, S.P.**, Rosenberg, H.F., Moqbel, R., Phipps, S., Foster, P.S., Lacy, P., Kay, A.B., and Rothenberg, M.E. (2008). Eosinophils: Biological Properties and Role in Health and Disease. *Clinical & Experimental Allergy* 38, 709-750.
- Hogg, J.C.** (2006). Why does airway inflammation persist after the smoking stops? *Thorax* 61, 96-97.
- Hogg, J.C.**, Chu, F., Utokaparch, S., Woods, R., Elliott, W.M., Buzatu, L., Cherniack, R.M., Rogers, R.M., Sciurba, F.C., Coxson, H.O., *et al.* (2004). The Nature of Small-Airway Obstruction in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *New England Journal of Medicine* 350, 2645-2653.
- Holgate, S.T.** (2012). Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nat Med* 18, 673-683.
- Hollins, F.**, Sutcliffe, A., Gomez, E., Berair, R., Russell, R., Szyndralewicz, C., Saunders, R., and Brightling, C. (2016). Airway smooth muscle NOX4 is upregulated and modulates ROS generation in COPD. *Respiratory research* 17, 84.
- Holtzman, M.J.**, Byers, D.E., Alexander-Brett, J., and Wang, X. (2014). The role of airway epithelial cells and innate immune cells in chronic respiratory disease. *Nat Rev Immunol* 14, 686-698.
- Hovenberg, H.W.**, Davies, J.R., and Carlstedt, I. (1996). Different mucins are produced by the surface epithelium and the submucosa in human trachea: identification of MUC5AC as a major mucin from the goblet cells. *Biochemical Journal* 318, 319-324.
- Hussell, T.**, and Bell, T.J. (2014). Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. *Nat Rev Immunol* 14, 81-93.
- Idzko, M.**, Hammad, H., van Nimwegen, M., Kool, M., Willart, M.A., Muskens, F., Hoogsteden, H.C., Luttmann, W., Ferrari, D., Di Virgilio, F., *et al.* (2007). Extracellular ATP triggers and maintains asthmatic airway inflammation by activating dendritic cells. *Nat Med* 13, 913-919.
- Janeway, C.A.**, Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M. (2001). *Immunobiology*.
- Jetten, A.M.** (2009). Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical roles in development, immunity, circadian rhythm, and cellular metabolism. *Nuclear Receptor Signaling* 7.
- Jeyaseelan, S.**, Manzer, R., Young, S.K., Yamamoto, M., Akira, S., Mason, R.J., and Worthen, G.S. (2005). Induction of CXCL5 during inflammation in the rodent lung involves activation of alveolar epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 32, 531-539.
- Jiang, Z.**, and Zhu, L. (2016). Update on molecular mechanisms of corticosteroid resistance in chronic obstructive pulmonary disease. *Pulm Pharmacol Ther* 37, 1-8.

- Johnson, G.** (1874). Clinical Lecture on the Relation between Laryngeal and Pulmonary Disease. *British Medical Journal* 1, 102-103.
- Kakkar, R.,** Hei, H., Dobner, S., and Lee, R.T. (2012). Interleukin 33 as a mechanically responsive cytokine secreted by living cells. *J Biol Chem* 287, 6941-6948.
- Kakkar, R.,** and Lee, R.T. (2008). The IL-33/ST2 pathway: therapeutic target and novel biomarker. *Nat Rev Drug Discov* 7, 827-840.
- Kalathil, S.G.,** Lugade, A.A., Pradhan, V., Miller, A., Parameswaran, G.I., Sethi, S., and Thanavala, Y. (2014). T-Regulatory Cells and Programmed Death 1(+) T Cells Contribute to Effector T-Cell Dysfunction in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 190, 40-50.
- Kalliolias, G.D.,** and Ivashkiv, L.B. (2016). TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nature reviews Rheumatology* 12, 49-62.
- Kamikawaji, K.,** Seki, N., Watanabe, M., Mataka, H., Kumamoto, T., Takagi, K., Mizuno, K., and Inoue, H. (2016). Regulation of LOXL2 and SERPINH1 by antitumor microRNA-29a in lung cancer with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Hum Genet*.
- Karampitsakos, T.,** Woolard, T., Bouros, D., and Tzouveleakis, A. Toll-like receptors in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *European Journal of Pharmacology*.
- Keeton, R.,** Allie, N., Dambuza, I., Abel, B., Hsu, N.-J., Sebesho, B., Randall, P., Burger, P., Fick, E., Quesniaux, V.F.J., *et al.* (2014). Soluble TNFRp75 regulates host protective immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Clinical Investigation* 124, 1537-1551.
- Ken, R.B.,** Ingel, K.D., Guy, F.J., and Guy, G.B. (2007). CC-Chemokine Receptors in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Inflammation & Allergy-Drug Targets (Discontinued)* 6, 75-79.
- Kenneth Murphy** (8th edition). *Janeway's immuno biology*.
- Kew, K.M.,** and Seniukovich, A. (2014). Inhaled steroids and risk of pneumonia for chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*.
- Kim, I.-Y.,** Joachim, E., Choi, H., and Kim, K. (2015). Toxicity of silica nanoparticles depends on size, dose, and cell type. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 11, 1407-1416.
- King, T.E., Jr.,** Pardo, A., and Selman, M. (2011). Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet* 378, 1949-1961.
- Kirkham, P.A.,** Caramori, G., Casolari, P., Papi, A.A., Edwards, M., Shamji, B., Triantaphyllopoulos, K., Hussain, F., Pinart, M., Khan, Y., *et al.* (2011). Oxidative Stress-induced Antibodies to Carbonyl-modified Protein Correlate with Severity of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 184, 796-802.
- Kirkham, S.,** Sheehan, J.K., Knight, D., Richardson, P.S., and Thornton, D.J. (2002). Heterogeneity of airways mucus: variations in the amounts and glycoforms of the major oligomeric mucins MUC5AC and MUC5B. *Biochemical Journal* 361, 537-546.
- Kolaczowska, E.,** and Kubes, P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* 13, 159-175.
- Kool, M.,** Willart, Monique A.M., van Nimwegen, M., Bergen, I., Pouliot, P., Virchow, J.C., Rogers, N., Osorio, F., Reis e Sousa, C., Hammad, H., *et al.* (2011). An Unexpected Role for Uric Acid as an Inducer of T Helper 2 Cell Immunity to Inhaled Antigens and Inflammatory Mediator of Allergic Asthma. *Immunity* 34, 527-540.

Korkmaz, B., Horwitz, M.S., Jenne, D.E., and Gauthier, F. (2010). Neutrophil Elastase, Proteinase 3, and Cathepsin G as Therapeutic Targets in Human Diseases. *Pharmacological Reviews* 62, 726-759.

Kotenko, S.V. (2011). IFN- λ s. *Current opinion in immunology* 23, 583-590.

Kotenko, S.V., Gallagher, G., Baurin, V.V., Lewis-Antes, A., Shen, M., Shah, N.K., Langer, J.A., Sheikh, F., Dickensheets, H., and Donnelly, R.P. (2003). IFN- λ s mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol* 4, 69-77.

Kotton, D.N., and Morrissey, E.E. (2014). Lung regeneration: mechanisms, applications and emerging stem cell populations. *Nat Med* 20, 822-832.

Kruger, P., Saffarzadeh, M., Weber, A.N.R., Rieber, N., Radsak, M., von Bernuth, H., Benarafa, C., Roos, D., Skokowa, J., and Hartl, D. (2015). Neutrophils: Between Host Defence, Immune Modulation, and Tissue Injury. *PLoS Pathogens* 11, e1004651.

Kuchler, A.M., Pollheimer, J., Balogh, J., Sponheim, J., Manley, L., Sorensen, D.R., De Angelis, P.M., Scott, H., and Haraldsen, G. (2008). Nuclear interleukin-33 is generally expressed in resting endothelium but rapidly lost upon angiogenic or proinflammatory activation. *Am J Pathol* 173, 1229-1242.

Kuhn, D.A., Vanhecke, D., Michen, B., Blank, F., Gehr, P., Petri-Fink, A., and Rothen-Rutishauser, B. (2014). Different endocytotic uptake mechanisms for nanoparticles in epithelial cells and macrophages. *Beilstein Journal of Nanotechnology* 5, 1625-1636.

Kurowska-Stolarska, M., Stolarski, B., Kewin, P., Murphy, G., Corrigan, C.J., Ying, S., Pitman, N., Mirchandani, A., Rana, B., van Rooijen, N., *et al.* (2009). IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. *J Immunol* 183, 6469-6477.

La Fondation du Souffle, F. (2014). Fibrose pulmonaire idiopathique. <http://www.lesouffle.org/blog/maladie/fibrose-pulmonaire-idiopathique/>.

Lambrecht, B.N., and Hammad, H. (2014). Allergens and the airway epithelium response: Gateway to allergic sensitization. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 134, 499-507.

Lamkanfi, M., and Dixit, V.M. (2012). Inflammasomes and their roles in health and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 28, 137-161.

Le Goffic, R., Arshad, M.I., Rauch, M., L'Helgoualc'h, A., Delmas, B., Piquet-Pellorce, C., and Samson, M. (2011). Infection with Influenza Virus Induces IL-33 in Murine Lungs. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 45, 1125-1132.

Le, H., Kim, W., Kim, J., Cho, H., and Kwon, B. (2013). Interleukin-33: A Mediator of Inflammation Targeting Hematopoietic Stem and Progenitor Cells and Their Progenies. *Frontiers in Immunology* 4.

Lee, H.-M., Kim, J.-J., Kim, H.J., Shong, M., Ku, B.J., and Jo, E.-K. (2013). Upregulated NLRP3 Inflammasome Activation in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes* 62, 194-204.

Lee, W.L., Harrison, R.E., and Grinstein, S. (2003). Phagocytosis by neutrophils. *Microbes and Infection* 5, 1299-1306.

Lefrancais, E., and Cayrol, C. (2012). Mechanisms of IL-33 processing and secretion: differences and similarities between IL-1 family members. *Eur Cytokine Netw* 23, 120-127.

Lefrancais, E., Duval, A., Mirey, E., Roga, S., Espinosa, E., Cayrol, C., and Girard, J.P. (2014). Central domain of IL-33 is cleaved by mast cell proteases for potent activation of group-2 innate lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *111*, 15502-15507.

Lefrancais, E., Roga, S., Gautier, V., Gonzalez-de-Peredo, A., Monsarrat, B., Girard, J.P., and Cayrol, C. (2012). IL-33 is processed into mature bioactive forms by neutrophil elastase and cathepsin G. *Proc Natl Acad Sci U S A* *109*, 1673-1678.

Leliefeld, P.H.C., Koenderman, L., and Pillay, J. (2015). How Neutrophils Shape Adaptive Immune Responses. *Frontiers in Immunology* *6*, 471.

Levy, D.E., Marié, I.J., and Durbin, J.E. (2011). Induction and Function of Type I and III Interferon in Response to Viral Infection. *Current opinion in virology* *1*, 476-486.

Levy, M., Thaiss, C.A., Zeevi, D., Dohnalova, L., Zilberman-Schapira, G., Mahdi, J.A., David, E., Savidor, A., Korem, T., Herzig, Y., *et al.* (2015). Microbiota-Modulated Metabolites Shape the Intestinal Microenvironment by Regulating NLRP6 Inflammasome Signaling. *Cell* *163*, 1428-1443.

Li, D., Guabiraba, R., Besnard, A.-G., Komai-Koma, M., Jabir, M.S., Zhang, L., Graham, G.J., Kurowska-Stolarska, M., Liew, F.Y., McSharry, C., *et al.* (2014a). IL-33 promotes ST2-dependent lung fibrosis by the induction of alternatively activated macrophages and innate lymphoid cells in mice. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* *134*, 1422-1432.e1411.

Li, D., Guabiraba, R., Besnard, A.G., Komai-Koma, M., Jabir, M.S., Zhang, L., Graham, G.J., Kurowska-Stolarska, M., Liew, F.Y., McSharry, C., *et al.* (2014b). IL-33 promotes ST2-dependent lung fibrosis by the induction of alternatively activated macrophages and innate lymphoid cells in mice. *J Allergy Clin Immunol* *134*, 1422-1432 e1411.

Licona-Limon, P., Kim, L.K., Palm, N.W., and Flavell, R.A. (2013). TH2, allergy and group 2 innate lymphoid cells. *Nat Immunol* *14*, 536-542.

Lighty, J.S., Veranth, J.M., and Sarofim, A.F. (2000). Combustion Aerosols: Factors Governing Their Size and Composition and Implications to Human Health. *Journal of the Air & Waste Management Association* *50*, 1565-1618.

Liu, C., Yue, R., Yang, Y., Cui, Y., Yang, L., Zhao, D., and Zhou, X. (2016). AIM2 inhibits autophagy and IFN- β production during *M. bovis* infection. *Oncotarget*; Vol 7, No 30.

Liu, Y.-J., Kanzler, H., Soumelis, V., and Gilliet, M. (2001). Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nat Immunol* *2*, 585-589.

Liu, Y., Mei, J., Gonzales, L., Yang, G., Dai, N., Wang, P., Zhang, P., Favara, M., Malcolm, K.C., Guttentag, S., *et al.* (2011). IL-17A and TNF-alpha exert synergistic effects on expression of CXCL5 by alveolar type II cells in vivo and in vitro. *J Immunol* *186*, 3197-3205.

Lommatzsch, M., Bratke, K., Knappe, T., Bier, A., Dreschler, K., Kuepper, M., Stoll, P., Julius, P., and Virchow, J.C. (2010). Acute effects of tobacco smoke on human airway dendritic cells in vivo. *Eur Respir J* *35*, 1130-1136.

Love, P.E., and Bhandoola, A. (2011). Signal integration and cross-talk during thymocyte migration and emigration. *Nature reviews Immunology* *11*, 469-477.

Lucas, S., Ghilardi, N., Li, J., and de Sauvage, F.J. (2003). IL-27 regulates IL-12 responsiveness of naïve CD4⁺ T cells through Stat1-dependent and -independent mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *100*, 15047-15052.

Lukens, M.V., van de Pol, A.C., Coenjaerts, F.E.J., Jansen, N.J.G., Kamp, V.M., Kimpen, J.L.L., Rossen, J.W.A., Ulfman, L.H., Tacke, C.E.A., Viveen, M.C., *et al.* (2010). A Systemic Neutrophil

Response Precedes Robust CD8(+) T-Cell Activation during Natural Respiratory Syncytial Virus Infection in Infants. *Journal of Virology* 84, 2374-2383.

Luthi, A.U., Cullen, S.P., McNeela, E.A., Duriez, P.J., Afonina, I.S., Sheridan, C., Brumatti, G., Taylor, R.C., Kersse, K., and Vandenabeele, P. (2009a). Suppression of interleukin-33 bioactivity through proteolysis by apoptotic caspases. *Immunity* 31.

Luthi, A.U., Cullen, S.P., McNeela, E.A., Duriez, P.J., Afonina, I.S., Sheridan, C., Brumatti, G., Taylor, R.C., Kersse, K., Vandenabeele, P., *et al.* (2009b). Suppression of interleukin-33 bioactivity through proteolysis by apoptotic caspases. *Immunity* 31, 84-98.

Luzina, I.G., Pickering, E.M., Kopach, P., Kang, P.H., Lockatell, V., Todd, N.W., Papadimitriou, J.C., McKenzie, A.N., and Atamas, S.P. (2012). Full-length IL-33 promotes inflammation but not Th2 response in vivo in an ST2-independent fashion. *J Immunol* 189, 403-410.

Mammette, A. (2002). *Virologie médicale*. Collection azay.

Marcet, W. (1880). On the Influence of Altitude with Reference to the Treatment of Pulmonary Disease. *British Medical Journal* 2, 539-541.

Martin, C., Burdon, P.C.E., Bridger, G., Gutierrez-Ramos, J.-C., Williams, T.J., and Rankin, S.M. (2003). Chemokines Acting via CXCR2 and CXCR4 Control the Release of Neutrophils from the Bone Marrow and Their Return following Senescence. *Immunity* 19, 583-593.

Martin, N.T., and Martin, M.U. (2016a). Interleukin 33 is a guardian of barriers and a local alarmin. *Nat Immunol* 17, 122-131.

Martin, N.T., and Martin, M.U. (2016b). Interleukin 33 is a guardian of barriers and a local alarmin. *Nat Immunol* 17, 122-131.

Martinez, F.O., and Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Reports* 6, 13.

Martinon, F., Burns, K., and Tschopp, J. (2002). The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell* 10, 417-426.

Martinon, F., and Glimcher, L.H. (2006). Gout: new insights into an old disease. *J Clin Invest* 116, 2073-2075.

Martinon, F., Petrilli, V., Mayor, A., Tardivel, A., and Tschopp, J. (2006). Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 440, 237-241.

Mato, N., Fujii, M., Hakamata, Y., Kobayashi, E., Sato, A., Hayakawa, M., Ohto-Ozaki, H., Bando, M., Ohno, S., Tominaga, S., *et al.* (2009). Interleukin-1 receptor-related protein ST2 suppresses the initial stage of bleomycin-induced lung injury. *Eur Respir J* 33, 1415-1428.

Matta, B.M., Lott, J.M., Mathews, L.R., Liu, Q., Rosborough, B.R., Blazar, B.R., and Turnquist, H.R. (2014). IL-33 is an unconventional Alarmin that stimulates IL-2 secretion by dendritic cells to selectively expand IL-33R/ST2+ regulatory T cells. *J Immunol* 193, 4010-4020.

Mayadas, T.N., Cullere, X., and Lowell, C.A. (2014). The Multifaceted Functions of Neutrophils. *Annual review of pathology* 9, 181-218.

Mei, J., Liu, Y., Dai, N., Favara, M., Greene, T., Jeyaseelan, S., Poncz, M., Lee, J.S., and Worthen, G.S. (2010). CXCL5 regulates chemokine scavenging and pulmonary host defense to bacterial infection. *Immunity* 33, 106-117.

Meixenberger, K., Pache, F., Eitel, J., Schmeck, B., Hippenstiel, S., Slevogt, H., N'Guessan, P., Witzentrath, M., Netea, M.G., Chakraborty, T., *et al.* (2010). *Listeria monocytogenes*-Infected Human Peripheral Blood Mononuclear Cells Produce IL-1 β , Depending on Listeriolysin O and NLRP3. *The Journal of Immunology* **184**, 922-930.

Miller, A.M. (2011). Role of IL-33 in inflammation and disease. *Journal of Inflammation* **8**, 1-12.

Milovanovic, M., Volarevic, V., Ljubic, B., Radosavljevic, G., Jovanovic, I., Arsenijevic, N., and Lukic, M.L. (2012). Deletion of IL-33R (ST2) Abrogates Resistance to EAE in BALB/C Mice by Enhancing Polarization of APC to Inflammatory Phenotype. *PLoS One* **7**, e45225.

Minkiewicz, J., de Rivero Vaccari, J.P., and Keane, R.W. (2013). Human astrocytes express a novel NLRP2 inflammasome. *Glia* **61**, 1113-1121.

Mishra, A., Hogan, S.P., Lee, J.J., Foster, P.S., and Rothenberg, M.E. (1999). Fundamental signals that regulate eosinophil homing to the gastrointestinal tract. *Journal of Clinical Investigation* **103**, 1719-1727.

Monticelli, L.A., Sonnenberg, G.F., Abt, M.C., Alenghat, T., Ziegler, C.G.K., Doering, T.A., Angelosanto, J.M., Laidlaw, B.J., Yang, C.Y., Sathaliyawala, T., *et al.* (2011). Innate lymphoid cells promote lung tissue homeostasis following acute influenza virus infection. *Nature immunology* **12**, 1045-1054.

Mordstein, M., Kochs, G., Dumoutier, L., Renaud, J.C., Paludan, S.R., Klucher, K., and Staeheli, P. (2008). Interferon-lambda contributes to innate immunity of mice against influenza A virus but not against hepatotropic viruses. *PLoS Pathog* **4**, e1000151.

Mosser, D.M., and Edwards, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews Immunology* **8**, 958-969.

Moussion, C., Ortega, N., and Girard, J.P. (2008). The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel 'alarmin'? *PLoS One* **3**, e3331.

Murphy, Andrew J., Kraakman, Michael J., Kammoun, Helene L., Dragoljevic, D., Lee, Man K.S., Lawlor, Kate E., Wentworth, John M., Vasanthakumar, A., Gerlic, M., Whitehead, Lachlan W., *et al.* IL-18 Production from the NLRP1 Inflammasome Prevents Obesity and Metabolic Syndrome. *Cell Metabolism* **23**, 155-164.

Murray, J.F. (2010). The structure and function of the lung. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* **14**, 391-396.

Nabeshi, H., Yoshikawa, T., Matsuyama, K., Nakazato, Y., Tochigi, S., Kondoh, S., Hirai, T., Akase, T., Nagano, K., Abe, Y., *et al.* (2011). Amorphous nanosilica induce endocytosis-dependent ROS generation and DNA damage in human keratinocytes. *Particle and Fibre Toxicology* **8**, 1-10.

National Nanotechnology Initiative What's so special about the nanoscale ?
<http://www.nanogov/nanotech-101/special>.

Napierska, D., Thomassen, L.C., Lison, D., Martens, J.A., and Hoet, P.H. (2010). The nanosilica hazard: another variable entity. *Particle and fibre toxicology* **7**, 39.

Nemazee, D. (2006). Receptor editing in lymphocyte development and central tolerance. *Nat Rev Immunol* **6**, 728-740.

Nemmar, A., Holme, J.A., Rosas, I., Schwarze, P.E., and Alfaro-Moreno, E. (2013). Recent advances in particulate matter and nanoparticle toxicology: a review of the in vivo and in vitro studies. *BioMed research international* **2013**, 279371.

Niebuhr, M., Baumert, K., Heratizadeh, A., Satzger, I., and Werfel, T. (2014). Impaired NLRP3 inflammasome expression and function in atopic dermatitis due to Th2 milieu. *Allergy* 69, 1058-1067.

Nikota, J.K., Shen, P., Morissette, M.C., Fernandes, K., Roos, A., Chu, D.K., Barra, N.G., Iwakura, Y., Kolbeck, R., Humbles, A.A., *et al.* (2014). Cigarette smoke primes the pulmonary environment to IL-1alpha/CXCR-2-dependent nontypeable *Haemophilus influenzae*-exacerbated neutrophilia in mice. *J Immunol* 193, 3134-3145.

Nile, C.J., Barksby, E., Jitprasertwong, P., Preshaw, P.M., and Taylor, J.J. (2010a). Expression and regulation of interleukin-33 in human monocytes. *Immunology* 130, 172-180.

Nile, C.J., Barksby, E., Jitprasertwong, P., Preshaw, P.M., and Taylor, J.J. (2010b). Expression and regulation of interleukin-33 in human monocytes. *Immunology* 130, 172-180.

Normand, S., Delanoye-Crespin, A., Bressenot, A., Huot, L., Grandjean, T., and Peyrin-Biroulet, L. (2011a). Nod-like receptor pyrin domain-containing protein 6 (NLRP6) controls epithelial self-renewal and colorectal carcinogenesis upon injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108.

Normand, S., Delanoye-Crespin, A., Bressenot, A., Huot, L., Grandjean, T., Peyrin-Biroulet, L., Lemoine, Y., Hot, D., and Chamaillard, M. (2011b). Nod-like receptor pyrin domain-containing protein 6 (NLRP6) controls epithelial self-renewal and colorectal carcinogenesis upon injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 9601-9606.

O'Neill, L.A.J., Golenbock, D., and Bowie, A.G. (2013). The history of Toll-like receptors [mdash] redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol* 13, 453-460.

O'Shea, J.J., Ma, A., and Lipsky, P. (2002). Cytokines and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2, 37-45.

Oberdorster, G., Oberdorster, E., and Oberdorster, J. (2005). Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 113, 823-839.

Omatsu, Y., Sugiyama, T., Kohara, H., Kondoh, G., Fujii, N., Kohno, K., and Nagasawa, T. The Essential Functions of Adipo-osteogenic Progenitors as the Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Niche. *Immunity* 33, 387-399.

OMS (2014). Principales causes de mortalité dans le monde. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/fr/>.

Organisation mondiale de la santé Affections respiratoires chroniques: La bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO). <http://www.who.int/respiratory/copd/fr/>.

Oshikawa, K., Kuroiwa, K., Tago, K., Iwahana, H., Yanagisawa, K., Ohno, S., Tominaga, S.I., and Sugiyama, Y. (2001). Elevated soluble ST2 protein levels in sera of patients with asthma with an acute exacerbation. *Am J Respir Crit Care Med* 164, 277-281.

Palframan, R.T., Collins, P.D., Williams, T.J., and Rankin, S.M. (1998). Eotaxin Induces a Rapid Release of Eosinophils and Their Progenitors From the Bone Marrow. *Blood* 91, 2240-2248.

Palmer, G., Talabot-Ayer, D., Lamacchia, C., Toy, D., Seemayer, C.A., Viatte, S., Finckh, A., Smith, D.E., and Gabay, C. (2009). Inhibition of interleukin-33 signaling attenuates the severity of experimental arthritis. *Arthritis Rheum* 60, 738-749.

Papathanasiou, S., Rickelt, S., Soriano, M.E., Schips, T.G., Maier, H.J., Davos, C.H., Varela, A., Kaklamanis, L., Mann, D.L., and Capetanaki, Y. (2015). Tumor necrosis factor-[alpha] confers cardioprotection through ectopic expression of keratins K8 and K18. *Nat Med* 21, 1076-1084.

Papayannopoulos, V., Metzler, K.D., Hakkim, A., and Zychlinsky, A. (2010). Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *The Journal of Cell Biology* 191, 677-691.

Pasteur, I. (2013). Espace presse Fiche info Aspergillose. <http://www.pasteur.fr/fr/institut-pasteur/presse/fiches-info/aspergillose>.

Pauwels, N.S., Bracke, K.R., Dupont, L.L., Van Pottelberge, G.R., Provoost, S., Vanden Berghe, T., Vandenabeele, P., Lambrecht, B.N., Joos, G.F., and Brusselle, G.G. (2011). Role of IL-1 α and the Nlrp3/caspase-1/IL-1 β axis in cigarette smoke-induced pulmonary inflammation and COPD. *Eur Respir J* 38, 1019-1028.

Pestka, S., Krause, C.D., and Walter, M.R. (2004). Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunological Reviews* 202, 8-32.

Pétrilli, V., Dostert, C., Muruve, D.A., and Tschopp, J. (2007). The inflammasome: a danger sensing complex triggering innate immunity. *Current Opinion in Immunology* 19, 615-622.

Petrilli, V., Papin, S., Dostert, C., Mayor, A., Martinon, F., and Tschopp, J. (2007). Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ* 14, 1583-1589.

Pichery, M., Mirey, E., Mercier, P., Lefrancais, E., Dujardin, A., Ortega, N., and Girard, J.P. (2012). Endogenous IL-33 is highly expressed in mouse epithelial barrier tissues, lymphoid organs, brain, embryos, and inflamed tissues: in situ analysis using a novel Il-33-LacZ gene trap reporter strain. *J Immunol* 188, 3488-3495.

Pignatti, P., Brunetti, G., Moretto, D., Yacoub, M.-R., Fiori, M., Balbi, B., Balestrino, A., Cervio, G., Nava, S., and Moscato, G. (2006). Role of the Chemokine Receptors CXCR3 and CCR4 in Human Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 173, 310-317.

Pillay, J., Kamp, V.M., van Hoffen, E., Visser, T., Tak, T., Lammers, J.-W., Ulfman, L.H., Leenen, L.P., Pickkers, P., and Koenderman, L. (2012). A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *The Journal of Clinical Investigation* 122, 327-336.

Poyet, J.-L., Srinivasula, S.M., Tnani, M., Razmara, M., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E.S. (2001). Identification of Ipaf, a Human Caspase-1-activating Protein Related to Apaf-1. *Journal of Biological Chemistry* 276, 28309-28313.

Price, A.E., Liang, H.-E., Sullivan, B.M., Reinhardt, R.L., Eisley, C.J., Erle, D.J., and Locksley, R.M. (2010). Systemically dispersed innate IL-13-expressing cells in type 2 immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 11489-11494.

Profita, M., Albano, G.D., Riccobono, L., Di Sano, C., Montalbano, A.M., Gagliardo, R., Anzalone, G., Bonanno, A., Pieper, M.P., and Gjomarkaj, M. (2014). Increased levels of Th17 cells are associated with non-neuronal acetylcholine in COPD patients. *Immunobiology* 219, 392-401.

Ranji, A., and Boris-Lawrie, K. (2010). RNA helicases: Emerging roles in viral replication and the host innate response. *RNA Biology* 7, 775-787.

Rathinam, V.A.K., Vanaja, S.K., and Fitzgerald, K.A. (2012). Regulation of inflammasome signaling. *Nat Immunol* 13, 333-332.

Relja, B., Horstmann, J.P., Konradowitz, K., Jurida, K., Schaible, A., Neunaber, C., Oppermann, E., and Marzi, I. (2015). Nlrp1 inflammasome is downregulated in trauma patients. *Journal of Molecular Medicine* 93, 1391-1400.

Revillard, J.-P. Immunologie 4 ème édition. De Boeck Supérieur.

Riteau, N., Gasse, P., Fauconnier, L., Gombault, A., Couegnat, M., Fick, L., Kanellopoulos, J., Quesniaux, V.F., Marchand-Adam, S., Crestani, B., *et al.* (2010a). Extracellular ATP is a danger signal activating P2X7 receptor in lung inflammation and fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **182**, 774-783.

Riteau, N., Gasse, P., Fauconnier, L., Gombault, A., Couegnat, M., Fick, L., Kanellopoulos, J., Quesniaux, V.F.J., Marchand-Adam, S., Crestani, B., *et al.* (2010b). Extracellular ATP Is a Danger Signal Activating P2X7 Receptor in Lung Inflammation and Fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **182**, 774-783.

Rossi, D.L., Hurst, S.D., Xu, Y., Wang, W., Menon, S., Coffman, R.L., and Zlotnik, A. (1999). Lungkine, a novel CXC chemokine, specifically expressed by lung bronchoepithelial cells. *J Immunol* **162**, 5490-5497.

Roussel, L., Erard, M., Cayrol, C., and Girard, J.P. (2008). Molecular mimicry between IL-33 and KSHV for attachment to chromatin through the H2A-H2B acidic pocket. *EMBO Rep* **9**, 1006-1012.

Saetta, M., Di Stefano, A., Maestrelli, P., Ferraresso, A., Drigo, R., Potena, A., Ciaccia, A., and Fabbri, L.M. (1993). Activated T-Lymphocytes and Macrophages in Bronchial Mucosa of Subjects with Chronic Bronchitis. *American Review of Respiratory Disease* **147**, 301-306.

Sakai, N., Sweringen, H.L.V., Quillin, R.C., Schuster, R., Blanchard, J., Burns, J.M., Tevar, A.D., Edwards, M.J., and Lentsch, A.B. (2012). Interleukin-33 is Hepatoprotective During Liver Ischemia/Reperfusion in Mice. *Hepatology (Baltimore, Md)* **56**, 1468-1478.

Sallenave, J.M., Cunningham, G.A., James, R.M., McLachlan, G., and Haslett, C. (2003a). Regulation of pulmonary and systemic bacterial lipopolysaccharide responses in transgenic mice expressing human elafin. *Infect Immun* **71**, 3766-3774.

Sallenave, J.M., Cunningham, G.A., James, R.M., McLachlan, G., and Haslett, C. (2003b). Regulation of Pulmonary and Systemic Bacterial Lipopolysaccharide Responses in Transgenic Mice Expressing Human Elafin. *Infection and Immunity* **71**, 3766-3774.

Sallenave, J.M., Shulmann, J., Crossley, J., Jordana, M., and Gauldie, J. (1994). Regulation of secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI) and elastase-specific inhibitor (ESI/elafin) in human airway epithelial cells by cytokines and neutrophilic enzymes. *Am J Respir Cell Mol Biol* **11**, 733-741.

Sallenave, J.M., Xing, Z., Graham, F., and Gauldie, J. (1997). In vivo adenovirus-mediated expression of human pre-elafin, a potent neutrophil elastase inhibitor. *Chest* **111**, 128S-129S.

Saresella, M., La Rosa, F., Piancone, F., Zoppis, M., Marventano, I., Calabrese, E., Rainone, V., Nemni, R., Mancuso, R., and Clerici, M. (2016). The NLRP3 and NLRP1 inflammasomes are activated in Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration* **11**, 23.

Scapini, P., Bazzoni, F., and Cassatella, M.A. (2008). Regulation of B-cell-activating factor (BAFF)/B lymphocyte stimulator (BLyS) expression in human neutrophils. *Immunology Letters* **116**, 1-6.

Schiering, C., Krausgruber, T., Chomka, A., Frohlich, A., Adelmann, K., Wohlfert, E.A., Pott, J., Griseri, T., Bollrath, J., Hegazy, A.N., *et al.* (2014). The alarmin IL-33 promotes regulatory T-cell function in the intestine. *Nature* **513**, 564-568.

Schmitz, J., Owyang, A., Oldham, E., Song, Y., Murphy, E., McClanahan, T.K., Zurawski, G., Moshrefi, M., Qin, J., Li, X., *et al.* (2005). IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-

1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* 23, 479-490.

Schuijt, T.J., Lankelma, J.M., Scicluna, B.P., de Sousa e Melo, F., Roelofs, J.J.T.H., de Boer, J.D., Hoogendijk, A.J., de Beer, R., de Vos, A., Belzer, C., *et al.* (2016). The gut microbiota plays a protective role in the host defence against pneumococcal pneumonia. *Gut* 65, 575-583.

Schünke, M., Schulte, E., Schumacher, U., Voll, M., and Wesker, K. (2007). Atlas D'anatomie Prométhée cou et organes internes. Maloine 2, 1-370.

Segueni, N., Benmerzoug, S., Rose, S., Gauthier, A., Bourigault, M.-L., Reverchon, F., Philippeau, A., Erard, F., Le Bert, M., Bouscayrol, H., *et al.* (2016). Innate myeloid cell TNFR1 mediates first line defence against primary Mycobacterium tuberculosis infection. *Scientific reports* 6, 22454.

Seregin, S.S., Golovchenko, N., Schaf, B., Chen, J., Eaton, K.A., and Chen, G.Y. (2016). NLRP6 function in inflammatory monocytes reduces susceptibility to chemically induced intestinal injury. *Mucosal Immunol.*

Seys, L.J.M., Verhamme, F.M., Schinwald, A., Hammad, H., Cunoosamy, D.M., Bantsimba-Malanda, C., Sabirsh, A., McCall, E., Flavell, L., Herbst, R., *et al.* (2015). Role of B Cell-Activating Factor in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 192, 706-718.

Shao, D., Perros, F., Caramori, G., Meng, C., Dormuller, P., Chou, P.C., Church, C., Papi, A., Casolari, P., Welsh, D., *et al.* (2014). Nuclear IL-33 regulates soluble ST2 receptor and IL-6 expression in primary human arterial endothelial cells and is decreased in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Biochem Biophys Res Commun* 451, 8-14.

Shav-Tal, Y., and Zipori, D. (2002). PSF and p54(nrb)/NonO--multi-functional nuclear proteins. *FEBS Lett* 531, 109-114.

Shaykhiev, R., Krause, A., Salit, J., Strulovici-Barel, Y., Harvey, B.-G., O'Connor, T.P., and Crystal, R.G. (2009). Smoking-dependent Reprogramming of Alveolar Macrophage Polarization: Implication for Pathogenesis of COPD. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 183, 2867-2883.

Silverman , E.K., and Sandhaus , R.A. (2009). Alpha1-Antitrypsin Deficiency. *New England Journal of Medicine* 360, 2749-2757.

Snelgrove, R.J., Gregory, L.G., Peiró, T., Akthar, S., Campbell, G.A., Walker, S.A., and Lloyd, C.M. (2014). Alternaria-derived serine protease activity drives IL-33-mediated asthma exacerbations. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 134, 583-592.e586.

Sobradillo, P., Faner, R., Noguera, A., Gómez, C., Cruz, T., González, N., Ballester, E., Soler, N., Aróstegui, J.I., Rodríguez-Roisin, R., *et al.* (2014). The NLRP3 inflammasome in chronic obstructive pulmonary disease. *European Respiratory Journal* 42.

Song, Y., Li, X., and Du, X. (2009). Exposure to nanoparticles is related to pleural effusion, pulmonary fibrosis and granuloma. *European Respiratory Journal* 34, 559.

Stoll, P., Heinz, A.-S., Bratke, K., Bier, A., Garbe, K., Kuepper, M., Virchow, J.C., and Lommatzsch, M. (2014). Impact of smoking on dendritic cell phenotypes in the airway lumen of patients with COPD. *Respiratory research* 15, 48-48.

Strowig, T., Henao-Mejia, J., Elinav, E., and Flavell, R. (2012). Inflammasomes in health and disease. *Nature* 481, 278-286.

Su, Z., Lin, J., Lu, F., Zhang, X., Zhang, L., Gandhi, N.B., de Paiva, C.S., Pflugfelder, S.C., and Li, D.Q. (2013). Potential autocrine regulation of interleukin-33/ST2 signaling of dendritic cells in allergic inflammation. *Mucosal Immunol* 6, 921-930.

Sun, S., Schiller, J.H., and Gazdar, A.F. (2007). Lung cancer in never smokers--a different disease. *Nature reviews Cancer* 7, 778-790.

Sundnes, O., Pietka, W., Loos, T., Sponheim, J., Rankin, A.L., Pflanz, S., Bertelsen, V., Sitek, J.C., Hol, J., Haraldsen, G., *et al.* (2015). Epidermal Expression and Regulation of Interleukin-33 during Homeostasis and Inflammation: Strong Species Differences. *J Invest Dermatol* 135, 1771-1780.

Tajima, S., Oshikawa, K., Tominaga, S., and Sugiyama, Y. (2003). The increase in serum soluble ST2 protein upon acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 124, 1206-1214.

Takeda, T., Unno, H., Morita, H., Futamura, K., Emi-Sugie, M., Arae, K., Shoda, T., Okada, N., Igarashi, A., Inoue, E., *et al.* Platelets constitutively express IL-33 protein and modulate eosinophilic airway inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*.

Tang, L., and Cheng, J. (2013). Nonporous Silica Nanoparticles for Nanomedicine Application. *Nano today* 8, 290-312.

Taylor, A.E., Finney-Hayward, T.K., Quint, J.K., Thomas, C.M.R., Tudhope, S.J., Wedzicha, J.A., Barnes, P.J., and Donnelly, L.E. (2010). Defective macrophage phagocytosis of bacteria in COPD. *European Respiratory Journal* 35, 1039-1047.

Thornberry, N.A., Bull, H.G., Calaycay, J.R., Chapman, K.T., Howard, A.D., Kostura, M.J., Miller, D.K., Molineaux, S.M., Weidner, J.R., Aunins, J., *et al.* (1992). A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1[beta] processing in monocytes. *Nature* 356, 768-774.

Townsend, M.J., Fallon, P.G., Matthews, D.J., Jolin, H.E., and McKenzie, A.N. (2000). T1/ST2-deficient mice demonstrate the importance of T1/ST2 in developing primary T helper cell type 2 responses. *J Exp Med* 191, 1069-1076.

Traves, S., Culpitt, S., Russell, R., Barnes, P., and Donnelly, L. (2002). Increased levels of the chemokines GRO α and MCP-1 in sputum samples from patients with COPD. *Thorax* 57, 590-595.

Trujillo, G., O'Connor, E.C., Kunkel, S.L., and Hogaboam, C.M. (2008). A Novel Mechanism for CCR4 in the Regulation of Macrophage Activation in Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis. *The American Journal of Pathology* 172, 1209-1221.

Tsao, C.-C., Tsao, P.-N., Chen, Y.-G., and Chuang, Y.-H. (2016). Repeated Activation of Lung Invariant NKT Cells Results in Chronic Obstructive Pulmonary Disease-Like Symptoms. *PLoS ONE* 11, e0147710.

Tschopp, J., Martinon, F., and Burns, K. (2003). NALPs: a novel protein family involved in inflammation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 95-104.

Ueki, S., Tokunaga, T., Fujieda, S., Honda, K., Hirokawa, M., Spencer, L.A., and Weller, P.F. (2016). Eosinophil ETosis and DNA Traps: a New Look at Eosinophilic Inflammation. *Current Allergy and Asthma Reports* 16, 1-8.

Undem, B.J., and Carr, M.J. (2002). The role of nerves in asthma. *Current Allergy and Asthma reports* 2, 159-165.

van Gisbergen, K.P.J.M., Sanchez-Hernandez, M., Geijtenbeek, T.B.H., and van Kooyk, Y. (2005). Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN. *The Journal of Experimental Medicine* 201, 1281-1292.

- van Lookeren Campagne, M.**, and Dixit, V.M. (2011). Immunology: In command of commensals. *Nature* 474, 42-43.
- Vanderbilt, J.N.**, Mager, E.M., Allen, L., Sawa, T., Wiener-Kronish, J., Gonzalez, R., and Dobbs, L.G. (2003). CXC chemokines and their receptors are expressed in type II cells and upregulated following lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 29, 661-668.
- Vargas Buonfiglio, L.G.**, Bagegni, M., Borchering, J.A., Sieren, J.C., Caraballo, J.C., Reger, A., Zabner, J., Li, X., and Comellas, A.P. (2016). Protein Kinase C Zeta Inhibitor Promotes Resolution of Bleomycin-induced Acute Lung Injury. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*.
- Verri, W.A.**, Jr., Souto, F.O., Vieira, S.M., Almeida, S.C., Fukada, S.Y., Xu, D., Alves-Filho, J.C., Cunha, T.M., Guerrero, A.T., Mattos-Guimaraes, R.B., *et al.* (2010). IL-33 induces neutrophil migration in rheumatoid arthritis and is a target of anti-TNF therapy. *Ann Rheum Dis* 69, 1697-1703.
- Vietti, G.**, Lison, D., and van den Brule, S. (2015). Mechanisms of lung fibrosis induced by carbon nanotubes: towards an Adverse Outcome Pathway (AOP). *Particle and Fibre Toxicology* 13, 11.
- Voehringer, D.** (2013). Protective and pathological roles of mast cells and basophils. *Nat Rev Immunol* 13, 362-375.
- Walsh, J.G.**, Muruve, D.A., and Power, C. (2014). Inflammasomes in the CNS. *Nat Rev Neurosci* 15, 84-97.
- Wang, P.**, Zhu, S., Yang, L., Cui, S., Pan, W., Jackson, R., Zheng, Y., Rongvaux, A., Sun, Q., Yang, G., *et al.* (2015a). Nlrp6 regulates intestinal antiviral innate immunity. *Science* 350, 826-830.
- Wang, X.**, Podila, R., Shannahan, J.H., Rao, A.M., and Brown, J.M. (2013). Intravenously delivered graphene nanosheets and multiwalled carbon nanotubes induce site-specific Th2 inflammatory responses via the IL-33/ST2 axis. *International journal of nanomedicine* 8, 1733-1748.
- Wang, X.**, Zhang, C., Huang, G., Han, D., Guo, Y., Meng, X., and Kan, C. (2015b). Resveratrol inhibits dysfunction of dendritic cells from chronic obstructive pulmonary disease patients through promoting miR-34. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 8, 5145-5152.
- Wei, J.**, Zhao, J., Schrott, V., Zhang, Y., Gladwin, M., Bullock, G., and Zhao, Y. (2015). Red blood cells store and release interleukin-33. *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research* 63, 806-810.
- Whitsett, J.A.**, and Alenghat, T. (2015). Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. *Nat Immunol* 16, 27-35.
- WHO** Chronic respiratory diseases Asthma. <http://www.who.int/respiratory/asthma/en/>.
- WHO** (2011). Immunization, Vaccines and Biologicals (Pneumococcal disease). http://www.who.int/immunization/topics/pneumococcal_disease/en/.
- WHO** (2014). Media centre Influenza (Seasonal). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>.
- Wilson, M.S.**, Madala, S.K., Ramalingam, T.R., Gochuico, B.R., Rosas, I.O., Cheever, A.W., and Wynn, T.A. (2010). Bleomycin and IL-1 β -mediated pulmonary fibrosis is IL-17A dependent. *The Journal of Experimental Medicine* 207, 535-552.

- Wilson, M.S.**, and Wynn, T.A. (2009). Pulmonary fibrosis: pathogenesis, etiology and regulation. *Mucosal Immunol* 2, 103-121.
- Wilson, R.** (1998). The role of infection in copd. *Chest* 113, 242S-248S.
- Wlodarska, M.**, Thaïss, C.A., Nowarski, R., Henao-Mejia, J., Zhang, J.P., and Brown, E.M. (2014a). NLRP6 inflammasome orchestrates the colonic host-microbial interface by regulating goblet cell mucus secretion. *Cell* 156.
- Wlodarska, M.**, Thaïss, C.A., Nowarski, R., Henao-Mejia, J., Zhang, J.P., Brown, E.M., Frankel, G., Levy, M., Katz, M.N., Philbrick, W.M., *et al.* (2014b). NLRP6 inflammasome orchestrates the colonic host-microbial interface by regulating goblet cell mucus secretion. *Cell* 156, 1045-1059.
- World Health Organisation, W.** (1997). IRAC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human: Silica, some silicates, coal dust and para-aramir fibrils. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol68/> 68.
- Wright, H.L.**, Moots, R.J., and Edwards, S.W. (2014). The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Nature reviews Rheumatology* 10, 593-601.
- Wright, J.L.**, Cosio, M., and Churg, A. (2008). Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 295, L1-15.
- Wu, Y.**, Xu, H., Li, L., Yuan, W., Zhang, D., and Huang, W. (2016). Susceptibility to Aspergillus Infections in Rats with Chronic Obstructive Pulmonary Disease via Deficiency Function of Alveolar Macrophages and Impaired Activation of TLR2. *Inflammation* 39, 1310-1318.
- Wynn, T.A.** (2011). Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis. *J Exp Med* 208, 1339-1350.
- Xu, D.**, Jiang, H.R., Li, Y., Pushparaj, P.N., Kurowska-Stolarska, M., Leung, B.P., Mu, R., Tay, H.K., McKenzie, A.N., McInnes, I.B., *et al.* (2010). IL-33 exacerbates autoantibody-induced arthritis. *J Immunol* 184, 2620-2626.
- Yang, W.**, Ni, H., Wang, H., and Gu, H. (2015). NLRP3 inflammasome is essential for the development of chronic obstructive pulmonary disease. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 8, 13209-13216.
- Yazdi, A.S.**, Guarda, G., Riteau, N., Drexler, S.K., Tardivel, A., Couillin, I., and Tschopp, J. (2010). Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through release of IL-1alpha and IL-1beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 19449-19454.
- Ydens, E.**, Demon, D., Lornet, G., De Winter, V., Timmerman, V., Lamkanfi, M., and Janssens, S. (2015). Nlrp6 promotes recovery after peripheral nerve injury independently of inflammasomes. *Journal of Neuroinflammation* 12, 1-14.
- Yin, H.**, Li, X.Y., Yuan, B.H., Zhang, B.B., Hu, S.L., Gu, H.B., Jin, X.B., and Zhu, J.Y. (2011). Adenovirus-mediated overexpression of soluble ST2 provides a protective effect on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Clin Exp Immunol* 164, 248-255.
- Zane, A.**, McCracken, C., Knight, D.A., Young, T., Lutton, A.D., Olesik, J.W., Waldman, W.J., and Dutta, P.K. (2015). Uptake of bright fluorophore core-silica shell nanoparticles by biological systems. *International journal of nanomedicine* 10, 1547-1567.
- Zhang, X.**, Shan, P., Jiang, G., Cohn, L., and Lee, P.J. (2006). Toll-like receptor 4 deficiency causes pulmonary emphysema. *Journal of Clinical Investigation* 116, 3050-3059.

Zhao, W.H., and Hu, Z.Q. (2012). Up-regulation of IL-33 expression in various types of murine cells by IL-3 and IL-4. *Cytokine* 58, 267-273.

Zhu, X., Cao, W., Chang, B., Zhang, L., Qiao, P., Li, X., Si, L., Niu, Y., and Song, Y. (2016). Polyacrylate/nanosilica causes pleural and pericardial effusion, and pulmonary fibrosis and granuloma in rats similar to those observed in exposed workers. *International journal of nanomedicine* 11, 1593-1605.

Manoussa FANNY
Etude des mécanismes de l'inflammation pulmonaire lors de
l'exposition aux nanoparticules ou la fumée de cigarette :
Implication des voies de signalisations des récepteurs ST2 et
NLRP6

Résumé :

Les maladies pulmonaires, responsables de 3,1 millions de décès de part le monde représentent un problème majeur de santé publique. En particulier, la fibrose pulmonaire et la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) conduisent à la perte de la fonction pulmonaire. Aucun traitement efficace n'a été identifié à ce jour pour lutter contre ces maladies, la seule alternative étant la transplantation. Au cours de ma thèse, j'ai exploré les mécanismes du développement de ces maladies en utilisant différents modèles chez la souris, soit par l'instillation de nanoparticules de métaux ou de bléomycine, conduisant à l'inflammation et/ou à la fibrose pulmonaire, soit par exposition à la fumée de cigarette provoquant une inflammation. Nous avons montré le rôle de la voie de signalisation IL-33/ST2 dans les réponses inflammatoires induites par les nanoparticules ou la bléomycine et identifié de nouveaux mécanismes de régulation de l'IL-33 au sein des macrophages, différents de ceux décrits pour les cellules épithéliales. Nos résultats indiquent que l'expression intracellulaire de l'IL-33 et de son récepteur ST2, joue un rôle important dans l'inflammation, ainsi que la translocation nucléaire de l'IL-33. D'autre part, mes travaux de thèse ont permis d'identifier le rôle clef du senseur intracytosolique NLRP6 dans l'inflammation provoquée par l'exposition à la fumée de cigarette. Nos résultats indiquent que NLRP6, aux fonctions pulmonaires inexplorées, contrôle l'activation des cellules épithéliales et le recrutement des neutrophiles de façon indépendante de la formation d'un inflammasome mais dépendante de la signalisation par les récepteurs des interférons de type I et III.

Mots clés : fibrose pulmonaire, BPCO, IL-33, ST2, NLRP6

Mechanisms of nanoparticles or cigarette smoke induced
inflammation: Study of signalization pathway mediated by ST2
receptor and NLRP6

Summary:

Pulmonary diseases are a major health problem with 3.1 million deaths in the worldwide. Among them pulmonary fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease (COPD), which occur after repeated lung epithelium injury, are characterized by impaired lung functions. To date, no effective therapy against pulmonary fibrosis and COPD were developed, lung transplantation being the only alternative. During my thesis, I studied the mechanisms leading to disease development using different experimental models in mice in particular by metal dioxide nanoparticles or bleomycin instillation leading to inflammation and/or pulmonary fibrosis, or by cigarette smoke exposure promoting pulmonary inflammation which may lead to emphysema. We show the crucial role of IL-33/ST2 signaling pathway in response to nanoparticles or bleomycine and identify new mechanisms for IL-33 regulation in macrophages which are different from those described in epithelial cells. Our results indicate that intracellular expression of IL-33 and of its receptor ST2, together with nuclear IL-33 translocation, play an important role in inflammatory response to nanoparticles instillation. On the other hand, my thesis work allowed identifying that the cytosolic sensor NLRP6 as a key player in pulmonary inflammation developed upon mouse cigarette smoke exposure. Interestingly, our results show that the receptor NLRP6, whose pulmonary functions are still unexplored, controls epithelial cells activation leading to neutrophils recruitment in the airways, in an inflammasome-independent manner but dependently of type I and III interferon receptors signaling.

Keywords: Pulmonary fibrosis, COPD, IL-33, ST2, NLRP6



Laboratoire d'Immunologie et Neurogénétique
Expérimentales et Moléculaires INEM UMR 7355

