



**Université Lille 2
Droit et Santé**

Doctorat Université Libanaise

THESE EN COTUTELLE

Pour obtenir le grade de Docteur délivré par

L'Université Lille 2 Droit et Santé

Spécialité: Immunologie

et

L'Ecole Doctorale des Sciences et Technologie

(Université Libanaise)

Spécialité: Microbiologie alimentaire et médicale

Présentée et soutenue publiquement par

Maya Hassane

Le 14 Décembre 2016

**Etude des lymphocytes T Gamma-delta producteurs
d'interleukine-17 au cours des infections respiratoires**

Directeur de thèse Français: **Dr. Christophe Paget**

Directeur de thèse Libanais: **Dr. Fouad Dabboussi**

Membres du Jury

Dr. Georges Bahr, Université Balamand, Liban

Rapporteur

Dr. Daniel Pennington, Université Queen Mary, Royaume Uni

Rapporteur

Dr. Isabelle Couillin, Université d'Orléans, France

Examineur

Dr. Ghassan Dbaibo, Université Américaine de Beirut, Liban

Examineur

Remerciements

En premier lieu, je remercie vivement les membres du jury qui ont accepté d'évaluer mon travail en tant que président, rapporteurs et examinateurs.

Je tiens à exprimer ma gratitude au directeur de l'équipe 12 Dr. François Trottein pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire. Merci pour la confiance que vous m'avez accordé.

Je tiens aussi à remercier le directeur de l'équipe à l'université libanaise Dr. Monzer Hamze, ainsi que le directeur et le co-directeur de thèse Dr. Fouad Dabboussi et Dr. Bachar Ismail pour m'avoir donné l'opportunité de travailler sur ce projet.

Mon directeur de thèse, Dr. Christophe Paget, je ne suis pas sûr que quelques lignes soient suffisantes pour te démontrer toute mon admiration! Un immense merci et une profonde reconnaissance pour tout ce que tu m'as apporté. Trois ans de vrai travail d'équipe et de bonne ambiance que je n'oublierai jamais. C'était un vrai plaisir de travailler avec toi. Tu m'as apporté plein de connaissances scientifiques à chaque fois j'ai parlé avec toi. Merci pour m'avoir encadré et pour être un chef idéal non seulement sur le plan professionnel mais aussi sur le plan humain. Merci pour m'avoir donné l'opportunité d'être un membre de l'équipe Paget!

Manu, l'autre membre de l'équipe Paget, tu as créé une belle ambiance dans l'équipe. Merci pour tout.

Un grand Merci pour Reem Ghinnagow, Morgane Baron et Ranin Beshara. J'ai été très heureuse de partager le bureau avec vous. Merci pour votre amitié et votre support. C'est grâce à des personnes comme vous que j'ai pu supporter les moments difficiles et les journées qui pouvaient durer 14 heures. J'ai partagé des moments extraordinaires avec vous que je n'oublierai jamais. Merci pour être là pour moi, je vous aime beaucoup.

Merci Josette Fontaine et Daphnée Soulard pour votre aide. Merci pour la bonne humeur et la belle ambiance que vous avez créé. C'était un grand plaisir de travailler avec vous.

Christelle et Isabelle, merci pour vos critères scientifiques qui m'ont beaucoup aidé.

Eva, malgré qu'on travaillait toujours au sein de la même équipe, mais je n'ai pas eu l'occasion de te bien connaître qu'à la fin de ma thèse. Tes caractères humains, ta bonne humeur et ta vue exceptionnelle pour le monde scientifique, je ne les oublierai jamais.

J'aimerais remercier toutes les personnes de l'équipe 12 avec lesquelles j'ai pu interagir durant ma thèse, cela a été un réel plaisir de vous connaître tous, Asma, Valentin, Adeline, Jean-Claude, Rémi, Christophe C., Delphine, Laura, Nathan, Muriel, Philippe, Gwen, Bachirou. Merci pour votre gentillesse.

Enfin, j'adresse toute mon affection à ma famille, et en particulier à ma maman. Malgré mon éloignement pour 2 années, votre confiance, votre tendresse et votre amour m'ont guidé tous les jours. Merci pour m'avoir soutenue pour devenir ce que je suis aujourd'hui. Je vous aime infiniment.

Publications et communications personnelles

- Publications

- Paget C, Chow MT, Gherardin NA, Beavis PA, Uldrich AP, Duret H, **Hassane M**, Souza-Fonseca-Guimaraes F, Mogilenko DA, Staumont-Sallé D, Escalante NK, Hill GR, Neeson P, Ritchie DS, Dombrowicz D, Mallevaey T, Trottein F, Belz GT, Godfrey DI and Smyth MJ. CD3 (bright) signals on $\gamma\delta$ T cells identify IL-17A-producing V γ 6V δ 1(+) T cells. *Immunol cell biol.* 2015.

- **Hassane M** and Paget C. “Universal Flu Vaccine”: Can NK Cell-mediated ADCC Tip the Scales? *EbioMedicine Commentary.* 2016.

- **Hassane M**, Demon D, Soulard D, Fontaine J, Keller L, Patin E, Porte R, Prinz I, Ryffel B, Kadioglu A, Veening JW, Sirard JC, Faveeuw C, Lamkanfi M, Trottein F and Paget C. Neutrophilic NLRP3 inflammasome-dependent IL-1 β secretion regulates the $\gamma\delta$ T17 cell response in respiratory bacterial infections. *Mucosal Immunology.* Accepted.

- Barthelemy A, Ivanov S, **Hassane M**, Fontaine J, Heurtault B, Frisch B, Sirard JC, Faveeuw C, Paget C and Trottein F. Exogenous activation of invariant Natural Killer T cells by α -galactosylceramide reduces pneumococcal outgrowth and dissemination post-influenza. *MBio.* 2016.

- **Hassane M**, Soulard D, Ismail B, Dabboussi F, Trottein F and Paget C. IL-7 protects against respiratory pneumococcal infection by promoting innate IL-17A response. *In preparation.*

- Communications orales

- NLRP3 inflammasome regulates a critical neutrophil/gamma-delta T cell axis in host response to respiratory bacterial infection. **Centre d'infection et d'immunité de Lille (Lille-France 27 Novembre 2015)**

- CD3^{bright} gamma-delta T cells are the major innate source of Interleukin-17A during pneumococcal infection in mice. **20^{ème} conférence internationale LAAS (Beirut-Liban 27-29 Mars 2014)**

- **Posters**

- Neutrophilic NLRP3 inflammasome-dependent IL-1 β secretion regulates $\gamma\delta$ T17 cell response during respiratory bacterial infections. **7th international gamma-delta T cell conference (Londres-Royaume Uni 16-19 Juin 2016)**
- A critical neutrophil/gamma-delta T17 cell axis in innate host response to respiratory bacterial infection. **22^{ème} conférence internationale LAAS (Beirut-Liban 14-15 Avril 2016)**
- A critical neutrophil/gamma-delta T17 cell axis in innate host response to acute *Streptococcus pneumoniae* infection. **Troisième journée franco-libanaise (Beirut-Liban 29-30 Octobre 2015)**
- TNF- α regulates a critical neutrophil/gamma-delta T17 cell axis in innate host response to acute *Streptococcus pneumoniae* infection. **4th European congress of immunology (Vienne-Autriche 6-9 Septembre 2015)**
- Implication of neutrophils in gamma-delta T cells response during pneumococcal infection in mice. **21^{ème} conférence internationale LAAS (Beirut-Liban 16-18 Avril 2015)**
- A critical neutrophil/gamma-delta T17 cell axis in innate host response to acute *Streptococcus pneumoniae* infection. **13th European respiratory society lung science conference (Estoril-Portugal 13-15 Mars 2015)**
- Mechanisms of activation of IL-17-producing CD3^{bright} gamma-delta T cells during pneumococcal infection. **Société Francaise d'immunologie (Lille-France 4-6 Novembre 2014)**

- **Récompenses et Bourses**

- 4th European congress of immunology (Vienne-Autriche). **Bourse 350€**
- 13th European respiratory society lung science conference (Estoril-Portugal). **Bourse 600€**
- 13th European respiratory society lung science conference (Estoril-Portugal). **Prix Poster**

Cadre de travail

- Laboratoire

Le travail a été effectué au sein de l'Institut Pasteur de Lille - Centre d'infection et d'immunité de Lille - dirigé par le Dr. Camille Locht. Plus précisément, mon travail a été réalisé dans l'équipe 12 : « Lung Infection and Innate Immunity » animée par le Dr. François Trottein. Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une collaboration entre l'Université Libanaise et l'Université Lille 2 Droit et Santé (Ecole doctorale de Sciences et biotechnologies).

- Collaborations

Au cours de ce projet, des collaborations ont été effectuées avec plusieurs équipes : une collaboration avec le Prof. Mohamed Lamkanfi (Université de Ghent, Belgique) qui nous a permis d'avoir accès aux souris *Nlrp3^{-/-}*, *Casp1/11^{-/-}* et *Asc^{-/-}*. Une autre collaboration avec le Prof. Jan-Willem Veening (Université de Groningen, Pays Bas) qui nous a fourni la bactérie D39 sous 3 formes : WT, mutée pour la pneumolysine et recomplémentée avec la pneumolysine après mutation. Le Dr. Immo Prinz (Université de Hanovre, Allemagne) nous a fourni l'anticorps 17D1 reconnaissant le TCR V γ 6V δ 1. Enfin le Dr. Bernhard Ryffel (Université d'Orléans, France) nous a offert les souris *Il23p19^{-/-}* et *Il1r1^{-/-}*.

- Financement

Ce projet a été financé par une bourse doctorale de l'association AZM et SAADE en collaboration avec l'Université Libanaise. Une partie de mon travail a également été financée par l'Inserm.

Abréviations

ACm: Anticorps neutralisant monoclonal

AIM2: Absent in melanoma 2

AM: Macrophage alvéolaire

APC: Cellule présentatrice d'antigène

Asc: Apoptosis-associated speck-like protein

ATP: Adénosine triphosphate

Btln: Butyrophyline

CARD: Caspase activation and recruitment domain

Casp: Caspase

CD: Cluster of differentiation

CDC: Center for disease control and prevention

CDR: Complementarity determining region

CMH: Complexe majeur d'histocompatibilité

DAMP: Danger associated molecular pattern

DC: Cellule dendritique

DETC: Dendritic epidermal T cell

EAE: Encéphalomyélite expérimentale auto-immune

IFN: Interféron

Ig: Immunoglobuline

IL: Interleukine

ILC: Innate lymphoid cell

KO: Knock out

LPS: Lypopolysaccharide

LT: Lymphocyte T

MAIT: Lymphocytes T invariants associés aux muqueuses

Mefv: Mediterranean fever

MPI: Maladie pneumococcique invasive
MyD88: Myeloid differentiation primary response gene 88
NET: Neutrophil extracellular trap
NFkB: Nuclear factor kappa B
NK: Natural Killer
NKG2D: Natural killer group 2D
NLR: NOD-like receptor
NLRC: NLR family, caspase recruitment domain
NLRP: NLR family, pyrin domain
NOD: Nucleotide-binding oligomerization domain
OMS: Organisation mondiale de santé
PAg: Phosphoantigène
Ply: Pneumolysine
PRR: Pattern recognition receptor
PYD: Pyrin domain
RORgT: Retinoid-related orphan receptor gamma T
ROS: Espèces réactives de l'oxygène
S.p.: *Streptococcus pneumoniae*
TCR: T cell receptor
Th: T helper
TLR: Toll-like receptor
TNF: Tumor necrosis factor
TRAIL: TNF-related apoptosis-inducing ligand
WT: Wild-type

Résumé

Le développement de la réponse immunitaire innée de l'hôte au cours des infections respiratoires nécessite la mise en place rapide d'un réseau moléculaire et cellulaire relativement complexe ayant pour but de contrôler la croissance microbienne ainsi que permettre son éradication. Dans certaines circonstances, et malgré l'existence de vaccins et d'antibiotiques efficaces, l'infection par *Streptococcus pneumoniae* peut aboutir à des pathologies graves telles qu'une pneumonie, une méningite et/ou une septicémie. Ainsi, à l'heure actuelle, les maladies associées au pneumocoque sont encore loin d'être sous contrôle. Dans ce contexte, une meilleure compréhension de la réponse immunitaire innée de l'hôte contre ce pathogène est nécessaire.

Mes travaux de thèse ont permis pour la première fois de mettre en évidence la fonctionnalité et la relevance biologique de l'inflammasome NLRP3 au sein des neutrophiles pulmonaires *in vivo* dans un modèle d'infection respiratoire par *S. pneumoniae*.

Ainsi, de façon inattendue, les neutrophiles jouent un rôle accessoire original à des temps précoces de l'infection via leur capacité à produire de l'IL-1 β . Cette synthèse protéique est possible grâce à la combinaison de 2 signaux à la fois dérivés de l'hôte (TNF- α des macrophages alvéolaires) et de la bactérie (toxine). Ces deux signaux permettent l'assemblage et l'activation de l'inflammasome NLRP3 neutrophilique. D'un point de vue translationnel, nous avons été capables de démontrer un mécanisme similaire avec des neutrophiles humains.

Cette production d'IL-1 β par les neutrophiles participe à l'activation des lymphocytes T $\gamma\delta$ producteurs d'IL-17; une cytokine essentielle dans le contrôle de l'infection bactérienne via sa capacité à induire rapidement le recrutement d'une deuxième vague de neutrophiles participant directement à l'élimination et la clairance bactérienne.

Sur la base de ces travaux fondamentaux, nous avons émis l'hypothèse qu'une augmentation du pool de cellules innées sécrétrices d'IL-17A pourrait avoir un effet bénéfique sur le contrôle d'une infection respiratoire à pneumocoque. Ainsi via l'administration prophylactique et locale d'IL-7, nous avons été capables d'augmenter la fréquence et le nombre de lymphocytes innés producteurs d'IL-17A résultant en un meilleur contrôle de la charge bactérienne pathogène associée à une augmentation du recrutement neutrophilique. A ce stade, ces résultats encourageants, nous pousse à mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires associés à cet effet dans l'éventualité de proposer à terme une nouvelle approche thérapeutique dans le contrôle des infections respiratoires pulmonaires basée sur la manipulation de la biologie de l'IL-7.

Summary

The mounting of an appropriate host innate immune response in the lungs requires the rapid establishment of a complex cellular and molecular networking that allows the containment and clearance of pathogens during respiratory infections. Both neutrophils and $\gamma\delta$ T cells are central players in the host response during mucosal infections. Using a model of invasive pneumococcal disease, we illustrated a role for Interleukin-17A in controlling neutrophil recruitment, bacterial loads and survival. Following *Streptococcus pneumoniae* infection, we defined pulmonary $\gamma\delta$ T cells, especially the lung resident V γ 6V δ 1⁺ subset, as the primary source of IL-17A in an IL-23/IL-1 β -dependent manner. Using gene-targeted mice, we demonstrated that $\gamma\delta$ T cells largely contributed to neutrophilia and to the control of the pathology. Furthermore, we now defined a second and unexpected early role for neutrophils as accessory cells in $\gamma\delta$ T17 cell activation through IL-1 β secretion. Neutrophil-derived IL-1 β was dependent on NLRP3 inflammasome activity and required alveolar macrophage-secreted TNF- α for priming and bacterial pneumolysin for NLRP3-dependent caspase-1 activation. This report thus brings to light the sequential molecular/cellular events leading to $\gamma\delta$ T17 cell activation and highlights the existence of a biologically relevant and fully functional NLRP3 inflammasome in pulmonary neutrophils that regulates a key immune axis in the development of protective innate response to respiratory bacterial infection.

Based on these observations, we hypothesized that an increase in the pool of IL-17A-producing innate-like T lymphocytes might play a protective role during pneumococcal infection. As recently suggested, we demonstrated that intranasal IL-7/M25 complex administration into naïve mice allowed the expansion of the cellular pool of innate immune cells presenting a Th17-like phenotype in the lungs especially $\gamma\delta$ T cells. Moreover, we showed during *S. pneumoniae* infection that prophylactic IL-7/M25 treatment increased the capacity of V γ 6V δ 1⁺ T cells to produce IL-17A. Interestingly, this phenotype led to higher neutrophil recruitment and a better control of bacterial burden in the lungs as well as systemic dissemination. Thus, we report a critical role of IL-7 in creating an IL-17-enriched microenvironment which improves the early development of host innate immune response to respiratory bacterial infection. This observation might pave the way to the development of future innovative cytokine/cell-based strategies against *Streptococcus pneumoniae*.

Table de matières

Contexte et enjeux scientifiques.....	1
---------------------------------------	---

Introduction

I. Les infections respiratoires à <i>Streptococcus pneumoniae</i>	2
A. Généralités	2
1. Epidémiologie et caractéristiques cliniques.....	2
2. Structure de la bactérie.....	4
3. Les facteurs de virulence de <i>S. pneumoniae</i>	4
4. Sérotypes : Diversité, prévalence géographique et virulence associée.....	5
5. Traitement	6
6. Vaccination	6
B. La réponse immunitaire contre <i>Streptococcus pneumoniae</i>	7
1. L'immunité innée.....	7
a. Les récepteurs innés ou « pattern recognition receptor ».....	7
i. Les récepteurs de type Toll ou « Toll-like receptor ».....	7
ii. Les récepteurs de type NOD et les inflammasomes	9
- Les récepteurs de type NOD « NLR ».....	9
- Les inflammasomes	9
b. Les acteurs cellulaires de l'immunité innée.....	11
i. Les macrophages alvéolaires	11
ii. Les neutrophiles.....	12
iii. Les cellules Natural Killer	14
iv. Les « innate lymphoid cells » de type 3.....	15
2. L'immunité adaptative	15
a. Les lymphocytes T conventionnels.....	15
b. Les lymphocytes B.....	16
3. Les cellules de l'immunité dite « transitionnelle »	17
a. Les lymphocytes T Natural Killer.....	17
b. Les lymphocytes T invariants associés aux muqueuses	19

II. Les lymphocytes T gamma-delta	20
A. Découverte et place des lymphocytes T $\gamma\delta$ au sein de l'immunité	20
B. Développement et sélection thymique des lymphocytes T $\gamma\delta$	21
1. Ontogénie et programmation fonctionnelle des lymphocytes T $\gamma\delta$	21
2. Sélection positive de certaines sous-populations de lymphocytes T $\gamma\delta$	22
a. Les lymphocytes T V γ 9V δ 2 humains	22
b. Les « Dendritic Epidermal T Cells » murines: V γ 5V δ 1 ⁺	23
C. Topologie du TCR $\gamma\delta$ et reconnaissance antigénique	24
1. Structure et stœchiométrie du complexe TCR $\gamma\delta$ /CD3.....	24
2. Les ligands connus	25
3. Modalités de reconnaissance.....	26
D. Fonctions des lymphocytes T $\gamma\delta$	28
1. Cytotoxicité.....	28
2. La production de cytokines	28
3. Présentation antigénique	29
E. Utilisation des lymphocytes T $\gamma\delta$ en immunothérapie	29
F. Les lymphocytes T $\gamma\delta$ producteurs d'IL-17.....	31
1. Généralités	31
2. Les lymphocytes T $\gamma\delta$ CD3 ^{bright}	31
III. L'inflammasome NLRP3	35
A. Généralités	35
B. Modalités d'activation des inflammasomes	36
1. Le « priming » des inflammasomes (signal 1).....	36
2. Assemblage et activation des inflammasomes (signal 2)	37
a. NLRP3.....	37
b. AIM2.....	38
c. Pyrine	38
d. NLRP1 et NLRC4.....	38
C. Inflammasomes et infections.....	39
1. L'inflammasome NLRP3.....	39

2. Les autres inflammasomes	40
D. Polymorphisme des inflammasomes et maladies auto-inflammatoires	41
IV. L'interleukine-7 : une cytokine homéostatique de choix pour booster les réponses IL-17 innées	42
A. Généralités	42
B. L'utilisation de l'IL-7 en clinique	43
1. Données précliniques	43
2. Etudes et essais cliniques	44
C. Nouveaux outils biologiques renforçant l'innocuité et l'activité biologique de l'IL-7.....	45
D. Relation entre l'IL-7 et l'homéostasie des populations lymphoïdes innées productrices d'IL-17.....	48
Figures	50
Objectif	60
Matériels et Méthodes	61
Résultats	68
Discussion	90
Pourquoi les lymphocytes T $\gamma\delta$ sont-ils la source majeure d'IL-17A dans les premiers instants de l'infection pneumococcique?	91
Les lymphocytes T $\gamma\delta$ CD3 ^{bright} V γ 6V δ 1 sont résidents dans le parenchyme pulmonaire : Une population spécialisée dans les défenses antibactériennes?.....	92
Que traduit la forte expression de CD3 à la surface des lymphocytes T V γ 6V δ 1?.....	94
Que reconnaît le TCR V γ 6V δ 1?.....	95
Les polynucléaires neutrophiles : Une source inattendue d'IL-1 β	95
Les neutrophiles pulmonaires : une population aux fonctions pléiotropies ou subdivisée en populations fonctionnellement spécialisées?.....	96
Les neutrophiles : une population spécialisée dans la formation des inflammasomes?.....	97

L'activation de l'inflammasome NLRP3 des neutrophiles nécessite une « collaboration » entre le pathogène et l'hôte.....	99
- Signal 1.....	99
- Signal 2.....	100
Un inflammasome NLRP3 fonctionnel dans les neutrophiles humains.....	101
Manipuler la biologie de l'IL-7 : une nouvelle approche thérapeutique dans la régulation des pathologies respiratoires?.....	102
Conclusion	105
Références	106
Annexe	

Contexte et enjeux scientifiques

Le siècle passé a été témoin d'incroyables progrès dans le contrôle des maladies infectieuses. Toutefois, les pathogènes respiratoires continuent à menacer l'homme et à causer des problèmes sérieux de santé publique. Non seulement certains pathogènes émergents, mais aussi des microbes connus de longues dates continuent à menacer l'homme. Par exemple, la bactérie *Streptococcus pneumoniae* (ou pneumocoque) est responsable de la majorité des cas de pneumonies bactériennes communautaires, notamment chez les personnes présentant un statut immunitaire fragile comme les jeunes enfants et les personnes âgées. Si la colonisation du nasopharynx par le pneumocoque est le plus souvent asymptomatique ou entraîne des symptômes légers (sinusite, conjonctivite), elle peut dans certains cas évoluer vers une pathologie invasive (méningite et/ou septicémie) potentiellement mortelle (environ un million de décès dans le monde sont attribués au pneumocoque chaque année). Dans ce contexte, malgré l'existence de vaccins et d'antibiotiques, les décès associés au pneumocoque sont encore loin d'être éradiqués de nos jours.

L'immunité respiratoire joue un rôle prépondérant dans le contrôle des infections à *Streptococcus pneumoniae* mais les événements précoces et l'orchestration de cette dernière ne sont à l'heure pas encore totalement élucidés. Ainsi, une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la réponse immunitaire de l'hôte contre ce pathogène est requise dans le but de développer des traitements plus efficaces.

De nombreux facteurs sont impliqués dans la réponse immune précoce de l'hôte contre les infections respiratoires. Parmi ceux-ci, l'interleukine-17 (IL-17) est une cytokine pro-inflammatoire jouant un rôle critique dans la régulation de la réponse immunitaire au niveau des muqueuses. Par exemple, l'IL-17 possède des propriétés antimicrobiennes majeures via sa capacité à induire la production de chimiokines et de stimuler indirectement le recrutement de populations effectrices comme les polynucléaires neutrophiles. Plusieurs études ont récemment montré que certaines populations lymphocytaires innées telles que les cellules T gamma/delta ($\gamma\delta$) et les lymphocytes T Natural Killer étaient capables de produire rapidement des quantités importantes de cette cytokine.

Récemment nous avons pu démontrer, dans le laboratoire, l'existence d'une population particulière de lymphocytes T $\gamma\delta$ pulmonaires présentant un phénotype caractéristique de cellule spécialisée dans la production d'IL-17. De plus, cette population caractérisée par son fort niveau d'expression de la molécule CD3 (et ainsi nommée "lymphocytes T $\gamma\delta$ CD3^{bright}") était capable de produire très rapidement de l'IL-17 dans notre modèle d'infection respiratoire à pneumocoque.

Introduction

I. Les infections respiratoires à *Streptococcus pneumoniae*

Le tractus respiratoire représente, après la peau et le tractus gastro-intestinal, le troisième système du corps à être en contact permanent avec des facteurs environnementaux dangereux. Ces facteurs comprennent de nombreux agents pathogènes, tels que des bactéries, des virus, des champignons, ainsi que des allergènes et des produits chimiques variés. La diversité des agents pathogènes rencontrés quotidiennement, ainsi que leur fréquence non négligeable, nécessitent la présence d'un système immunitaire efficace qui sera capable de protéger l'hôte contre les infections.

L'un des agents pathogènes qui touchent fréquemment le tractus respiratoire est la bactérie *Streptococcus pneumoniae*. Décrite comme la cause majeure de pneumonies communautaires, méningites, bactériémies, ainsi que d'otites chez les jeunes enfants (Lynch et al., 2009), *Streptococcus pneumoniae* est une bactérie extracellulaire à Gram-positif encapsulée présente au niveau des voies aériennes supérieures comme bactérie commensale. Après colonisation, la bactérie prédomine et peut persister pendant des semaines ou des mois sans symptômes apparents (Kadioglu et al., 2008).

A. Généralités

1. Épidémiologie et caractéristiques cliniques

Les infections à *S. pneumoniae* posent des problèmes sérieux de santé publique en étant responsables de plus d'un million de cas de mortalité annuelle dans le monde selon les estimations de l'organisation mondiale de santé (OMS) en 2005. Ainsi, 30 à 50% des hospitalisations dues à des pneumonies en Europe et aux Etats-Unis sont associées à *S. pneumoniae*. De plus, sur les 8.8 millions cas de mortalité annuels chez les enfants âgés de moins de 5 ans en 2008, l'OMS a estimé que 476000 ont été causés par des infections à pneumocoques. Le portage de *S. pneumoniae* survient précocement dans la vie avec une prévalence qui varie entre 30 et 60% chez les enfants, et de 1 à 10% chez les adultes (Bogaert et al., 2004; Ferreira et al., 2011). Il y a 35 ans, plus de 95% des nourrissons porteurs étaient colonisés par plus que 6 sérotypes différents (Gray et al., 1980). Actuellement, la prévalence des colonisations par plusieurs sérotypes est estimée entre 1.3 et 48.8% (Turner et al., 2011). Une telle variation

s'explique par différents facteurs géographiques, à la population étudiée, aux différentes techniques de détection utilisées et bien sûr à la capacité d'accès des différentes populations à la vaccination.

De plus, *S. pneumoniae* peut être impliquée dans la morbidité/mortalité de patients présentant des pathologies préexistantes. Par exemple, au cours des différentes pandémies grippales qui ont sévis au XX^{ième} siècle, 20 à 30% des victimes présentaient des signes de surinfection à pneumocoque (Morens et al., 2008). Plus récemment, plusieurs sérotypes pneumococciques ont également été retrouvés chez des patients atteints de broncho-pneumopathies chroniques obstructives en période d'exacerbation.

Une fois établie, l'infection à *S. pneumoniae* peut évoluer vers une maladie pneumococcique invasive (MPI) (septicémie, méningite ou pneumonie) (OMS, 2005) ou non invasive (sinusite et/ou otite) (CDC, 2015). Ainsi la MPI, définie par l'isolement de souches pneumococciques au niveau d'un site distant normalement stérile, touche fréquemment les enfants de moins de 2 ans, les personnes âgées (> 65 ans) ainsi que les individus immunodéprimés (Lynch et al., 2009; Naheed et al., 2009). La pneumonie communautaire est la forme clinique la plus commune de MPI. Sa période d'incubation est généralement courte de 1 à 3 jours et les symptômes comprennent une apparition brutale de fièvre et de frissons, ainsi que des douleurs thoraciques, toux, dyspnée et malaise. Les complications de la pneumonie à pneumocoque comprennent la péricardite et l'insuffisance respiratoire. Selon les données de CDC en 2015, *S. pneumoniae* a été décrite comme étant responsable de 36% des cas de pneumonie communautaire et de plus de 12000 cas annuels de bactériémie. Cette dernière se retrouve dans 12 à 16% des cas de MPI chez les enfants âgés de moins de 2 ans.

De plus, *S. pneumoniae* peut causer des otites, dont la fréquence est d'environ 28 à 55%. En cas de complication, elle peut aboutir à une méningite. Ainsi, environ 3000 à 6000 cas de méningites à pneumocoque sont diagnostiqués annuellement avec un taux de mortalité associé de l'ordre de 8% chez les enfants et 22% chez les personnes âgées. Les symptômes peuvent inclure des maux de tête, vomissements, fièvre, convulsions et coma. Il faut noter que *S. pneumoniae* cause environ 50% de la totalité des cas de méningites bactériennes aux Etats-Unis.

2. Structure de la bactérie

Comme pour les autres bactéries à Gram positif, une membrane cytoplasmique, une paroi cellulaire et une capsule polysaccharidique entourent *S. pneumoniae* pour former sa surface. La paroi cellulaire est constituée de peptidoglycane auquel sont attachés des acides téchoïques. Des acides lipotéchoïques insérés dans la membrane cytoplasmique possèdent une structure similaire aux acides téchoïques, avec un fragment lipidique additionnel (Figure A). Les 2 formes d'acides contiennent de la phosphorylcholine, contre laquelle des anticorps peuvent se former (De Velasco et al., 1995).

3. Les facteurs de virulence de *S. pneumoniae*

S. pneumoniae présente plusieurs facteurs de virulence et de colonisation, tels que sa capsule polysaccharidique, les protéines de surface et les toxines (autolysine, neuraminidase, pneumolysine (Ply)) (Figure B). Le rôle des facteurs de virulence dans le développement des maladies n'est que partiellement élucidé. L'une des difficultés dans l'intégration du rôle de ces différents facteurs réside dans le fait que les souches de *S. pneumoniae* diffèrent dans leur capacité à les produire (Mitchell et al., 2010).

La capsule polysaccharidique est probablement le facteur de virulence le plus important du pneumocoque. La production de cette capsule est indispensable pour la virulence pneumococcique et confère à la bactérie une propriété anti-phagocytaire. Malgré que les souches non capsulées ont été associées à des infections superficielles comme la conjonctivite; les isolats cliniques des souches invasives sont généralement capsulés (Kadioglu et al., 2008). La plupart des sérotypes capsulés sont fortement chargés au pH physiologique, ce qui peut interférer avec les interactions avec les cellules phagocytaires. La capsule forme une barrière qui peut altérer le phénomène d'opsonisation; elle empêche les régions Fc des IgG ou le composant du complément iC3b (qui peut se fixer à d'autres structures plus profondes tels que les acides téchoïques et les protéines de surface) d'interagir avec leurs récepteurs sur les cellules phagocytaires (Musher et al., 1992). La capsule peut aussi réduire la quantité du complément qui se fixe à la surface bactérienne (Abeyta et al., 2003), ainsi que la capacité des « Neutrophils extracellular traps » (NETs) à bloquer les bactéries (Wartha et al., 2007) et fournir une résistance à l'autolyse induite par les antibiotiques (Fernebro et al., 2004). Suite à l'interaction entre la

capsule et les peptides antimicrobiens de la surface épithéliale, *S. pneumoniae* peut survivre en se débarrassant de sa capsule dans quelques minutes selon un processus LytA (autolysine)-dépendant (Kietzman et al., 2016). La perte de la capsule augmente l'interaction du pneumocoque avec les cellules épithéliales de l'hôte, cause probable de la maladie invasive.

La pneumolysine (Ply) est un autre facteur de virulence important de *S. pneumoniae* et a été décrite comme étant produite par la plupart des isolats cliniques pneumococciques. Elle appartient à une famille de toxines (Cholesterol-dependent cytolytic pore-forming toxins) qui entraînent la formation de pores communes à plus de 20 espèces de bactéries à Gram positif. Ply se fixe au cholestérol de la membrane et forme ensuite de larges pores par l'oligomérisation de plus de 50 monomères de la toxine (Morgan et al., 1995). Grâce à la fonction de Ply, la capacité des cellules bronchiques ciliées à éliminer le mucus des voies respiratoires inférieures est réduite, ce qui facilite la propagation de l'infection (Rayner et al., 1995; Steinfort et al., 1989). De plus, les effets cytotoxiques de Ply peuvent inhiber directement les fonctions de certaines cellules immunes comme les phagocytes, ce qui aboutit à un défaut de la réponse immunitaire de l'hôte (Rubins et al., 1998).

Le rôle de Ply dans la pathogénicité de l'infection a été étudié dans des modèles d'animaux, en utilisant des mutants de pneumocoques inactivés pour le gène de la toxine. L'absence fonctionnelle de la toxine entraîne une réduction de la virulence bactérienne (Berry et al., 1989). Suite à une infection intranasale, les souches Ply-déficientes montrent une diminution de l'inflammation au niveau des poumons, un retard et une réduction du recrutement cellulaire (Kadioglu et al., 2000), ainsi qu'une réduction de la charge bactérienne dans le nasopharynx, la trachée et les poumons (Kadioglu et al., 2002).

4. Sérotypes: Diversité, prévalence géographique et virulence associée

A ce jour, plus de 90 sérotypes de *S. pneumoniae* ont été identifiés sur la base de leur capsule polysaccharidique (Lynch et al., 2009), dont une vingtaine sont responsables à eux seuls de plus de 80% des cas de MPI (Hausdorff et al., 2005).

Dans une étude réalisée par Briles et ses collègues (Briles et al., 1992), il a été montré une forte association entre le sérotype de la capsule et la virulence de la souche. Dans les modèles expérimentaux murins, les sérotypes 1, 3, 4, 6A et 6B sont virulents alors que les sérotypes 14, 19 et 23 sont non virulents. Toutefois en clinique, une étude réalisée au Royaume-Uni (Bewick

et al., 2012) a montré que les sérotypes 1, 3, 8, 14 et 19A sont les plus fréquemment rencontrés en cas de pneumonie communautaire chez les adultes. Dans le même contexte, Cilloniz et ses collègues (Cilloniz et al., 2012) ont observé que les sérotypes 1 et 19A sont les agents prédominants de MPI chez les adultes en Espagne, alors qu'en Amérique Latine et aux Caraïbes, le sérotype 14 est le plus prévalent dans les pneumonies communautaires, suivi par les sérotypes 1 et 5 (Gentile et al., 2012).

De plus, certains sérotypes (1, 4, 5, 7F, 8, 12F, 14, 18C et 19A) sont considérés comme étant fortement invasifs, alors que d'autres (6A, 6B, 11A, 15B/C et 23F) sont généralement décrits comme l'étant moins (Brueggemann et al., 2003; Kronenberg et al., 2006; Ritchie et al., 2012; Yildirim et al., 2010). La prévalence des sérotypes est toutefois variable selon les études, probablement due aux variations géographiques et de la génétique des populations.

Au final, les sérotypes 1, 5 et 14 sont responsables d'environ 28 à 43% de la totalité des cas de MPI dans le monde (Johnson et al., 2010). En adéquation avec cela, Melin et ses collègues ont observé que la capsule des sérotypes 1 et 5 était plus résistante à l'opsonophagocytose que celle des autres sérotypes testés (Melin et al., 2010).

5. Traitement

Pendant de nombreuses années, le traitement par les antibiotiques suffisait à traiter avec succès les patients atteints d'une pneumonie induite par *S. pneumoniae*. Toutefois, l'apparition de souches de *S. pneumoniae* résistantes à la pénicilline pendant les années 1970, et leur émergence ultérieure dans le monde a profondément limité l'efficacité des antibiotiques. Plus récemment, la résistance de souches pneumococciques a été décrite pour les macrolides (Lonks et al., 2002), les fluoroquinolones (Davidson et al., 2002), la vancomycine, les triméthoprimes ainsi que d'autres agents anti-microbiens (Pallares et al., 2002).

6. Vaccination

Plusieurs vaccins ont été développés afin de lutter contre les infections pneumococciques. En 1983, un vaccin polysaccharidique à 23 valences (Pneumovax ® 23) a été mis en place. Il est constitué des 23 sérotypes capsulés les plus retrouvés dans les MPI dans les pays développés (1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F et 33F). Ce vaccin induit des réponses immunitaires médiées par les lymphocytes B (réponse anticorps),

indépendamment des lymphocytes T. Toutefois, l'efficacité de ce vaccin a été remise en cause due aux faibles taux d'anticorps retrouvés chez les personnes âgées et les enfants âgés de moins de 2 ans.

Depuis 2000, l'introduction d'un vaccin conjugué heptavalent (Pevnar[®]) dirigé contre les sérotypes 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F et 23F a montré une bonne protection chez les enfants âgés de moins de 2 ans. Ainsi l'incidence des cas de méningites à pneumocoque, pneumonies, bactériémies et otites a significativement diminué (Hsu et al., 2009; Lynch et al., 2009). Toutefois, en 2008, il a été observé que 61% des cas de MPI chez les enfants âgés de moins de 5 ans ont été attribués à des sérotypes non contenus dans le Pevnar[®]. Pour contrecarrer la réémergence de ces « anciens » sérotypes, un nouveau vaccin conjugué contenant 6 sérotypes supplémentaires (1, 3, 5, 6A, 7F et 19A), en plus des sept sérotypes de Pevnar[®] a été mis en place en 2010.

Même si l'introduction de la vaccination contre *S. pneumoniae* a permis de réduire de façon importante au niveau des MPI, des problèmes de couverture de la totalité des sérotypes ainsi que les coûts importants pour les pays en voie de développement subsistent et constituent un frein dans l'éradication de ce pathogène (Rozenbaum et al., 2011; Weinberger et al., 2011). Dans ce contexte, une meilleure connaissance de la réponse immunitaire de l'hôte contre *S. pneumoniae* est clairement nécessaire.

B. La réponse immunitaire contre *Streptococcus pneumoniae*

1. L'immunité innée

a. Les récepteurs innés ou "pattern recognition receptor" (PRR)

i. Les récepteurs de type-Toll ou "Toll-like receptor"

La fonction principale des récepteurs de type Toll (TLR) est de détecter les microbes et d'initier une réponse inflammatoire ayant pour but d'éradiquer l'infection. 10 TLRs ont été décrits chez l'Homme et 13 chez les souris (Siednienko et al., 2009). Plusieurs ont été décrits comme impliqués dans l'infection pneumococcique dans des modèles d'animaux. Des variations génétiques au niveau de la signalisation TLRs (signal IRAK4) ont été associés à une

augmentation de la susceptibilité à l'infection pneumococcique chez l'Homme (Currie et al., 2004; Picard et al., 2003).

Le TLR2 reconnaît des composants de la paroi bactérienne, tels que les acides lipotéichoïques et certaines lipoprotéines (Schmeck et al., 2006; Schroder et al., 2003). Via l'utilisation de modèles expérimentaux invasifs et de colonisation, les souris TLR2 knock-out (KO) ont montré une mortalité accrue à l'infection pneumococcique par rapport aux souris WT. Par exemple, dans un modèle de colonisation du nasopharynx, les souris TLR2 KO (TLR2^{-/-}) ont montré un défaut de clairance (van Rossum et al., 2005).

Le TLR9 reconnaît les séquences CpG non méthylées de l'ADN pneumococcique. Des souris TLR9^{-/-} étaient significativement plus susceptibles à une infection par *S. pneumoniae* sérotype IV que les souris WT, et ont présenté une réduction de leur survie, ainsi qu'un développement d'une bactériémie (Albiger et al., 2007). De plus, les TLR2 et 9 ont été suggéré comme favorisant la phagocytose du pneumocoque et sa destruction intracellulaire (Albiger et al., 2007; Letiembre et al., 2005).

En tant que bactérie à Gram positif, la paroi du pneumocoque est dépourvue de l'agoniste canonique du TLR4, le lipopolysaccharide (LPS). En revanche, la pneumolysine du pneumocoque a été montrée comme interagissant directement avec TLR4 et capable d'induire l'apoptose des cellules l'exprimant de façon TLR4-dépendante (Srivastava et al., 2005). De plus, il a été montré que, suite à une infection à *S. pneumoniae* (souche D39), des macrophages isolés de souris TLR4^{-/-} produisaient des taux moins élevés d'IL-18 (Malley et al., 2003), d'IL-1 α et d'IL-1 β (Shoma et al., 2008) en comparaison avec des macrophages provenant de souris contrôles. En plus, McNeela et ses collègues ont montré que la sécrétion d'IL-1 β induite par la Ply recombinante en combinaison avec d'autres stimuli TLR, dont *S. pneumoniae* tuée par la chaleur, ne requiert pas TLR4 (McNeela et al., 2010).

Globalement, les TLR-2, 4 et 9 jouent des rôles importants dans la défense innée contre *S. pneumoniae* (Figure C). La redondance de ces rôles est mise en évidence par la sensibilité observée chez les souris MyD88^{-/-} qui présentent une capacité abrogée à contrôler l'infection pulmonaire pneumococcique en comparaison avec les souris WT (Albiger et al., 2005).

ii. Les récepteurs de type-NOD et les inflammasomes

- *Les récepteurs de type-NOD (NLR)*

Les NLRs sont des protéines cytosoliques qui reconnaissent des microbes et des signaux de danger (Inohara et al., 2005). Les NLRs les plus caractérisés sont NOD1 et NOD2: NOD1 détecte l'acide diaminopimélique (DAP), principalement dans le peptidoglycane des bactéries à Gram négatif (Chamaillard et al., 2003; Girardin et al., 2003a), alors que NOD2 se lie au muramyl-dipeptide (MDP), le constituant majeur du peptidoglycane des bactéries à Gram positif et négatif (Girardin et al., 2003b). Ainsi, il a pu être montré *in vitro* que le pneumocoque induisait l'activation du facteur de transcription NF- κ B via le recrutement de NOD2 (Opitz et al., 2004) (Figure C). De plus, il semble que la phagocytose et la "digestion" intracellulaire de *S. pneumoniae* dans des macrophages implique l'activation de NOD2 (Davis et al., 2011). La reconnaissance du pneumocoque par NOD2 conduit à la production d'IFN de type I (Nakamura et al., 2011) ainsi que de la chimiokine CCL2, une molécule impliquée dans le recrutement de phagocytes notamment les macrophages. Dans ce contexte, il a pu être montré une synergie entre NOD2 et certains TLRs dans la clairance de pneumocoque (Davis et al., 2011). Dans un modèle de méningite à pneumocoque, les souris NOD2^{-/-} présentent une réduction de l'inflammation cérébrale (astrogliose et démyélinisation) et un maintien plus important de la barrière hémato-encéphalique associé (Liu et al., 2010a). La stimulation *in vitro* de cellules de la microglie et d'astrocytes provenant de souris NOD2^{-/-} par *S. pneumoniae* aboutit à une sécrétion réduite de facteurs inflammatoires tels que le TNF- α , l'IL-6 et la chimiokine CCL3.

- *Les inflammasomes*

Les inflammasomes sont des complexes multi-protéiques intracellulaires jouant un rôle dans la maturation et la production des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18 via l'activation de la protéase caspase-1. L'activation de ces complexes se fait via le recrutement de 5 différents récepteurs (NLRP1, NLRP3, NLRC4, AIM2 et Pyrine) capables de former des inflammasomes (Voir détails dans le chapitre "**III. L'inflammasome NLRP3**"). Au cours de l'infection par *S. pneumoniae*, il a pu être démontré que les protéines NLRP3 et AIM2 participaient à la reconnaissance de la bactérie (Figure C).

En effet, certains travaux avaient déjà démontré dans les années 2000 que la pneumolysine (Ply) bactérienne permettait d'induire la production d'IL-1 β et d'IL-18 de façon dépendante de la

caspase-1 (Koedel et al., 2002; Shoma et al., 2008). Le lien entre ces travaux pionniers et l'inflammasome a pu être établi plus récemment via l'identification de la production d'IL-1 β par des macrophages et cellules dendritiques (DCs) de façon NLRP3-dépendante en réponse à Ply (McNeela et al., 2010). L'activation de l'inflammasome NLRP3 dans ce contexte s'explique par la capacité de Ply à induire des pores au niveau de la membrane plasmique aboutissant à une réduction de la concentration cytosolique en K⁺ suffisante pour activer NLRP3 (Karmakar et al., 2015; Munoz-Planillo et al., 2013). De plus, les souris NLRP3^{-/-} sont plus sensibles que les souris contrôles dans un modèle de pneumonie à pneumocoque (McNeela et al., 2010). Dans ce modèle, NLRP3 permet un contrôle de la charge bactérienne au niveau des poumons ainsi que le maintien de la barrière alvéolo-capillaire (McNeela et al., 2010; Witzenrath et al., 2011). Il est ainsi intéressant de noter qu'un facteur de virulence de la bactérie puisse également jouer un rôle dans le développement de la réponse antibactérienne de l'hôte. Dans des modèles expérimentaux de méningites à pneumocoque, NLRP3 semble plutôt jouer un rôle délétère car les souris NLRP3-déficientes affichent une pathologie moins sévère (histologie) et un score clinique réduit (Hoegen et al., 2011). Enfin plus récemment, dans un modèle de kératite à *S. pneumoniae*, le laboratoire d'Eric Perlman a montré le rôle crucial de l'IL-1 β produit par l'inflammasome NLRP3 dans la clairance du pathogène (Karmakar et al., 2015; Karmakar et al., 2016).

Il est également possible que d'autres inflammasomes jouent un rôle dans la reconnaissance de *S. pneumoniae*. En effet, les macrophages NLRP3^{-/-} infectés par le pneumocoque étant toujours capables de produire des quantités détectables d'IL-1 β , il est possible que d'autres inflammasomes entrent en jeu dans cette synthèse cytokinique. En accord avec cette hypothèse, des souris déficientes pour un adaptateur commun de la plupart des inflammasomes (ASC) montrent une susceptibilité accrue aux souris contrôles et NLRP3^{-/-} dans un modèle de pneumonie à *S. pneumoniae* (Fang et al., 2011; Koppe et al., 2012).

Parmi les autres inflammasomes ASC-dépendants pouvant jouer un rôle dans l'infection pneumococcique, AIM2 semble être un candidat intéressant. En effet, Fang et ses collègues ont montré que des macrophages provenant de souris déficientes pour ASC présentent une diminution significative de l'activation de caspase-1 ainsi que la sécrétion d'IL-1 β et d'IL-18 en réponse à *S. pneumoniae* (Fang et al., 2011). Les mécanismes moléculaires responsables de l'assemblage de l'inflammasome AIM2 au cours d'une infection à pneumocoque sont à ce jour inconnus. Toutefois, AIM2 reconnaissant principalement des motifs d'ADN double brin, il est

possible qu'une fois libérées dans le phagosome, certaines toxines bactériennes dont Ply puissent entraîner la formation de pores et la déstabilisation de la membrane phagosomale, aboutissant à la libération d'ADN bactérien dans le cytoplasme, et l'activation d'AIM2.

Étant donné l'importance de l'IL-1 β et de l'IL-18 dans la défense de l'hôte contre le pneumocoque (Lauw et al., 2002; Zwijnenburg et al., 2003), il est très important de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires qui régulent l'activité des inflammasomes au cours de l'infection par *S. pneumoniae*.

b. Les acteurs cellulaires de l'immunité innée

Au niveau des muqueuses, les cellules de l'immunité innée ont pour rôle principal de contenir les pathogènes grâce à différentes populations présentant des spécialités fonctionnelles comme la phagocytose (macrophages et neutrophiles) ou la production de médiateurs solubles capables de réguler la réponse immunitaire (cellules NK). Ainsi, de part leur fonctions précoces, les cellules de l'immunité innée permettent à l'hôte de gagner du temps afin de développer, si besoin, une défense spécifique et adaptée au pathogène.

i. Les macrophages alvéolaires

Les macrophages alvéolaires (AMs) sont localisés dans les espaces aériens pulmonaires profonds et ainsi représentent la première ligne de défense cellulaire contre les microbes (Sibille et al., 1990). Ils jouent un rôle critique dans la défense de l'hôte et le remodelage tissulaire (Lambrecht et al., 2006). Les AMs expriment de nombreux PRRs pouvant reconnaître des PAMPs à la surface des micro-organismes tels que des toxines et des polysaccharides (Krutzik et al., 2004). Dans des modèles expérimentaux de pneumonies à pneumocoques, les AMs sont capables de contrôler l'infection jusqu'à un certain niveau et ainsi sont capables à eux seuls de prévenir le développement de la pathologie (Dockrell et al., 2003; Knapp et al., 2003). La déplétion spécifique des AMs (souris transgéniques ou traitement avec des liposomes contenant du chlodronate) augmente la susceptibilité des animaux à la pneumonie (Bewley et al., 2011; Marriott et al., 2007). L'activité antibactérienne des AMs s'explique en grande partie par leur grande capacité à phagocyter le pathogène. Si l'opsonisation des bactéries facilite la phagocytose

par les AMs, la présence de la capsule polysaccharidique du pneumocoque limite de façon très importante ce mode d'élimination. Toutefois, la phagocytose contre *S. pneumoniae* peut s'effectuer indépendamment de l'opsonisation. Dans ce contexte, les « scavenger receptors » MARCO et SRAI/II jouent un rôle très important dans la phagocytose du pneumocoque pas les AMs (Arredouani et al., 2004; Arredouani et al., 2006). En effet, les AMs déficients en MARCO ont une capacité réduite à phagocyter *S. pneumoniae*. De même, la clairance bactérienne du pneumocoque est fortement réduite chez des souris MARCO^{-/-}.

Toutefois lorsque la capacité seuil des AMs à phagocyter est atteinte, ces dernières sont capables de jouer des rôles accessoires permettant de réguler la réponse inflammatoire anti-pneumococcique. En effet, grâce à leur capacité à produire de l'IL-1 β , les AMs induisent la synthèse de molécules chimio-attractantes (CXCL8) par les cellules épithéliales capables de recruter d'autres cellules inflammatoires comme les polynucléaires neutrophiles (Marriott et al., 2012). De plus, les AMs permettent de réguler l'inflammation au travers de leur capacité à induire l'apoptose et éliminer ces cellules apoptotiques (macrophages et neutrophiles) grâce à un mécanisme appelé « efferocytose » (Dockrell et al., 2001). Les AMs ont également la capacité d'interagir avec les lymphocytes T conventionnels afin d'augmenter la clairance du pneumocoque (Dockrell et al., 2012). Ces mécanismes de régulation négatifs sont très importants dans les phases de résolution de l'inflammation et permettent de limiter les dégâts tissulaires pouvant être causés par l'hyper-inflammation dépendante des neutrophiles.

ii. Les neutrophiles

Les polynucléaires neutrophiles sont des cellules douées d'une activité bactéricide importante et ont évolué afin de disposer d'un arsenal de stratégies et de mécanismes divers afin de combattre au mieux les infections. Les neutrophiles sont des cellules effectrices terminales ayant une durée de vie relativement courte. En conditions homéostatiques, les neutrophiles ne représentent qu'une faible proportion des cellules immunitaires du poumon (< 2% dans les lavages broncho-alvéolaires). Toutefois ces dernières sont capables d'être très rapidement recrutées au site infectieux notamment grâce à leur séquestration importante dans les capillaires pulmonaires (Yoshida et al., 2006). Comme indiqué précédemment, dans le cas de figure où les AMs sont incapables de contrôler l'infection à *S. pneumoniae*, les neutrophiles sont rapidement mobilisés et jouent un rôle prépondérant dans l'élimination du pathogène. Le rôle fondamental des

neutrophiles dans l'infection par *S. pneumoniae* a été observé il y a une vingtaine d'années par des expériences montrant que (i) la déplétion sélective des neutrophiles entraîne un défaut important dans la clairance de la bactérie dans les poumons et que (ii) le transfert adoptif de neutrophiles dans des souris neutropéniques restaure la défense de l'hôte (Garvy et al., 1996).

L'activité bactéricide des neutrophiles repose sur la capacité à phagocyter les bactéries mais aussi grâce à la sécrétion d'un large panel d'enzymes lytiques. Ces deux mécanismes sont associés car une fois encapsulés dans les phagosomes, les neutrophiles peuvent tuer les bactéries via des mécanismes oxydatifs (production d'espèces réactives de l'oxygène) ou via la libération de protéines antibactériennes (cathepsines, défensines, lactoferrine et lysozyme) contenues dans les granules du neutrophile. Plus récemment, il a été démontré que les neutrophiles pouvaient éliminer certains pathogènes extracellulaires comme *S. pneumoniae* en libérant des structures appelées NETs (Brinkmann et al., 2004). Ils sont composés de filaments d'ADN sur lesquels sont attachés des histones, des protéines (cathepsines et lactoferrine) et des enzymes (élastase et myéloperoxydase) provenant des granules neutrophiliques (Brinkmann et al., 2004). Ainsi, les NETs permettent d'immobiliser les pathogènes et donc de limiter la propagation de la bactérie mais aussi de faciliter la phagocytose des bactéries piégées. De plus, les NETs seraient également capables de tuer certaines bactéries grâce aux histones et protéases présentes sur ces structures (Phillipson et al., 2011). Toutefois, ce dernier mécanisme ne peut être mis en jeu au cours de l'infection pneumococcique via l'activité endonucléasique d'une protéine de *S. pneumoniae* (EndA) capable de cliver les NETs et permettre la libération des bactéries (Beiter et al., 2006).

Une fois leur activité antibactérienne réalisée, l'activité des neutrophiles doit être finement régulée afin de limiter la réponse inflammatoire. En effet, une fois activés, les neutrophiles augmentent leur durée de vie et continuent ainsi à libérer des médiateurs inflammatoires comme certains radicaux libres capables d'induire des dommages tissulaires importants. De plus, lorsque les neutrophiles en fin de vie entrent en nécrose, cette dernière s'accompagne de la sécrétion des granules pouvant également créer davantage de dégâts tissulaires. Cette activation incontrôlée des neutrophiles peut aboutir à des complications fatales au cours des pneumonies à pneumocoque comme le syndrome de détresse respiratoire aiguë (Williams et al., 2014).

A côté de leur activité antibactérienne directe, des évidences récentes suggèrent que les neutrophiles sont capables de produire un large éventail de médiateurs inflammatoires comme

des cytokines et/ou des chimiokines suggérant que ces cellules pourraient également jouer des fonctions accessoires relevantes en régulant les fonctions d'autres populations immunes (Mantovani et al., 2011). Dans ce contexte, de part leur nombre abondant suite à l'infection pneumococcique, il serait intéressant de mieux étudier cet aspect fonctionnel des neutrophiles pour le moment sous-évalué.

iii. Les cellules Natural Killer

Les cellules Natural Killer (NK) sont des lymphocytes innés cytotoxiques connus pour produire une fraction importante d'IFN- γ au cours des infections par des bactéries à Gram positif (Dunn et al., 1991). Les cellules NK sont très rapidement recrutées dans les poumons à la suite d'une infection à *S. pneumoniae* (Kawakami et al., 2003). L'activation des cellules NK repose sur la reconnaissance sur l'effet stimulateur de l'IL-12p70 et de l'IL-18 (Chaix et al., 2008; Monteiro et al., 1998) et aboutit à la production d'IFN- γ . Les cellules NK ont été montrées comme étant la source majeure d'IFN- γ dans un modèle de méningite à *S. pneumoniae* (Mitchell et al., 2012). Cette production est dépendante de l'IL-18 produite de façon dépendante de ASC (Mitchell et al., 2012). Toutefois les auteurs de cette étude n'ont pas identifié le récepteur responsable de l'assemblage de cet inflammasome ASC-dépendant. De plus, une déplétion en IFN- γ dans ce modèle suggère que les cellules NK permettent le recrutement d'autres cellules effectrices telles que les monocytes de façon CCL2 dépendante (Mitchell et al., 2012). Les cellules NK étant connues pour dialoguer avec de nombreux partenaires cellulaires jouant un rôle prépondérant dans la réponse anti-pneumococcique tels que les DCs, les macrophages et les neutrophiles, il serait intéressant d'étudier si ces interactions cellulaires sont mises en place dans la réponse de l'hôte contre *S. pneumoniae*. Les travaux du groupe de Porgador ont ainsi récemment démontré que l'activation des cellules NK via NKp46 pouvait augmenter l'activité effectrice des AMs. De plus, des souris déficientes pour le gène *Ncr1* codant pour NKp46 montrent une susceptibilité accrue dans un modèle de pneumonie à *S. pneumoniae* (Elhaik-Goldman et al., 2011). Toutefois, les ligands de NKp46 mis en jeu au cours de l'infection par le pneumocoque restent à découvrir mais ne semblent pas être dus à des composants structuraux de la bactérie.

Bien que jouant globalement un rôle bénéfique dans l'infection pneumococcique, une étude a toutefois pu démontrer que celles-ci pouvaient contribuer à la physiopathologie dans un modèle d'infection à pneumocoque chez des animaux immuno-déprimés (Kerr et al., 2005). Cet effet

pourrait s'observer dans un contexte où l'activité des cellules NK ne serait plus régulée et aboutirait à une amplification néfaste de l'inflammation locale (poumon) et systémique.

iv. Les « innate lymphoid cells » de type 3

Les « innate lymphoid cells » de type 3 (ILC3) constituent une population lymphocytaire innée s'activant en réponse à des cytokines inflammatoires pour sécréter des cytokines de la famille IL-17 (IL-17A et IL-22). Leur fonction dans la défense de l'hôte contre les microbes et la réparation tissulaire au niveau de la muqueuse intestinale a déjà été décrite (Spits et al., 2013). De façon intéressante, notre laboratoire a pu démontrer la présence d'ILC3 dans la muqueuse pulmonaire (Van Maele et al., 2014). Au cours de l'infection par le pneumocoque, les ILC3 pulmonaires sont la source majoritaire d'IL-22 (Van Maele et al., 2014). Toutefois, la relevance physiologique de cette production cytokinique par les ILC3 reste encore à démontrer.

2. L'immunité adaptative

a. Les lymphocytes T conventionnels

Les cellules T CD8⁺ sont connues pour jouer un rôle dans la défense de l'hôte contre les microbes via la production d'IFN- γ et/ou les effets cytotoxiques médiés par la sécrétion de perforines et granzymes. Même si les lymphocytes T CD8⁺ jouent principalement un rôle dans l'éradication des bactéries intracellulaires, elles sont importantes dans la résistance contre une infection létale par *S. pneumoniae* (Weber et al., 2011). En effet, la déplétion en lymphocytes T CD8⁺ chez des souris infectées par le pneumocoque provoque une réduction de la réponse inflammatoire pulmonaire et une augmentation de la dissémination bactérienne (Weber et al., 2011).

Les cellules T CD4⁺ jouent également un rôle dans la résistance à la colonisation bactérienne en favorisant le recrutement neutrophilique et la clairance bactérienne par les cellules Th17 CD4⁺ (Kadioglu et al., 2004). L'utilisation de souris déficientes en lymphocytes T CD4⁺ a permis de mettre en évidence le rôle de ces dernières dans la clairance du pneumocoque au niveau du nasopharynx dans un modèle de colonisation (van Rossum et al., 2005). De plus, il a été montré que la Ply participait à la clairance bactérienne dépendante des cellules T CD4⁺ (van Rossum et

al., 2005). Grâce à l'utilisation de souches mutantes déficientes en Ply, son rôle dans la migration des lymphocytes T CD4⁺ vers le site infectieux a pu être formellement démontré. De plus, les lymphocytes T CD4⁺ activés peuvent réguler positivement à leur surface des molécules co-stimulatrices capables de générer des signaux positifs ou négatifs pour les lymphocytes B. Cette fonction d'"aide" médiée par les lymphocytes T CD4⁺ stimule la différenciation des cellules B en cellules plasmiques sécrétrices d'immunoglobulines (Igs) (MacLennan et al., 2003).

b. Les lymphocytes B

La fonction principale des lymphocytes B est bien sûr la production d'Igs. De façon naturelle au niveau des muqueuses, les lymphocytes B sécrètent des IgA qui constituent une des premières lignes de défense contre les pathogènes et toxines associées. La synthèse d'IgA se fait essentiellement indépendamment des lymphocytes T et requière des signaux solubles (BAFF et APRIL) produits par certaines sous-populations de DCs ou les cellules épithéliales. L'effet protecteur des IgA s'explique par (i) leur capacité à empêcher par gêne stérique l'association entre les pathogènes et certains motifs d'ancrage à l'épithélium respiratoire et (ii) leur capacité à former avec les bactéries commensales des bio-films empêchant la colonisation bactérienne. En effet, l'infection de souris déficientes en IgA par *S. pneumoniae* résulte en une charge bactérienne augmentée par rapport aux souris sauvages contrôles (Fukuyama et al., 2010) malgré un taux d'IgG spécifique important. Chez l'homme, la présence d'IgA spécifique anti-pneumocoque peut être rapidement détectée dans la sphère ORL à la suite d'une infection à pneumocoque (Wright et al., 2012).

Certaines autres classes d'Ig peuvent neutraliser la bactérie (opsonisation) et empêcher sa fixation sur ses cibles cellulaires, favorisant ainsi sa phagocytose (Cohen et al., 2011). Les antigènes bactériens polysaccharidiques de la capsule de *S. pneumoniae*, peuvent atteindre les organes lymphoïdes secondaires et se lier à la zone marginale des cellules B, via une réaction entre les structures répétées de la capsule polysaccharidique et les récepteurs d'Igs à la surface des cellules B (MacLennan et al., 2003). Toutefois, les vaccins polysaccharidiques sont généralement connus pour induire une réponse immunitaire indépendante des cellules T caractérisée par l'induction de faibles taux d'anticorps et l'absence de mémoire immunitaire, raison probable pour laquelle les vaccins polysaccharidiques sont faiblement immunogéniques chez les enfants (Timens et al., 1989). Bien que l'immunité humorale joue un rôle important dans

la défense de l'hôte contre les bactéries extracellulaires via la production d'anticorps, des études ont suggéré que les cellules T sont suffisantes pour induire l'immunité contre le pneumocoque selon un mécanisme indépendant de la production d'anticorps (Malley et al., 2005).

Toutefois, la production d'anticorps n'est pas la seule fonction relevante attribuable aux lymphocytes B au cours de la réponse anti-pneumococcique. En effet les lymphocytes B sont également capables de produire des cytokines inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-6 et l'IL-1 β en réponse au pneumocoque (Ku et al., 2007). Les cellules B peuvent également activer le système du complément au cours de l'infection pneumococcique grâce à l'expression des récepteurs au complément CD21 et CD35 (Carrol et al., 2004).

3. Les cellules de l'immunité dite "transitionnelle"

a. Les lymphocytes T Natural Killer

Les lymphocytes T Natural Killer (NKT) représentent une population hétérogène de lymphocytes T capables de s'activer rapidement et de produire des quantités importantes de cytokines immuno-modulatrices de type Th1, Th2 et Th17 (Bendelac et al., 2007; Cerundolo et al., 2009; Godfrey et al., 2004). Toutefois à la différence des lymphocytes T conventionnels, les cellules NKT ne reconnaissent pas des Ags peptidiques mais des molécules longtemps considérées par les immunologistes peu immunogènes, les lipides et plus particulièrement les glycolipides (Kinjo et al., 2011). Ces Ags d'origine lipidique sont présentés au TCR des cellules NKT par l'intermédiaire d'une molécule monomorphe apparentée au CMH de classe I, la molécule CD1d. CD1d est exprimé de façon ubiquitaire par les cellules immunes et notamment les cellules présentatrices d'Ag professionnelles comme les DCs. Via cette capacité à produire rapidement ces cytokines, les cellules NKT permettent l'amplification et/ou la régulation des réponses immunitaires innée/adaptative en induisant notamment la maturation des DCs (Chung et al., 2004; Fujii et al., 2003) et en agissant sur les cellules NK (Carnaud et al., 1999), les macrophages (Nieuwenhuis et al., 2002), les lymphocytes T $\gamma\delta$ (Paget et al., 2012), les lymphocytes T conventionnels CD4⁺ et CD8⁺ (Singh et al., 1999; Stober et al., 2003) et les lymphocytes B (Galli et al., 2007).

Dans ce contexte, plusieurs études ont montré que l'infection de souris déficientes en cellules NKT de type I (souris J α 18^{-/-}) par *S. pneumoniae* a entraîné un défaut de la clairance bactérienne

des poumons et une diminution de la survie des souris (Ivanov et al., 2012; Kawakami et al., 2003; Nakamatsu, 2007). Cet effet protecteur semble être principalement dû à la production d'IFN- γ par ces dernières. Les modalités d'activation des cellules NKT au cours de l'infection par *S. pneumoniae* reste à ce jour assez controversées. Si l'importance de l'IL-12 produite par les cellules présentatrices d'Ag dans la sécrétion d'IFN- γ par les cellules NKT est plutôt bien admise (Arora et al., 2014; Barthelemy et al., 2016; Brigl et al., 2011), l'importance de ligands lipidiques portés par la bactérie reste débattue. En effet, si le groupe de M. Kronenberg a mis en évidence la présence de diacylglycérol dans la paroi bactérienne capable d'activer les cellules NKT de façon CD1d-dépendante (Kinjo et al., 2011), les résultats de notre laboratoire suggère que l'activation *in vivo* des cellules NKT se fait de façon CD1d-indépendante (Barthélémy et al., 2016). Les raisons de cette différence ne sont à l'heure pas connues mais la différence de sérotypes utilisés entre les deux études (sérotipe 3 vs sérotipe 1) pourrait en partie expliquer ce phénomène. De plus, il n'est pas clair si le glycolipide contenu dans la paroi bactérienne soit accessible et en quantité suffisante pour être chargé dans la poche hydrophobe de la molécule CD1d et présenté aux cellules NKT. De plus, l'activation exogène par un puissant ligand spécifique des cellules NKT (l' α -galactosylceramide) permet de protéger les souris dans un modèle de pneumonie à *S. pneumoniae* (Ivanov et al., 2012; Nakamatsu et al., 2007). Cet effet protecteur est dépendant de l'IFN- γ , de l'IL-17A et d'un recrutement important de neutrophiles (Ivanov et al., 2012).

En plus de leur capacité à produire des cytokines, les cellules NKT semblent également jouer un rôle dans la réponse anti-pneumocoque en assistant les lymphocytes B dans leur production d'Igs spécifiques (Kobrynski et al., 2005; Miyasaka et al., 2013). Chez l'homme, une étude a d'ailleurs démontré une corrélation positive entre le taux de cellules NKT circulantes et l'efficacité de vaccination en réponse au vaccin polysaccharidique à 23-valence Pneumovax® (Miyasaka et al., 2012). Sur cette base, plusieurs équipes tentent actuellement d'augmenter l'efficacité vaccinale en incorporant à la formulation vaccinale des ligands spécifiques des cellules NKT. Cette approche a déjà permis d'obtenir une augmentation de la durée de vie des lymphocytes B mémoires et une meilleure commutation isotypique (Bai et al., 2013; Deng et al., 2014). D'autres approches devraient être ainsi encouragées afin de profiter de cette fonction « helper » unique des cellules NKT et développer de nouvelles stratégies vaccinales basées sur l'activité de ces cellules dans des protocoles de vaccinations anti-pneumocoque.

b. Les lymphocytes T invariants associés aux muqueuses

Les lymphocytes T invariants associés aux muqueuses (MAIT) sont des lymphocytes T non conventionnels qui représentent entre 1% et 10% des cellules T dans la circulation périphérique chez les humains (Treiner et al., 2003). Elles sont également retrouvées au niveau du foie, de l'intestin et des poumons (Martin et al., 2009). Chez la souris, les cellules MAIT murines sont localisées aussi au niveau des tissus lymphoïdes et muqueuses mais leur fréquence est beaucoup plus faible que chez l'homme (Tilloy et al., 1999). Le TCR invariant des cellules MAIT est restreint aux antigènes présentés par la molécule MR1 (Treiner et al., 2003). Récemment il a pu être montré que les Ags reconnus par les TCR des cellules MAIT sont des dérivés de la synthèse de la vitamine B2 (riboflavine) (Kjer-Nielsen et al., 2012). A la différence des mammifères, certains micro-organismes possèdent la machinerie enzymatique pour produire ces métabolites activateurs suggérant que les MAIT ont probablement une fonction antimicrobienne importante.

Autre que la stimulation médiée par le TCR, les cytokines (IL-12, IL-1 β , IL-23) peuvent amplifier l'activation des cellules MAIT (Chiba et al., 2012; Chua et al., 2012). Ainsi, les cellules MAIT murines et humaines s'activent quand les cellules de l'hôte s'infectent par certaines bactéries et levures, mais pas par les virus (Gold et al., 2010; Le Bourhis et al., 2010; Le Bourhis et al., 2013). Cette activation est MR1-dépendante, et entraîne la production de TNF- α et d'IFN- γ . Via la sécrétion d'IFN- γ , les cellules MAIT peuvent inhiber efficacement la croissance du BCG dans les macrophages (Chua et al., 2012).

Le mécanisme d'activation et les fonctions des cellules MAIT durant l'infection pneumococcique sont à l'heure actuelle totalement inconnus. Cependant certaines analyses génomiques ont pu démontrer que de nombreux sérotypes de *S. pneumoniae* semblent posséder l'artillerie enzymatique nécessaire à la synthèse de ligands MR1 activateurs des cellules MAIT (Lanie et al., 2007). Par ailleurs les streptocoques du groupe A semblent être dépourvus de cette voie de biosynthèse (Beres et al., 2002; Ferretti et al., 2001) et ne sont pas capables d'activer les MAIT (Le Bourhis et al., 2010). Ainsi au regard des fonctions des cellules MAIT (notamment la production de cytokine comme l'IFN- γ et l'IL-17A) et leur grande représentation chez l'homme, l'étude de ces cellules lors de la réponse anti-pneumococcique devrait être fortement encouragée.

II. Les lymphocytes T gamma-delta

A. Découverte et place des lymphocytes T $\gamma\delta$ au sein de l'immunité

A la différence des autres populations de lymphocytes T non conventionnels (NKT et MAIT) dont la découverte reste relativement récente, la première description d'une population lymphocytaire exprimant un « T cell receptor » (TCR) différent du TCR $\alpha\beta$ des lymphocytes T conventionnels date de plus de 30 ans (Borst et al., 1984). Initialement référencé sous le nom de TCR T3, le laboratoire du Pr. M. Krangel définit pour la première fois sous le nom de « lymphocytes T $\gamma\delta$ », une population de lymphocytes humains exprimant le TCR T3 en absence d'expression d'un TCR $\alpha\beta$ (Brenner et al., 1986). Dans un contexte international où les immunologistes cherchent à distinguer des lignées et sous-populations de leucocytes homogènes, un engouement très rapide se met en place autour de cette population alternative de lymphocytes T. Toutefois cette frénésie intellectuelle naissante pour les lymphocytes T $\gamma\delta$ s'essouffle peu à peu avec le temps essentiellement lorsque la communauté scientifique associe des fonctions biologiques souvent redondantes avec les lymphocytes T $\alpha\beta$.

Toutefois, un regain d'intérêt pour ces cellules est apparu au cours de cette dernière décennie. Une multitude d'études ont ainsi étudié, chez l'homme ou dans des modèles d'animaux, le rôle des lymphocytes T $\gamma\delta$ dans de nombreux types de réponses immunes amenant son lot de controverses par rapport aux travaux pionniers et de nouveaux concepts parfois difficile à intégrer philosophiquement pour une telle population lymphocytaire.

Le système immunitaire est souvent présenté comme une entité séparée en un système immunitaire inné et un système immunitaire adaptatif. Sur cette base archaïque, il est difficile de concevoir que la réponse immunitaire puisse être un continuum. En effet, il devient de plus en plus difficile de rester figer sur ce dogme centenaire et rigide. Si les acteurs cellulaires propres à l'immunité innée ou adaptative possèdent des caractéristiques distinctes et non redondantes les unes des autres, il existe une troisième « famille » de leucocytes « hybrides » partageant à la fois des caractéristiques et phénotypes de cellules innées et adaptatives. Ainsi ces cellules permettent d'établir un lien concret entre l'immunité innée et adaptative. Ces lymphocytes T dits « non conventionnels » (NKT, $\gamma\delta$ T et MAIT) forment ainsi un troisième « système » parfois appelé immunité transitionnelle (Figure D).

B. Développement et sélection thymique des lymphocytes T $\gamma\delta$

A la différence des lymphocytes T $\alpha\beta$, nos connaissances sur le développement des lymphocytes T $\gamma\delta$ sont relativement limitées et controversées (Ciofani et al., 2010; Lee et al., 2010). L'une des explications est que ce processus semble beaucoup plus complexe. De plus, l'hétérogénéité de la population $\gamma\delta$ provient de processus de développement nécessitant des signaux différents.

1. Ontogénie et programmation fonctionnelle des lymphocytes T $\gamma\delta$

A l'instar des lymphocytes T conventionnels $\alpha\beta$, les lymphocytes T $\gamma\delta$ se développent dans la grande majorité des cas dans le thymus à partir de précurseurs hématopoïétiques communs avant leur migration vers la périphérie. L'ontogénie de ces cellules débute avant celle des lymphocytes T $\alpha\beta$. En effet les lymphocytes T $\gamma\delta$ représentent la majorité des lymphocytes T durant la vie fœtale. Chez la souris, leur développement s'effectue par vagues successives lors des derniers jours de la vie embryonnaire. Ces vagues se caractérisent par l'émergence de sous-populations de lymphocytes T $\gamma\delta$ présentant des TCR particuliers et invariants ($V\gamma 5^+$ (E13) puis $V\gamma 6^+$ (E14)) (Carding et al., 2002) (Figure E). Ces populations vont ensuite peupler spécifiquement certains tissus de l'organisme dans lesquels elles joueront des fonctions précises que nous détaillerons par la suite (Chapitre II.D).

Ce phénomène particulier pourrait s'expliquer par la mise en place très tôt d'une programmation fonctionnelle précise conférant à ces cellules des activités « innate-like ». Longtemps controversée, cette hypothèse a été étayée ces dernières années par des études suggérant que l'intensité des signaux reçus par les TCR $\gamma\delta$ au cours de leur développement thymique influence leur devenir fonctionnel (Haas et al., 2012; Jensen et al., 2009; Turchinovitch et al., 2011). Dans ce contexte, il est à noter que les lymphocytes T $\gamma\delta$ producteurs d'IL-17 ($\gamma\delta T17$) acquièrent cette propriété avant même le réarrangement de leur TCR, suggérant que l'acquisition d'un tel phénotype intervient de façon TCR indépendante (Haas et al., 2012). Toutefois, d'autres études seront nécessaires afin de comprendre précisément les mécanismes moléculaires mis en place dans la programmation fonctionnelle de certaines populations de lymphocytes T $\gamma\delta$ murines.

Durant la période du post-partum, des lymphocytes T $\gamma\delta$ présentant des TCRs plus variés apparaissent comme les $V\gamma 1V\delta 6$ au niveau du foie, de la rate, du thymus et du sang ou bien les

V γ 4V δ 4 dans les ganglions lymphatiques. Ces 2 populations commencent leur développement autour de E16. D'autres populations telles que V γ 7 se développent elles probablement dans la muqueuse intestinale après la naissance (Hayday et al., 2008).

Chez l'Homme aussi, le réarrangement des chaînes de TCR γ et δ intervient au cours de la vie embryonnaire (dès la 8^{ième} semaine de développement fœtal dans le thymus et le foie fœtal). Toutefois ce processus est uniquement restreint à certaines régions variables comme V γ 8, V γ 9, V γ 11 et V δ 2 (Catros et al., 2010). Au cours du dernier trimestre de grossesse, tout comme chez la souris, une première vague de lymphocytes T $\gamma\delta$ migre vers la périphérie (foie, sang et épithéliums) pour notamment former le répertoire V γ 9V δ 2, la population majeure de lymphocytes T $\gamma\delta$ dans le sang circulant chez l'adulte (50-90% des $\gamma\delta$ circulants). Après la naissance, d'autres réarrangements apparaissent faisant intervenir d'autres chaînes telles que V δ 1 et V δ 3. Ces dernières populations colonisent plutôt les tissus et notamment les épithéliums (Kalyan et al., 2013).

Dans le cas des cellules T $\alpha\beta$, le développement thymique se caractérise par des sélections positives puis négatives induits par des ligands endogènes, qui détermineront l'antigénécité des lymphocytes T $\alpha\beta$ et leur engagement vers la lignée CD4⁺ ou CD8⁺. Au contraire, la rencontre de ligands n'est pas requise pour la maturation des lymphocytes T $\gamma\delta$. En effet, les lymphocytes T $\gamma\delta$ constituent une population de cellules effectrices innées ne nécessitant, qu'à certaines exceptions, ni sélection positive, ni sélection négative TCR dépendante.

2. Sélection positive de certaines sous-populations de lymphocytes T $\gamma\delta$

a. Les lymphocytes T V γ 9V δ 2 humains

Comme énoncé précédemment, la population V γ 9V δ 2 représente la grande majorité du pool $\gamma\delta$ dans le sang circulant mais aussi des lymphocytes T circulants (jusqu'à 5-6 % des CD3⁺). L'une des hypothèses à cette observation pourrait résulter d'une sélection périphérique post-natale de ces cellules (Bonneville et al., 2006), une hypothèse confortée par l'apparition très rapide chez le nourrisson de marqueurs mémoires sur cette population. Il reste à comprendre quels sont les éléments responsables de cette acquisition rapide d'un phénotype effecteur mémoire. Le fait qu'environ la moitié des V γ 9V δ 2 présents dans du sang de cordon expriment ces marqueurs suggère que l'apparition de ce phénotype est due à un contact chronique de ces cellules avec des

ligands endogènes dans les stades très précoces du développement prénatal plutôt qu'une stimulation par des signaux environnementaux répétés (De Rosa et al., 2004). De plus, on retrouve chez 60% de ces cellules en périphérie des réarrangements V(D)J conservés (segment J γ P), un phénotype non observé chez leurs analogues thymiques (Davodeau et al., 1993). D'ailleurs la présence de ces motifs conservés est probablement liée à la reconnaissance de certains phosphoantigènes (PAgs) responsables de leur sélection TCR dépendante en périphérie. Récemment la découverte chez l'Homme de l'importance d'une molécule de la famille des butyrophilines (BTN3A) comme intermédiaire de reconnaissance entre les PAgs et l'activité des LT V γ 9V δ 2 (Harly et al., 2012) pourrait suggérer un rôle central de BTN3A comme « molécule présentatrice d'Ag » dans la sélection positive des V γ 9V δ 2.

b. Les « Dendritic Epidermal T Cells » murines : V γ 5V δ 1⁺

Les DETCs constituent la première population de lymphocytes T $\gamma\delta$ murins émigrant du thymus pour coloniser la périphérie. Cette population possède un tropisme spécifique pour l'épiderme où elle constitue près de 90% des lymphocytes T résidents (Bergstresser et al., 1985) qui seront maintenues pendant la totalité de la vie de l'animal après leur émigration du thymus et expansion au niveau de la peau (Havran et al., 1990; Tigelaar et al., 1995).

La non-expression de butyrophilines chez la souris suggère un mode de sélection différent pour les lymphocytes T $\gamma\delta$ murins. De façon intéressante, la découverte de l'existence de molécules apparentées aux butyrophilines chez la souris a permis de mieux comprendre la sélection thymique des DETCs. En effet, Skint1, une molécule apparentée à la famille des butyrophilines, est nécessaire à la sélection de ces dernières (Barbee et al., 2011; Boyden et al., 2008). L'engagement de Skint1 par les V γ 5V δ 1 thymiques conduit à l'activation d'un mécanisme dépendant du régulateur transcriptionnel Egr3 et aboutissant à l'acquisition de la capacité à produire de l'IFN- γ et la suppression de facteurs de transcription impliqués dans la réponse IL-17 tels que Sox13 et ROR γ t (Turchinovich et al., 2011). Toutefois, d'autres molécules non liées phylogénétiquement aux butyrophilines semblent jouer un rôle dans la détermination thymique de la capacité des lymphocytes T $\gamma\delta$ à produire un spectre particulier de cytokines comme les DETCs. En effet, l'engagement de la molécule CD70 par les T $\gamma\delta$ exprimant CD27 leur confère la capacité de produire de l'IFN- γ via l'induction de l'expression du récepteur à la lymphotoxine β (Ribot et al., 2009). A l'inverse, une absence d'interaction conduit à l'apparition d'un profil de

cellules productrices d'IL-17 (Ribot et al., 2009). Une observation qui pourrait également s'avérer vraie chez l'Homme notamment pour les V γ 9V δ 2 (DeBarros et al., 2011).

La découverte d'analogues fonctionnels et structuraux de la butyrophiline chez la souris permet ainsi d'ouvrir un champ de recherche intéressant pour mieux comprendre le développement des $\gamma\delta$ T murins notamment les sous-populations exprimant des TCR invariants. Par exemple, une étude récente a démontré que le complexe hétérodimérique formé par les « butyrophiline-like » Btl1 et Btl6 régule l'expansion locale d'une population de $\gamma\delta$ T invariante (V γ 7V δ 4) et résidant dans les épithéliums du tractus digestif (Lebrero-Fernandez et al., 2016).

C. Topologie du TCR $\gamma\delta$ et reconnaissance antigénique

1. Structure et stœchiométrie du complexe TCR $\gamma\delta$ /CD3

Tout comme les LT $\alpha\beta$, le TCR des lymphocytes T $\gamma\delta$ est composé d'un hétérodimère et d'un complexe assurant la transduction du signal consistant en un dimère de CD3 (CD3 $\gamma\epsilon$ et/ou CD3 $\delta\epsilon$) et d'un homodimère TCR ζ . Ce TCR est important dans le développement de ces populations ainsi que la maintenance du pool cellulaire en périphérie et, dans certains cas, leur différenciation en cellules effectrices et mémoires au cours des réponses immunes. Ces TCR sont générés suite à la recombinaison somatique de gènes codant pour les régions variables (V), de diversité (D), de jonction (J) et les régions constantes (C). Toutefois, le nombre des segments V, D et J est plus limité pour les LT $\gamma\delta$ que pour leurs homologues $\alpha\beta$. Généralement, les populations $\gamma\delta$ sont nommées en fonction de leurs régions V du TCR.

Toutefois, la stœchiométrie du TCR $\gamma\delta$ semble différer du TCR $\alpha\beta$. Plus précisément, alors que les TCR $\alpha\beta$ contiennent à la fois des dimères CD3 $\delta\epsilon$ et CD3 $\gamma\epsilon$, la plupart des TCR $\gamma\delta$ ne contiennent que des dimères CD3 $\gamma\epsilon$ (Hayes et al., 2002). L'utilisation d'approches de cytométrie a permis de montrer que parmi les 3 hypothèses possibles, le complexe CD3/TCR $\gamma\delta$ murin reposait sur un modèle stœchiométrique monovalent avec un ratio dimère CD3/TCR $\gamma\delta$ de 2:1 (Hayes et al., 2006).

Toutefois, il est surprenant que bien que présentant un modèle similaire au TCR $\alpha\beta$, la transduction du signal en réponse à l'engagement du TCR $\gamma\delta$ soit supérieure à celle du TCR $\alpha\beta$. Il est ainsi possible (i) que le TCR $\gamma\delta$ soit capable de s'agréger ou de former des « clusters » à la

surface, (ii) que la différence en composition des sous-unités CD3 favorise la signalisation TCR $\gamma\delta$ -dépendante via le recrutement d'adaptateurs différents ou (iii) que des différences intrinsèques dans les voies de signalisation TCR $\alpha\beta$ et TCR $\gamma\delta$ conduisent à un mécanisme dans lequel le TCR $\gamma\delta$ est capable d'une meilleure signalisation.

2. Les ligands connus

L'une des grandes différences avec les TCR $\alpha\beta$ est que les TCR $\gamma\delta$ reconnaissent leur Ag sous leur forme native et d'une diversité structurale plus importante que les Ags des TCR $\alpha\beta$. En effet, à quelques exceptions clonales, le TCR $\gamma\delta$ ne reconnaît pas ces Ags de façon dépendante des molécules classiques du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Ainsi on peut spéculer que le TCR $\gamma\delta$ reconnaît ces Ags de façon plus apparentée au BCR qu'au TCR $\alpha\beta$. A l'heure actuelle, la grande majorité des ligands proposés sont des molécules du soi le plus souvent apparentées au CMH.

Les premières études réalisées chez la souris se sont intéressées aux molécules apparentées au CMH de classe I T10 et T22 (Ito et al., 1990; Schild et al., 1994). Bien qu'initialement décrites pour activer certains clones spécifiques de LT $\gamma\delta$ murins, il semble pourtant que ces molécules puissent activer une part non négligeable du pool $\gamma\delta$ T murin en périphérie (Crowley et al., 2000). Il paraît cependant difficilement concevable que des TCR exprimant des réarrangements très différents puissent avoir un répertoire antigénique similaire. L'une des explications est que ces différentes populations possèdent des motifs invariants au niveau de leurs boucles « complementarity determining region » (CDR) (Shin et al., 2005). Plus récemment, la molécule CD1d (connue pour présenter des Ags (glyco) lipidiques aux cellules NKT) a été proposée comme étant capable de présenter des Ags du soi ou d'origine bactérienne (ex. cardiolipine) à diverses populations de $\gamma\delta$ T spléniques (Dieudé et al., 2011). Cette capacité à reconnaître des Ags via CD1d avait d'ailleurs déjà été suggérée il y a une dizaine d'années (Huber et al., 2003). Toutefois à la différence des molécules T10 et T22, aucune donnée cristallographique n'est à l'heure disponible pour valider cette interaction. Plus récemment, il a été suggéré que les LT $\gamma\delta$ naïfs en périphérie pourraient reconnaître rapidement un antigène spécifique, la phycoérythrine, qui peut entraîner une réponse rapide se caractérisant par la production d'IL-17A (Chien et al., 2013; Zeng et al., 2012).

Chez l'Homme, la diversité des Ags reconnus par les TCR $\gamma\delta$ semble tout aussi importante que chez la souris. Toutefois, il semble que la population majeure de LT $\gamma\delta$ retrouvée dans le sang circulant (V γ 9V δ 2) reconnaisse de façon homogène certaines molécules du soi ou du soi « modifié » comme les PAgs. La structure même de ces PAgs est importante pour leur reconnaissance via le TCRV γ 9V δ 2. En effet, plusieurs critères sont indispensables à l'antigénécité des PAgs comme leur taille (mono-méthyl phosphate), leur résistance à l'hydrolyse, la longueur de la chaîne alkényl (entre 2 et 5 carbones) et la présence d'autres groupements chimiques (Belmant et al., 2000; Morita et al., 2001). Sur cette base, de nombreux composés synthétiques ont pu être élaborés (Tanaka et al., 2007) pour (i) mieux comprendre les mécanismes de reconnaissance et (ii) tenter de manipuler l'activité $\gamma\delta$ à des fins thérapeutiques (Voir Chapitre II.E). Tout comme leurs analogues murins, il semble que certains clones particuliers de LT $\gamma\delta$ humains V δ 1⁺ soient capables de reconnaître des Ags via la molécule CD1d (Bai et al., 2012; Uldrich et al., 2013). De façon intéressante, ces TCR V δ 1⁺ semi-invariants semblent reconnaître CD1d indépendamment de la molécule présentée (α -GalCer et sulfatide) suggérant une certaine auto-réactivité contre CD1d. La cristallisation du complexe TCRV γ 9V δ 2 avec la molécule CD1d chargée avec du sulfatide démontrent bien la possible interaction des TCR $\gamma\delta$ avec la molécule CD1d (Luoma et al., 2013).

3. Modalités de reconnaissance

Au vue de la grande diversité des Ags et des molécules impliquées dans l'antigénécité des TCR $\gamma\delta$, il est difficile de tirer un modèle consensuel de reconnaissance pour ces derniers et dans ce contexte, une analyse au cas par cas est nécessaire.

Cette diversité peut s'expliquer par exemple par la topologie très différente des boucles CDR des TCR $\gamma\delta$ par rapport à celles des TCR $\alpha\beta$ mais aussi entre les différents TCR $\gamma\delta$. En effet si les boucles CDR3 α et CDR3 β , responsables de la grande majorité de l'antigénécité des TCR $\alpha\beta$, sont de longueurs équivalentes permettant d'obtenir une structure plane favorable à la reconnaissance des épitopes, les régions CDR3 γ et CDR3 δ sont de différentes longueurs conférant une structure tortueuse conférant probablement des interactions inégales entre les 2 boucles CDR et suggérant ainsi des interactions TCR $\gamma\delta$ /ligand très différentes d'un TCR à l'autre.

Chez la souris, la cristallisation de T22 avec un clone particulier de TCR $\gamma\delta$ a permis de mieux comprendre les différences avec les complexes CMH/TCR $\alpha\beta$. En effet la longueur de la région CDR3 δ impose des contraintes spatiales ne permettant pas un « docking » du TCR de façon parallèle à la molécule T22 similaire au complexe CMH:peptide/TCR $\alpha\beta$. En effet l'interaction se fait de façon angulaire (Shin et al., 2005). De plus, cette étude démontre également l'importance de la boucle CDR3 δ par rapport à la boucle CDR3 γ dans l'antigénicité des TCR $\gamma\delta$. Chez l'Homme, les modalités moléculaires de la reconnaissance antigénique par le TCR V γ 9V δ 2 a subi un essor récent grâce à la découverte de l'importance d'un membre de la famille des butyrophilines dans ce mécanisme, BTN3A. Cette découverte plus ou moins fortuite s'est déroulé lors d'une étude *in vitro* visant à étudier l'expression de BTN3A (ou CD277) sur des cellules mononuclées de sang périphérique. En effet, l'utilisation d'un anticorps anti-hBTN3A induisit la prolifération et l'activation spécifique des V γ 9V δ 2 de façon similaire aux PAg (Harly et al., 2011). Cette observation fut ensuite confirmée par des approches génétiques (Vavassori et al., 2013). Intuitivement, il paraissait simple d'imaginer que BTN3A puisse agir comme une molécule présentatrice d'Ag capable de capturer et présenter les PAg aux lymphocytes T V γ 9V δ 2 qui pourraient ainsi reconnaître le complexe directement via leur TCR (Vavassori et al., 2013). Toutefois les données actuellement disponibles ne semblent pas supporter cette hypothèse. En effet parmi les 3 isoformes de BTN3A seul BTN3A1 semble capable d'activer les V γ 9V δ 2 (Harly et al., 2011). Ainsi une attention particulière fut portée sur le domaine intracellulaire B30.2 de BTN3A1. De façon élégante, il fut démontré que le remplacement du domaine intracellulaire de la forme non stimulatrice BTN3A3 par le domaine intracellulaire de BTN3A1 conférait l'activité activatrice de cette dernière à BTN3A3 (Palakodeti et al., 2012; Rhodes et al., 2015). De façon intéressante, une affinité mesurable a pu être mise en évidence entre le domaine B30.2 et les PAg conforme à des activités biologiques fonctionnelles (Sandstrom et al., 2014). L'analyse de la structure de B30.2 montre la présence d'une poche unique chargée capable d'interagir avec les PAg (Sandstrom et al., 2014). Ainsi d'autres modèles prédictifs furent proposés pour expliquer la reconnaissance du « complexe » PAg/BTN3A1 par le TCRV γ 9V δ 2. Premièrement il est possible que la liaison du PAg au domaine intracellulaire de BTN3A1 induise un changement conformationnel de ce dimère permettant l'exposition de l'Ag à la surface. Toutefois, l'expression de BTN3A1 dans des cellules murines ne permettant pas d'induire une activité des V γ 9V δ 2 par les PAg, il est tout à

fait possible que d'autres intermédiaires moléculaires soient impliqués dans cette reconnaissance. De plus, la transfection de cellules CHO de hamsters (contenant accidentellement le chromosome humain numéro 6) avec BTN3A1 permet d'activer les V γ 9V δ 2 grâce aux PAgS (Riano et al., 2014) suggérant donc bien l'existence d'une ou plusieurs « protéine(s) X » manquante(s) dans la reconnaissance antigénique des LT V γ 9V δ 2.

D. Fonctions des lymphocytes T $\gamma\delta$

Les lymphocytes T $\gamma\delta$ peuvent exercer divers rôles physiologiques, incluant l'immunité protectrice contre les pathogènes intra- et extra-cellulaires, la surveillance anti-tumorale, la modulation des réponses immunitaires innée et adaptative, la maintenance de la barrière épithéliale et le remodelage tissulaire (Bendelac et al., 2001; Hayday et al., 2009) (Figure F).

1. Cytotoxicité

Les lymphocytes T $\gamma\delta$ peuvent éliminer les cellules infectées ou transformées via différents mécanismes incluant l'engagement de récepteurs de mort cellulaire (CD95) ou de récepteurs d'apoptose (NKG2D et TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand)) qui entraînent par la suite la production de molécules cytotoxiques telles que les perforines et les granzymes (Qin et al., 2009).

De plus, la cytotoxicité des LT $\gamma\delta$ contribue à la clairance des pathogènes d'une façon directe par l'intermédiaire de la production de molécules lytiques ou bactériostatiques telles que les granulysines et les défensines (Dudal et al., 2006), ou d'une façon indirecte par l'induction des fonctions antibactériennes d'autres cellules immunitaires effectrices et des cellules épithéliales (Hamada et al., 2008).

2. La production de cytokines

Les lymphocytes T $\gamma\delta$ sont connus pour produire un spectre très large de cytokines immunomodulatrices leur permettant de jouer un rôle important dans de nombreux types de réponses immunitaires (infections, cancer, inflammation, auto-immunité). Ainsi en fonction du profil cytokinique sécrété, les LT $\gamma\delta$ peuvent jouer des rôles bénéfiques ou délétères en fonction du modèle d'étude.

Par exemple, elles ont été identifiées comme la source majeure d'IL-17 dans des modèles murins d'infections et de maladies auto-immunes (Bonneville et al., 2010). IL-17, qui est largement produit par les lymphocytes T, est requis pour initier une réponse inflammatoire incluant la maturation des neutrophiles et leur recrutement de la moelle osseuse (Stark et al., 2005). Si leur capacité à produire de l'IL-17 en contexte infectieux est généralement bénéfique, les LT $\gamma\delta$ ont été décrits pour jouer un rôle pathogénique dans le développement de diverses maladies auto-immunes, telles que l'encéphalomyélite expérimentale auto-immune (EAE) (Lohr et al., 2006; Sutton et al., 2006).

Par ailleurs, Ferrick et ses collègues (Ferrick et al., 1995) ont montré que les LT $\gamma\delta$ étaient la source majeure d'IFN- γ après infection par la bactérie *Listeria monocytogenes*. Dans le cancer, la production d'IFN- γ par les LT $\gamma\delta$ semblent également importante dans la régulation de la réponse T CD8⁺ (Gao et al., 2003). Elles produisent également de grandes quantités d'IL-4 après l'infection par *Nippostrongylus brasiliensis*. Cette production est d'autant plus importante qu'elle précède la réponse des lymphocytes T $\alpha\beta$ de plusieurs jours.

3. Présentation antigénique

Si le rôle des LT $\gamma\delta$ dans le développement de la réponse adaptative est clair via leur capacité de produire des cytokines immuno-modulatrices et d'interagir avec d'autres populations immunes, certains travaux suggèrent que celles-ci pourraient être impliquées directement via leur capacité de présentation antigénique. En effet, sous certaines conditions *in vitro*, les LT $\gamma\delta$ semblent capables d'exprimer des marqueurs caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles de cellules présentatrices d'Ag (APCs) (Cheng et al., 2008). Grâce à l'acquisition de ces propriétés, les LT $\gamma\delta$ pourraient migrer vers les ganglions pour présenter et éduquer les LT naïfs CD4 et CD8 (Brandes et al., 2009). Toutefois la relevance biologique *in vivo* de ces fonctions de présentation antigénique reste encore à démontrer.

E. Utilisation des lymphocytes T $\gamma\delta$ en immunothérapie

A travers leur implication dans diverses réponses immunitaires, de nombreux essais cliniques visant à manipuler l'activité des LT $\gamma\delta$ ont été initiés. Ceci a pu être rendu possible via le développement d'analogues structuraux des PAgS présentant une plus grande affinité pour le TCRV γ 9V δ 2 et une plus grande stabilité *in vivo*. De plus certaines drogues comme le

zoledronate capables de moduler la voie de synthèse des mévalonates permettent d'augmenter la concentration intracellulaire de PAgS endogènes aboutissant à une activation et une expansion importante des $V\gamma 9V\delta 2^+$.

Ainsi deux approches sont possibles en immunothérapie : (i) L'injection *in vivo* de molécules permettant une activation et expansion des $LT V\gamma 9V\delta 2$ chez les patients ou (ii) la ré-infusion de $LT V\gamma 9V\delta 2$ autologues préalablement amplifiés *ex vivo*. Ces deux approches ont pour le moment été uniquement testées chez des patients présentant différentes formes de cancers.

Par exemple, une efficacité de l'ordre de 50% a été observée dans un essai clinique utilisant le Phosphostim™ pour induire l'expansion des $LT\gamma\delta$ chez des patients atteints de carcinomes métastatiques rénaux (Bennouna et al., 2008). De plus, chez des patients présentant un cancer du sein à un stade avancé, l'administration de zoledronate en combinaison avec une faible dose d'IL-2 a permis une maturation des $LT V\gamma 9V\delta 2$ chez tous les patients traités. La relation entre les résultats cliniques et le nombre des $LT V\gamma 9V\delta 2$ périphériques était proportionnelle. Toutefois, les patients ne pouvant soutenir leur taux de $LT V\gamma 9V\delta 2$ présentaient une détérioration clinique progressive, alors que ceux qui conservaient des taux de $LT V\gamma 9V\delta 2$ robustes ont présenté une stabilité ou une rémission partielle de la maladie (Meraviglia et al., 2010). Une autre étude a même montré une rémission complète chez un patient présentant un carcinome rénal avancé, suite à une thérapie basée sur l'injection de $LT\gamma\delta$ répétée pendant 6 mois. Ces dernières ont été activées et amplifiées *in vitro* avec du zoledronate + IL-2 (Kobayashi et al., 2010). Les réponses cliniques ont été corrélées avec une augmentation importante du nombre des $LT V\gamma 9V\delta 2$ producteurs d'IFN- γ .

Toutefois, l'une des limites à ces protocoles est l'apparition dans le temps d'une anergie des $LT\gamma\delta$ à la suite de stimulations antigéniques répétées. Par exemple, des réponses moins efficaces ont été observées après l'utilisation répétée du zoledronate et d'IL-2 pour le traitement de patients atteints de cancer de prostate (Gober et al., 2003). Les thérapies ciblant les $LT\gamma\delta$ aboutissent donc à des réponses à court terme dans des maladies à long terme. Afin de lutter contre ce phénomène, Pauza et ses collègues (Pauza et al., 2011) proposent un protocole comprenant l'ajout d'immunomodulateurs tels que la rapamycine, ce qui augmenterait le rendement cellulaire tout en prévenant l'apparition des phénomènes d'anergie (Li et al., 2011).

F. Les lymphocytes T $\gamma\delta$ producteurs d'IL-17

1. Généralités

Tout comme les cellules NKT et les cellules lymphoïdes innées (ILCs), les LT $\gamma\delta$ sont capables de produire de grandes quantités d'IL-17, une cytokine clé dans la régulation des réponses immunitaires au niveau des muqueuses (Narita et al., 2010).

Toutefois, à la différence des lymphocytes T adaptatifs, la capacité des LT à produire de l'IL-17 est gouvernée par un programme de développement au niveau du thymus embryonnaire leur conférant cette propriété fonctionnelle spécialisée (Haas et al., 2012). Ainsi le pool de ces cellules est généré au cours de la vie fœtale et est maintenu au cours de la vie par leur capacité à s'auto-renouveler et posséder une longue durée de vie.

Ainsi chez la souris, les LT $\gamma\delta$ présentant un TCR V γ 4 ou V γ 6 sont spécialisés dans la synthèse de cette cytokine (O'Brien et al., 2009) et se caractérisent par l'absence d'expression de la molécule CD27 (Ribot et al., 2009). Si ces sous-populations jouent des fonctions protectrices dans la plupart des modèles infectieux au travers de leur capacité à produire cette cytokine et induire le recrutement de populations effectrices telles que les neutrophiles, les LT $\gamma\delta$ 17 peuvent participer au développement de maladies auto-immunes comme dans des modèles de sclérose en plaque (EAE) ou d'arthrite (arthrite induit par le collagène). Dans le modèle d'arthrite, la déplétion des LT V γ 4⁺ induit une réduction des scores cliniques, en comparaison avec les souris contrôles, indiquant que ces LT $\gamma\delta$ 17 contribuent à la pathologie (O'Brien et al., 2009).

2. Les lymphocytes T $\gamma\delta$ CD3^{bright}

Récemment, une population de LT $\gamma\delta$ présentant un phénotype unique caractérisé par une forte expression du complexe CD3 (CD3^{bright}) et préférentiellement présente dans les poumons, a été décrite chez la souris (Paget et al., 2015) (Figure 1).

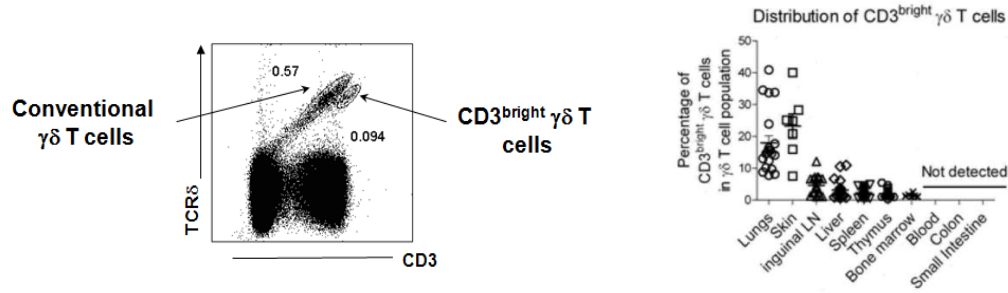


Figure 1: Profil en cytométrie (basé sur l'expression de CD3 et TCR δ) et distribution des LT $\gamma\delta$ CD3^{bright} murins dans les différents organes.

Ces cellules présentent un phénotype caractéristique de LT $\gamma\delta$ producteurs d'IL-17. Elles expriment CD127 (récepteur à l'IL-7) à leur surface, sont négatives pour l'expression de CD27 et NK1.1, et présentent un phénotype pré-activé (CD69⁺) de cellules mémoires effectrices (CD62^{low}, CD44^{high}) (Figure 2). En plus, elles semblent équipées pour produire des cytokines de type Th17, via l'expression constitutive des récepteurs pour l'IL-1 et l'IL-23. Les LT $\gamma\delta$ CD3^{bright} expriment aussi le facteur de transcription ROR γ t (Figure 2) essentiel pour la production d'IL-17 (Ivanov et al., 2006; Manel et al., 2008). Plus surprenant, elles expriment un TCR invariant clonal V γ 6V δ 1 déjà connu pour être spécialisé dans la synthèse d'IL-17A.

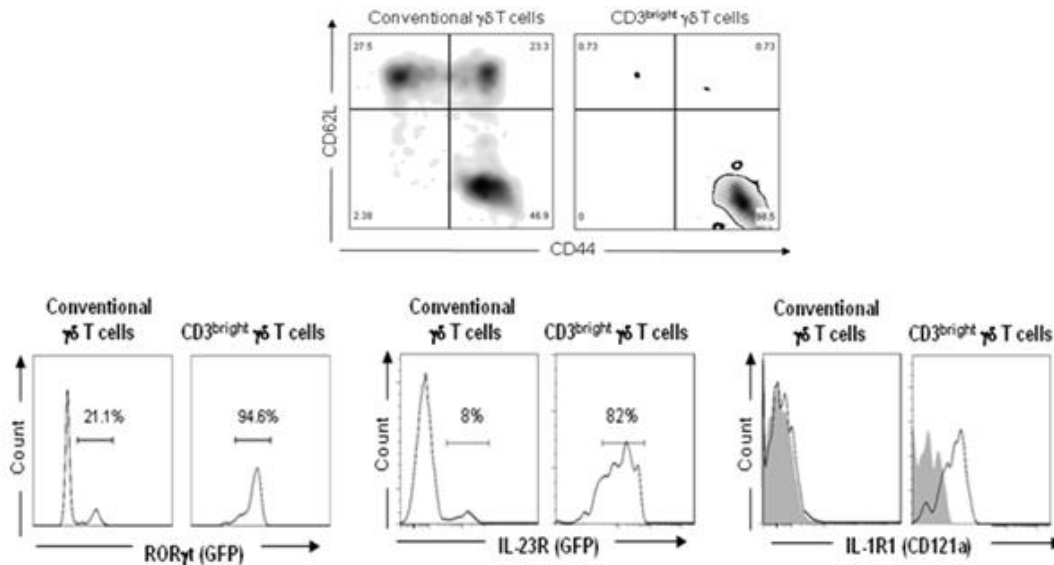


Figure 2: Phénotype des LT $\gamma\delta$ CD3^{bright} vs LT $\gamma\delta$ conventionnels pulmonaires.

De façon attendue, en comparaison avec les $LT\gamma\delta$ conventionnels, les $LT\gamma\delta CD3^{bright}$ sont plus aptes à produire de l'IL-17A *in vivo* et *in vitro* (Figure 3).

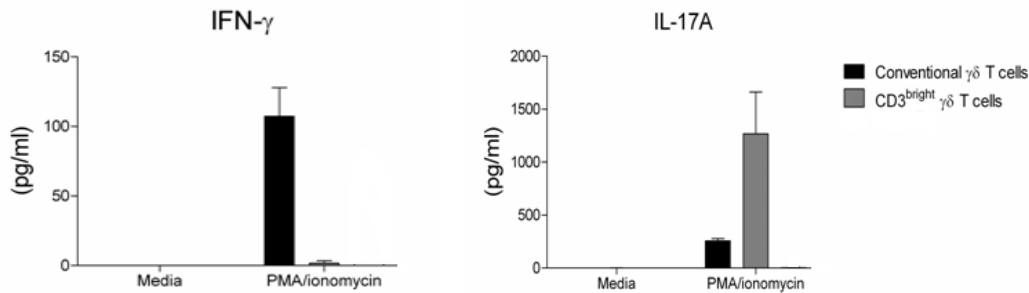


Figure 3: Production d'IFN- γ et d'IL-17A par les $LT\gamma\delta$ conventionnels et $CD3^{bright}$ après stimulation par PMA/ionomycine. Les $LT\gamma\delta CD3^{bright}$ sont spécialisés à produire de l'IL-17, contrairement à la population conventionnelle qui est capable de produire aussi de l'IFN- γ .

Le parallèle avec l'Homme est toujours difficile à établir pour les études $\gamma\delta T$ chez la souris. L'existence même de $LT\gamma\delta 17$ chez l'Homme reste encore aujourd'hui très controversée. Toutefois, certaines études ont montré que sous certaines conditions de stimulation complexes les $LT V\gamma 9V\delta 2^+$ sont capables de produire de l'IL-17 (Caccamo et al., 2011). Par ailleurs l'utilisation de sang de cordon a permis de montrer qu'à l'instar de leurs homologues murines, les $LT\gamma\delta$ pouvaient répondre à différentes cytokines comme l'IL-23, l'IL-1 β et/ou l'IL-7 pour produire de l'IL-17A (Moens et al., 2011; Michel et al., 2012; Ness-Schwickerath et al., 2011). Les $LT\gamma\delta$ sont précocement fonctionnelles en comparaison avec les $LT\alpha\beta$ chez les souris et les humains, et l'une de leurs fonctions majoritaires est de protéger les nouveau-nés (Gibbons et al., 2009 ; Hayday et al., 2000; Ramsburg et al., 2003). Toutefois, nous avons été capables de mettre en évidence une population dans le sang circulant de 40% de donneurs sains présentant ce même profil $CD3^{bright}$ et dont le phénotype pourrait être associé à une capacité à produire de l'IL-17 ($CD127^+$, $CD161^+$, $IL-18R^+$, $V\gamma 9V\delta 2^+$) (C. Paget, communication personnelle). Toutefois des études plus poussées seront nécessaires pour établir un possible lien entre les deux populations.

Ainsi, vu l'importance des $LT\gamma\delta$ dans la production précoce d'IL-17 et son rôle dans le contrôle des infections, nous nous sommes posé les questions suivantes:

- Quelles sont les fonctions des $LT\gamma\delta$ dans l'infection pneumococcique ?
- Comment peut-on manipuler/stimuler l'activité des $LT\gamma\delta$ producteurs d'IL-17 à des fins thérapeutiques?

III. L'inflammasome NLRP3

A. Généralités

Parmi les NLRs humains et murins décrits, il existe une sous-famille de protéines telles que NLRP1, NLRP3 et NLRC4 formant des complexes multi-protéiques appelés inflammasomes. Ces derniers sont caractérisés par la présence d'un motif NACHT (« nucleotide binding and oligomerization domain ») et un nombre variable de motifs LRR (« leucine-rich repeat »), entourés à l'extrémité N-terminale par CARD (caspase-activating recruitment domain) ou PYD (pyrin domain) (Lamkanfi et al., 2012). D'autres PRRs non NLRs sont aussi capables de former des inflammasomes, tels que pyrine et AIM2 (« absent in melanoma 2 »).

Les inflammasomes peuvent s'activer de deux façons dites (i) « canonique » aboutissant à la conversion de la procaspase-1 en sa forme active caspase-1 ou bien (ii) « non-canonique » stimulant l'activation de la procaspase-11. Les caspases 1 et 11 appartiennent à une famille de protéases conservées. Ces deux enzymes induisent une forme de mort cellulaire appelée « pyroptose », toutefois seule la caspase-1 permet la production des formes bioactives des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18 (Lamkanfi et al., 2014).

Les inflammasomes canoniques recrutent et activent la caspase-1, directement ou via l'adaptateur ASC (Apoptosis-associated speck-like protein) (Broz, et al., 2010b; Van Oudenbosch et al., 2014), aboutissant au clivage des pro-cytokines pro-IL-1 β et pro-IL-18 en cytokines biologiquement actives IL-1 β et IL-18 (Guo et al., 2015).

Les inflammasomes sont exprimés par les cellules de la lignée myéloïde (Guarda et al., 2011). Dans ce contexte la grande majorité des études sur la fonctionnalité de ces plateformes multi-protéiques se sont focalisées sur les macrophages et les cellules dendritiques. Par exemple, les inflammasomes NLRP1, NLRC4 et AIM2 s'activent dans les macrophages murins suite à une stimulation par la toxine de *Bacillus anthracis* (Boyden et al., 2006), ou des infections par *Salmonella Typhimurium* (Chen et al., 2014) et *Mycobacterium bovis* (Yang et al., 2013). De même, l'inflammasome NLRP3 est connu pour être exprimé par les macrophages, les monocytes et les DCs (Guarda et al., 2011; Zhong et al., 2013), et sera activé suite à un stimulus inflammatoire.

Toutefois, des études récentes suggèrent que d'autres populations immunes pourraient présenter des inflammasomes fonctionnels comme les polynucléaires neutrophiles. La capacité de ces

derniers à produire de l'IL-1 β avait originellement été associée à l'activité enzymatique de certaines sérines protéases neutrophiliques (Karmakar et al., 2012; Schreiber et al., 2012). Toutefois, d'autres études ont récemment suggéré que les neutrophiles sont capables de cliver la pro-IL-1 β indépendamment des protéases, et qu'ils peuvent exprimer des inflammasomes fonctionnels tels que NLRC4 (Chen et al., 2014) et NLRP3 (Karmakar et al., 2015; Karmakar et al., 2016). Si la fonctionnalité de ces inflammasomes au sein des neutrophiles paraît bien établie, les mécanismes responsables de leur activation restent encore mal compris et divergents dans des modèles similaires (Karmakar et al., 2015; Karmakar et al., 2016). De plus, la relevance de ces inflammasomes neutrophiliques dans la régulation des réponses immunitaires nécessite des études plus poussées.

B. Modalités d'activation des inflammasomes

L'activation de l'inflammasome NLRP3 requiert 2 signaux: un stimulus activant le NF- κ B et aboutissant à l'expression de pro-IL-1 β et de NLRP3 (Bauernfeind et al., 2009), et un deuxième stimulus nécessaire pour l'assemblage de l'inflammasome (Lamkanfi et al., 2012).

1. Le « priming » des inflammasomes (signal 1)

Le stimulus de « priming » de l'inflammasome NLRP3 peut avoir lieu via des récepteurs dont le signal peut activer le facteur de transcription NF- κ B, tels que des ligands de TLRs, de NLRs et des récepteurs aux cytokines (TNFR, IL-1R) (Bauernfeind et al., 2009; Franchi et al., 2009) (Figure G). Les taux cellulaires de NLRP3 peuvent présenter un facteur limitant pour l'assemblage de l'inflammasome (Bauernfeind et al., 2009). Cependant, l'étape de « priming » est nécessaire non seulement pour induire l'expression de pro-IL-1 β mais aussi pour augmenter les taux de NLRP3. Par contre, les autres composants de l'inflammasome tels que procaspase-1, ASC et pro-IL-18 sont présents à des concentrations adéquates à l'état basal (Franchi et al., 2009; Schroder et al., 2012).

Les TLRs peuvent reconnaître certaines molécules pathogéniques conservées qui activent NF- κ B via un signal de priming de l'inflammasome NLRP3 (Akira et al., 2006). Un second signal conféré par des agents tels que l'ATP, les toxines bactériennes entraînant la formation de pores et

certaines particules sera nécessaire pour l'activer (Bauernfeind et al., 2009; Bauernfeind et al., 2011; Juliana et al., 2012; Schroder et al., 2012).

Des NLRs résident dans le cytosol et peuvent s'activer en réponse à des ligands microbiens qui puissent accéder au cytosol ou à des facteurs de virulence tels que les toxines bactériennes, entraînant ainsi le priming de l'inflammasome (Franchi et al., 2012).

2. Assemblage et activation des inflammasomes (signal 2) (Figure H)

a. NLRP3

L'inflammasome NLRP3 s'assemble quand le domaine PYD de NLRP3 entre en interaction avec le PYD d'ASC pour recruter la caspase-1. Cet inflammasome s'active grâce à des signaux d'origine microbiennes (toxines bactériennes, virus et champignons), des cristaux, ou des signaux de danger (« DAMPs ») tel que l'ATP (Lamkanfi et al., 2012) (Figure G). La détection de ces stimuli ne se fait pas de façon directe. Plusieurs hypothèses ont été émises concernant le mécanisme d'activation du NLRP3. Tout d'abord, le stress oxydatif semble jouer un rôle prépondérant dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 notamment dans les pathologies inflammatoires. En effet, certaines toxines et particules (amiante, cristaux) influencent la concentration d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) intracellulaire. Ainsi lorsque le niveau de ROS atteint un certain seuil, celui-ci induit une dissociation du complexe « thioredoxin-interacting protein » (TXNIP) aboutissant à sa liaison au domaine LRR de NLRP3 conduisant à son activation (Zhou et al., 2010). Par ailleurs, il semblerait que l'inflammasome puisse s'activer suite à une réduction de la concentration cytosolique en potassium (K^+) via la capacité de nombreuses toxines à former des pores au niveau de la membrane plasmique (Munoz-Planillo et al., 2013). Dans cette famille, nous pouvons par exemple citer la pneumolysine de *Streptococcus pneumoniae* (McNeela et al., 2010).

Il a été montré que l'activation de l'inflammasome NLRP3 peut se faire aussi par des particules, comme la silice, et peut entraîner la production d'IL-1 β et le développement de l'inflammation pulmonaire (Cassel et al., 2008; Halle et al., 2008). Des alarmines telles que l'IL-1 α et l'IL-33 sont produits rapidement après l'instillation de silice. Une fois l'IL-1 α ou l'IL-1 β recombinante est ajoutée sur des macrophages provenant de poumons de souris traitées par la silice, ceci

induisait une production d'IL-1 β d'une façon dépendante. Une augmentation de la production d'IL-1 β a été aussi observée quand l'IL-33 est ajoutée (Rabolli et al., 2014).

b. AIM2

L'inflammasome AIM2 est un membre cytoplasmique de la famille des « hematopoietic expression, interferon-inducible, nuclear localization » (HIN). Sa structure consiste en une partie N-terminale PYD et un motif C-terminal HIN200. Ce dernier peut se lier à de l'ADN double brin (Schroder et al., 2009) et recruter ASC via une interaction de type PYD-PYD. ASC est ensuite capable de se lier à la procaspase-1 et induire son activation. Ceci aboutit à la sécrétion d'IL-1 β et d'IL-18 actives. L'expression d'AIM2 est induite par les interférons de type I et II, qui jouent notamment un rôle important dans la défense contre les infections virales. D'un point de vue mécanistique, l'inflammasome AIM2 peut s'activer par du matériel génomique provenant de *Francisella tularensis*, *L. monocytogenes* ou encore de l'ADN viral (ex. cytomégalo virus) (Jin et al., 2012).

c. Pyrine

L'inflammasome pyrine est le dernier membre de la famille « inflammasome » à avoir été décrit (Broz et al., 2016). Tout comme NLRP3, pyrine détecte la présence de pathogènes indirectement via des modifications au niveau des protéines intracellulaires de l'hôte. Plus précisément, il répond à l'activité enzymatique de certaines toxines bactériennes ainsi qu'à certaines modifications des Rho GTPases cytosoliques (Xu et al., 2014). La déplétion du gène *Mefv* codant pour pyrine aboutit à une diminution de l'infiltration des cellules inflammatoires et rend les animaux déficients plus susceptibles à l'infection par *Burkholderia cenocepacia* (Gavrilin et al., 2012; Xu et al., 2014).

d. NLRP1 et NLRC4

Contrairement aux autres membres de la famille « inflammasome », NLRP1 et NLRC4 (ou IPAF) ne requièrent pas l'adaptateur ASC pour activer caspase-1. En effet, NLRP1 et NLRC4 possédant un domaine CARD peuvent directement interagir avec le domaine CARD de la procaspase-1 (Guey et al., 2014; Van Opdenbosch et al., 2014). Via son activité, NLRP1 joue un rôle protecteur dans l'infection par *Bacillus anthracis*. Les souris NLRP1-déficientes sont ainsi

plus susceptibles à l'infection que les souris WT contrôles (Terra et al., 2010). Un rôle protecteur de l'inflammasome NLRP1 a été suggéré aussi au sein d'une infection orale parasitaire par *Toxoplasma gondii* (Ewald et al., 2014).

L'inflammasome NLRC4 a été décrit pour s'assembler en réponse à la flagelline bactérienne (Zhao et al., 2011). Il joue lui un rôle dans la défense contre certaines bactéries telles que *Salmonella Typhimurium* ; Kupz et ses collègues ont montré que l'IL-18 produit par les cellules dendritiques, suite à l'activation de NLRC4 au cours de l'infection par *S. typhimurium*, est important pour activer les cellules T CD8⁺ et leur production d'IFN- γ (Kupz et al., 2012). L'inflammasome NLRC4 est aussi impliqué dans la réponse contre d'autres bactéries telles que *Legionella pneumophila* (Case et al., 2009), *Listeria monocytogenes* (Wu et al., 2010), *Pseudomonas aeruginosa* (Miao et al., 2008).

C. Inflammasomes et Infection

1. L'inflammasome NLRP3

Les inflammasomes ont été décrits comme étant importants dans la réponse contre divers pathogènes bactériens, viraux et fongiques.

Salmonella typhimurium est une bactérie qui a été montrée pour activer l'inflammasome NLRC4 (Franchi et al., 2006; Miao et al., 2006). Toutefois, Broz et ses collègues ont montré que suite à l'infection par *Salmonella*, une production d'IL-1 β dépendante de l'inflammasome NLRP3 peut être observée dans les stades précoces de l'infection (Broz et al., 2010a). Ainsi, les souris déficientes à la fois pour NLRP3 et NLRC4 sont plus susceptibles à l'infection que les souris déficientes pour l'une de ces protéines, montrant des rôles parfois redondants des inflammasomes durant l'infection.

La nature redondante des inflammasomes a été aussi décrite durant l'infection par *Listeria monocytogenes*. En effet si une activation des inflammasomes NLRC4 et AIM2 a déjà été observée dans ce modèle (Warren et al., 2008; Wu et al., 2010), l'inflammasome NLRP3 s'active également en réponse aux dommages de la membrane phago-lysosomale causés par la toxine listériolysine O de *Listeria* (Wu et al., 2010).

Le rôle de l'inflammasome NLRP3 a été aussi décrit dans de nombreuses autres infections bactériennes. Ainsi *Streptococcus pyogenes*, *Vibrio spp.* et *Staphylococcus aureus* peuvent

activer l'inflammasome NLRP3 selon un mécanisme dépendant de la streptolysine O (Harder et al., 2009), des hémolysines et des toxines (Toma et al., 2010) ainsi que des lipoprotéines bactériennes (Munoz-Planillo et al., 2009). *Neisseria gonorrhoeae* peut aussi induire la production d'IL-1 β via l'inflammasome NLRP3 selon un mécanisme qui dépend du facteur de virulence lipo-oligosaccharide (Duncan et al., 2009).

Des études ont également montré l'activation de l'inflammasome NLRP3 en réponse à des virus tels que le virus influenza A. En effet, l'infection par influenza *in vitro* de macrophages et de DCs dérivés de souris déficientes pour certains composants de l'inflammasome NLRP3 entraîne une réduction de la production de cytokines pro-inflammatoires (Allen et al., 2009; Ichinohe et al., 2009; Thomas et al., 2009). De plus l'infection *in vivo* par ce virus chez ces souris aboutit à une diminution du recrutement des neutrophiles et des monocytes (Allen et al., 2009; Thomas et al., 2009). Ceci s'accompagne notamment d'une nécrose épithéliale qui était plus marquée chez les souris déficientes pour NLRP3 (Thomas et al., 2009).

Enfin, ASC et NLRP3 sont impliqués dans le contrôle de la dissémination fongique et la survie de l'hôte chez des souris infectées par *Candida albicans* (Gross et al., 2009; Hise et al., 2009; Joly et al., 2009). Les souris déficientes pour ASC et NLRP3 présentent une survie réduite et une augmentation de la charge fongique suite à l'infection par *C. albicans* due à un défaut de production d'IL-1 β (Gross et al., 2009; Hise et al., 2009).

2. Les autres inflammasomes

Plusieurs études ont montré l'implication des inflammasomes AIM2 et NLRC4 en réponse à l'infection par *Listeria* (Kim et al., 2010; Wu et al., 2010). Par exemple, l'inflammasome NLRC4 est impliqué dans la détection de la flagelline de *Listeria* (Warren et al., 2008). L'inflammasome AIM2 était capable d'activer la caspase-1 et d'induire la production d'IL-1 β suite à l'infection par *Listeria* (Kim et al., 2010; Rathinam et al., 2010; Sauer et al., 2010; Wu et al., 2010). Des macrophages provenant de souris AIM2^{-/-} et infectés par *Listeria* ont montré une réduction du clivage de la caspase-1 (Rathinam et al., 2010; Wu et al., 2010) ainsi que de la maturation d'IL-1 β et de sa production (Rathinam et al., 2010).

Un rôle important de l'inflammasome NLRC4 a été aussi décrit dans le contexte d'infection par *Legionella spp.* (Pereira et al., 2011) où les souris NLRC4^{-/-} présentaient des charges bactériennes plus élevées dans leurs poumons.

Via sa capacité à reconnaître de l'ADN cytosolique, AIM2 est impliqué dans la réponse contre le cytomégalovirus (CMV). En effet, des souris déficientes pour AIM2 et infectées par CMV présentent des taux réduits d'IL-18 sériques. Ce phénotype corrèle avec une réduction de la production d'IFN γ par les cellules NK, connues pour jouer un rôle important dans l'élimination des cellules infectées par ce virus (Rathinam et al., 2010).

La lyse cellulaire induite par l'activation NLRP1 joue un rôle protecteur chez les rats et réduit la mortalité suite à l'infection par *B. anthracis* (Newman et al., 2010). Les spores de *B. anthracis* sont aussi capables d'induire une activation de la caspase-1 via NLRP1 *in vivo* conférant ainsi une protection aux souris (Terra et al., 2010).

D. Polymorphisme des inflammasomes et maladies auto-inflammatoires

CAPS (Cryopyrin-associated periodic syndromes) est un ensemble de pathologies auto-inflammatoires causées par des mutations au niveau du gène *Nlrp3*, englobant le FCAS (familial cold auto-inflammatory syndrome), le MWS (Muckle-Wells syndrome) et le NOMID (neonatal onset multisystem inflammatory disease). Ces syndrômes se manifestent généralement au cours de l'enfance et se caractérisent par des fièvres fréquentes et récurrentes, des éruptions cutanées, ainsi qu'une inflammation au niveau des articulations et des yeux. Ces symptômes font suite à une activation spontanée de NLRP3 et la production non régulée d'IL-1 β . Ainsi, la maladie peut évoluer vers des formes sévères allant jusqu'à la perte de l'audition, un retard de croissance voire la mort (Aganna et al., 2002; Rigante et al., 2014). Une thérapie anti-IL-1 s'est avérée bénéfique pour traiter le CAPS (Hoffman et al., 2008; Lachmann et al., 2009) montrant ainsi le rôle central de l'IL-1 dans la progression de la maladie.

Cependant, l'utilisation de modèles animaux montre que la neutralisation de l'IL-1 β et l'IL-18 ne protège pas complètement les symptômes du FCAS (perte du poids et mortalité). Par ailleurs, la déficience en caspase-1/11 protège quasi-totalement contre l'inflammation de peau, la perte du poids et la splénomégalie (Brydges et al., 2013). Ceci suggère qu'en plus de l'IL-1 β et de l'IL-18, la pyroptose pourrait aussi jouer un rôle dans la pathologie du FCAS (Brydges et al., 2013).

Il faut noter que des mutations au niveau d'autres inflammasomes peuvent aussi causer certaines maladies auto-inflammatoires (telles que la fièvre méditerranéenne familiale due à une mutation dans le gène *Mefv* codant pour la pyrine), ainsi que des maladies auto-immunes (maladie de Crohn, arthrite rhumatoïde) (Saavedra et al., 2015).

IV. L'interleukine-7 : Une cytokine homéostatique de choix pour booster les réponses IL-17 innées.

A. Généralités

L'IL-7 a été identifié depuis longtemps comme étant une cytokine homéostatique majeure impliquée dans la survie de différentes populations de LT. Pas seulement les LT $\alpha\beta$ conventionnels, mais aussi les LT $\gamma\delta$, les cellules NKT et aussi les ILCs.

L'IL-7 fait partie d'une famille de cytokines signalant via un récepteur composé d'une sous-unité commune, la chaîne gamma (γ c ou CD132). Cette famille comprend les cytokines IL-2, IL-4, IL-7, IL-15 et IL-21, dont les récepteurs partagent la chaîne γ c associée à une chaîne α spécifique pour chaque cytokine. Deux exceptions existent pour les récepteurs à l'IL-2 et à l'IL-15 qui présentent aussi une troisième chaîne β (CD122) (Rochman et al., 2009) (Figure I). Le récepteur à l'IL-7 est composé d'une chaîne α (CD127).

Les fonctions physiologiques de l'IL-7 ont été principalement décrites dans le développement des lymphocytes B et T, et plus tard le développement et le maintien de la plupart des populations lymphocytaires au niveau périphérique (von Freeden-Jeffry et al., 1995). Une déplétion des lymphocytes T se traduit par une augmentation des taux d'IL-7 suggérant un rôle de cette dernière dans la régénération de ces cellules (Napolitano et al., 2001).

A l'homéostasie, la présence d'IL-7 a été détectée dans les tissus stromales, comprenant les cellules épithéliales du thymus et de la moelle osseuse (Sakata et al., 1990; Wiles et al., 1992). L'IL-7 peut également être produit par l'épithélium intestinal, les kératinocytes, le foie et les cellules dendritiques (Fry et al., 2002).

De façon intéressante la comparaison des phénotypes entre les souris IL-7^{-/-} et IL-7R α ^{-/-} indiquent des différences dans le compartiment lymphocytaire T. Chez les souris IL-7^{-/-}, la cellularité dans le thymus est réduite d'environ 20 fois, alors que chez les souris IL-7R α ^{-/-}, la réduction observée n'est que de 0.01 à 10% par rapport à des souris contrôles (Fry et al., 2002). Le développement des lymphocytes T $\alpha\beta$ a toutefois lieu chez les souris IL-7R α ^{-/-}, mais ces cellules ne semblent pas être fonctionnelles. Ces travaux suggèrent donc que d'autres molécules pourraient utiliser la chaîne α du récepteur à l'IL-7. En effet, l'IL-7 partage la sous-unité α de

son récepteur avec une autre cytokine, la « thymic stromal lymphopoeitin » (TSLP), jouant un rôle important dans l'inflammation au niveau des muqueuses comme l'asthme.

B. L'utilisation de l'IL-7 en clinique

Au regard de l'importance de l'IL-7 dans le développement et l'homéostasie des populations lymphocytaires, l'utilisation de cette cytokine en clinique chez des patients présentant des lymphopénies chroniques de diverses étiologies (cancer, infections virales) fut rapidement considérée.

1. Données précliniques

Cette possibilité fut étayée dans différents modèles précliniques montrant que l'administration d'IL-7 recombinante chez des animaux traités avec différents immunosuppresseurs ou dans des modèles de greffe de moelle favorisait la reconstitution du compartiment immun (Fry et al., 2001; Morrissey et al., 1991). Il est important de noter que cet effet s'explique principalement par un effet d'amplification du pool de lymphocytes T en périphérie et indépendamment du thymus. De plus, l'activité reconstituante de l'IL-7 a pu être démontrée comme surpassant celle d'autres cytokines homéostatiques comme l'IL-15 ou le FLT3L (Alpdogan et al., 2005; Fry et al., 2001). Au-delà de son activité de reconstitution du pool lymphocytaire, l'administration d'IL-7 en contexte vaccinal semble également augmenter la qualité de la réponse T Ag spécifique et la survie du pool T mémoire (Melchionda et al., 2005; Nanjappa, et al., 2008). Le moment de l'administration semble d'ailleurs jouer un rôle important dans ces phénomènes. Son effet sur le développement de la réponse spécifique est essentiellement observé lorsque l'IL-7 est co-administré avec le vaccin, alors que son effet sur la réponse mémoire est surtout observable si l'IL-7 est injecté au cours de la phase de contraction de la réponse T CD8⁺.

En contexte infectieux, l'administration de l'IL-7 semble avoir aussi des effets bénéfiques. En effet, le traitement avec de l'IL-7 de souris infectées par LCMV augmente la clairance virale des animaux, un effet reposant sur son effet modulateur sur certains facteurs suppressifs comme PD-1 et SOCS3 au sein des lymphocytes T mais aussi l'induction de la production d'IL-22 (Pellegrini et al., 2011). L'IL-7 semble aussi jouer un rôle modulateur intéressant dans certains modèles de chocs septiques. Même s'il pourrait sembler contre-intuitif qu'une déficience en lymphocytes T aggrave la physiopathologie d'un choc septique, l'administration d'IL-7, dans un

modèle de ponction caecale, permet d'inhiber l'apoptose des lymphocytes T, d'augmenter la migration des leucocytes vers le site inflammatoire et de réduire la charge bactérienne (Unsinger et al., 2010). Même si ces données suggèrent un rôle bénéfique de l'IL-7 en contexte d'infection bactérienne, il reste clairement à démontrer son activité dans un modèle d'infection bactérienne spécifique non polymicrobienne.

2. Etudes et essais cliniques

Les premières études utilisant de l'IL-7 pour administration humaine ont utilisé une IL-7 recombinante humaine (IL-7rh) produite par *Escherichia coli*. Toutefois, les essais ultérieurs ont eu recours à de l'IL-7rh produite dans les cellules eucaryotes reproduisant avec plus d'exactitude les profils de glycosylation présents dans la protéine naïve et diminuant aussi les risques de développement d'Ac anti-IL-7rh. Jusqu'à présent, plusieurs essais cliniques basés sur l'administration d'IL-7 ont été initiés dans le monde chez des patients ayant subits une transplantation de cellules souches hématopoïétiques, atteints de cancer, de lymphocytopenies idiopathiques ou d'infections chroniques virales (HIV, HBV et HCV) (Mackall et al., 2011). Dans tous ces essais, l'IL-7rh a été administré de façon sous-cutanée, à des doses variant de 3 à 60 µg/kg et allant d'une à 8 doses. A l'exception de quelques effets secondaires communs (fièvre, léger malaise), l'IL-7rh est globalement bien toléré. Aucune toxicité aiguë n'a été observée dans les protocoles basés sur l'administration de l'IL-7rh.

Dans la première étude, l'IL-7rh a été administré chez 16 patients atteints de cancers chimio-résistants tous les 2 jours pour une durée de 14 jours. L'IL-7 a induit une diminution transitoire du nombre des lymphocytes circulants les premiers jours après l'administration, probablement due au recrutement de ces cellules vers les tissus. Dans les jours suivants, une augmentation dose-dépendante des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ circulants a pu être observée avec un pic à J21. Cet effet a de plus perduré 8 semaines après l'arrêt du traitement. Il est important de noter que l'administration d'IL-7 a été associée à une augmentation de la taille des organes lymphoïdes secondaires comme la rate ou les ganglions lymphatiques, ainsi qu'une augmentation importante de l'activité métabolique au niveau de ces sites (Sportes et al., 2008). Même si la demi-vie de l'IL-7rh mesurée est relativement courte (6-10h), les effets biologiques persistent dans le temps (Sportes et al., 2010). L'IL-7 étant connue pour se lier à certains composants de la matrice

extracellulaire, les effets persistants de la thérapie par l'IL-7rh peuvent être dus à une saturation du compartiment tissulaire, suivie par une libération lente de la cytokine.

L'IL-7rh a été aussi testé dans des modèles d'infections virales chroniques. Ainsi 18 patients atteints d'une infection par HIV ont reçu une seule dose d'IL-7 (Sereti et al., 2009). Cette étude a confirmé que l'IL-7rh induisait une lymphopénie précoce, suivie par une augmentation significative des nombres des LT CD4⁺ et CD8⁺ à partir de J4 suivant l'administration de l'IL-7 et qui persistait jusqu'au 14^{ème} jour. Etant donné que les taux d'IL-7rh au niveau du sérum présentaient un pic 4h après son administration et que la demi-vie de l'IL7 est courte, les résultats confirment que les effets biologiques de l'IL-7rh continuent même après que les taux sériques de la cytokine reviennent à la normale. Dans une autre étude où l'IL-7rh a été administré en 8 doses tous les 2 jours chez 14 patients atteints de HIV, une augmentation des nombres des lymphocytes T ainsi qu'une expansion des T naïfs et mémoires a été observée (Levy et al., 2009). Malgré des augmentations transitoires de la réplication du virus, les taux d'IL-2 et d'IFN- γ obtenus *in vitro* en réponse à des antigènes viraux a été augmentée chez 4 patients ayant suivi la thérapie indiquant une amélioration significative de l'immunité antivirale. De façon similaire, un essai chez un patient atteint d'une leuco-encéphalopathie multifocale progressive associée à une leucopénie CD4⁺ idiopathiques a montré une reconstitution immunitaire précoce suite au traitement par l'IL-7rh (Patel et al., 2010).

Ces essais cliniques ont également mis en évidence des effets de l'IL-7 sur la lymphopoïèse des lymphocytes B. Si l'administration de l'IL-7rh aboutissait à des effets négligeables sur les lymphocytes B matures circulants, des augmentations transitoires du nombre de lymphocytes B immatures ont été notées dans 2 études (Sereti et al., 2009; Sportes et al., 2010). L'IL-7rh pourrait ainsi induire une prolifération précoce de lymphocytes B au niveau de la moelle associée à l'apparition d'hématogones, des précurseurs médullaires de la lignée B (observés généralement suite à la reprise d'une chimiothérapie intense) pouvant être confondus avec des cellules malignes en microscopie.

C. Nouveaux outils biologiques renforçant l'innocuité et l'activité biologique de l'IL-7

Comme pour de nombreux autres composés, les molécules bioactives nécessitent au préalable un accord par des instances nationales et internationales pour leur utilisation chez l'homme.

L'approbation de cette utilisation repose principalement sur l'innocuité du composé. L'alourdissement des mesures permettant l'obtention de ce sésame provient essentiellement des études cliniques utilisant l'IL-2, approuvé par la FDA (Food and Drug administration) dans le traitement de métastases entre 1992 et 1998. En effet, si l'IL-2 joue un rôle bénéfique lorsqu'il est injecté à fortes doses, de nombreux effets secondaires sévères ont été rapportés (Atkins et al., 1999; Rosenberg et al., 1998). La nécessité de fortes doses pour obtenir un effet biologique s'explique par la faible durée de demi-vie de l'IL-2 *in vivo*. De nombreuses études ont visé à résoudre ce problème et un protocole développé au début des années 90 a semblé apporter une solution au problème de toxicité de l'IL-2. Bien que paradoxal, l'établissement d'un complexe *in vitro* avant administration entre l'IL-2 recombinante et un Ac neutralisant monoclonal (ACm) spécifique permet d'augmenter l'innocuité de la molécule ainsi que son efficacité (Phelan et al., 2008). En effet, Il a été montré que le complexe IL-2/ACm améliore l'activité de l'IL-2 *in vivo* en augmentant la demi-vie de la cytokine et en favorisant la liaison de la cytokine à son récepteur. Cette stratégie de complexe « cytokine/ACm » a par la suite pu être démontrée efficace sur l'activité d'autres cytokines comme l'IL-3, IL-4, IL-6 ou IL-7 (Boyman et al., 2006; Finkelman et al., 1993). Toutefois les mécanismes expliquant cette efficacité diffère d'un complexe à l'autre en fonction de l'isotype utilisé.

Afin d'améliorer l'efficacité de l'IL-7, la cytokine est administrée sous forme de complexe avec un ACm (clone : M25; IgG2b de souris) chez la souris (Boyman et al., 2008; Finkelman et al., 1993). Ainsi le complexe IL-7/M25 présente une activité biologique *in vivo* 50 à 100-fois plus importante que celle de l'IL-7 seule. Une fois injectée chez la souris, l'IL-7 possède une demi-vie d'environ 2h, alors que celle du complexe IL-7/M25 est de 24h (Boyman et al., 2008; Bui et al., 1994). De plus, le complexe IL-7/M25 induit une signalisation intracellulaire plus forte et prolongée via le récepteur à l'IL-7. Ceci est en partie dû à l'inhibition de la down-régulation de CD127 (IL-7R α) induite par l'IL-7 seule. L'injection répétée d'IL-7 pendant 24h présente même une efficacité moins importante qu'une seule injection du complexe IL-7/ M25.

L'explication à cette activité augmentée semble résider dans le domaine Fc de l'IgG. Cette fraction possède en effet des propriétés pharmacocinétiques uniques se répercutant sur l'activité de la cytokine associée. Certaines populations immunes telles que les macrophages et les DCs expriment à leur surface des récepteurs aux fractions Fc des IgG (Fc γ R) pouvant capter et impacter positivement sur la présentation du complexe cytokine/ACm (Bergtold et al., 2005).

Un autre récepteur aux fragments Fc pouvant jouer un rôle dans l'activité du complexe est le récepteur Brambell ou récepteur Fc néonatal (FcRn). Ce récepteur permet de fixer les complexes au niveau des endosomes et les recycler vers l'espace extracellulaire, empêchant ainsi sa dégradation et prolongeant sa durée de vie *in vivo* (Roopenian et al., 2007). L'expression du FcRn est essentielle au maintien d'une durée de vie normale pour M25 et donc l'efficacité du complexe IL-7/ M25. Une autre approche utilisant une protéine de fusion entre l'IL-7 et la région Fc de M25 augmente également la durée de vie par rapport à l'IL-7 seule mais reste toutefois moins efficace que le complexe IL-7/M25 (Martin et al., 2013) suggérant qu'il existe un mécanisme additionnel indépendant de l'interaction FcRn-Fc.

En effet il semble que la partie Fab de M25 ait également un rôle à jouer dans l'activité du complexe. Ainsi, plusieurs injections d'un complexe IL-7/M25-Fab permettent d'obtenir un effet similaire à celui d'une dose unique d'IL-7/M25. Ceci suggère que la fixation du Fab de M25 sur la cytokine modifie son activité biologique. Toutefois, il est à noter qu'il faut augmenter de 12 fois la quantité d'IL-7 dans le protocole IL-7/M25-Fab pour obtenir un effet comparable à IL-7/M25 (Martin et al., 2013). Ces résultats mettent ainsi en évidence le rôle primordial de l'interaction entre Fc et FcRn pour améliorer l'effet des complexes.

Enfin, il semble que la séquestration de la cytokine bioactive par son récepteur soit une limite à son efficacité. Initialement, ce mécanisme a été décrit comme étant propre au complexe IL-2/ACm via l'existence de 2 sous-unités α dans la structure du récepteur à IL-2 (Krieg et al., 2010; Letourneau et al., 2010). Pourtant un mécanisme similaire a été mis en évidence pour le complexe IL-7/ACm. Toutefois, parmi plusieurs clones anti-IL-7 testés, seul le clone M25 est capable de neutraliser la fixation de l'IL-7 à son récepteur (Martin et al., 2013). Via cette propriété, la présence du M25 empêche l'IL-7 de se fixer à son récepteur et prévient donc la down-régulation de ce dernier ainsi que sa « consommation » par le récepteur. Cette compétition entre CD127 et M25 prolonge ainsi l'interaction entre l'IL-7 et l'IL-7R dans le temps. En adéquation avec cela, l'utilisation du complexe IL-7/M25 permet de réduire de 50% la down-modulation de l'IL-7R (Martin et al., 2013).

En conclusion, cette approche devrait être encouragée dans des modèles physiopathologiques pré-cliniques et cliniques.

D. Relation entre l'IL-7 et l'homéostasie des populations lymphoïdes innées productrices d'IL-17

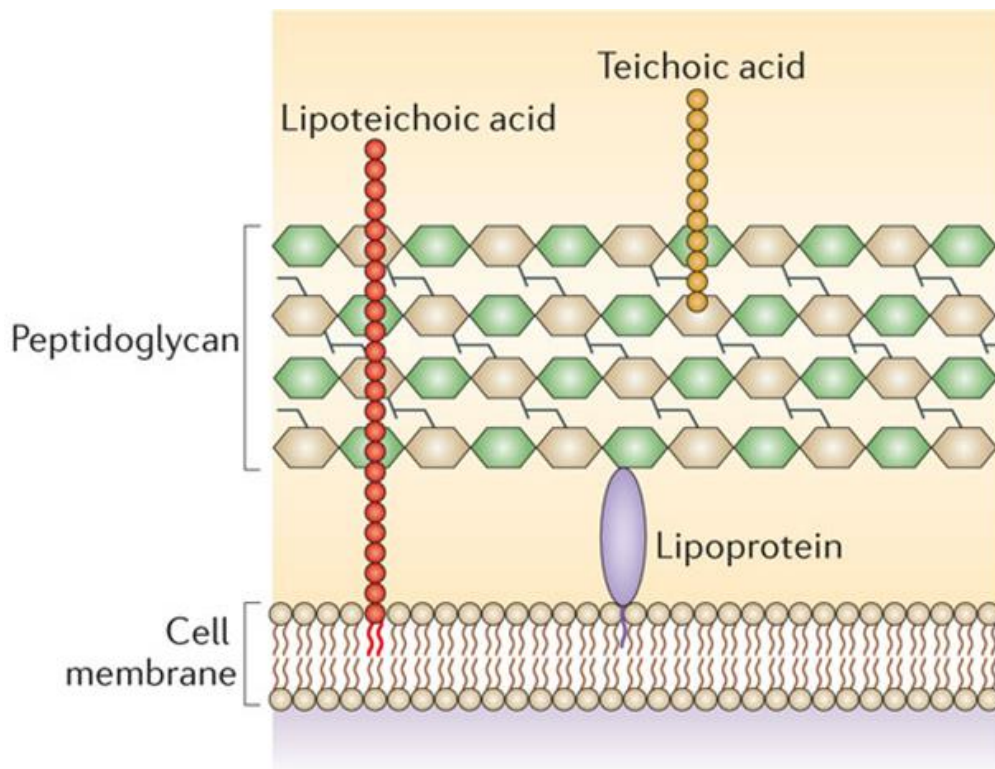
L'IL-7 est une cytokine abondante au cours de la période néonatale. De plus, de nombreuses populations lymphocytaires innées spécialisées dans la production d'IL-17 sont exclusivement dérivées de progéniteurs fœtaux pendant cette même période. L'implication de l'IL-7 sur le développement des lymphocytes adaptatifs est connue de longue date que ce soit pour leur développement ou leur maintien en périphérie. Le lien avec les populations productrices d'IL-17 est lui plus récent. En effet, l'IL-7 semble favoriser l'expansion de lymphocytes T Th17 dans un modèle murin de sclérose en plaques (EAE), ainsi qu'au cours d'une étude clinique chez des patients atteints de scléroses en plaques (Liu et al., 2010b).

Toutefois la contribution de l'IL-7 dans le développement et les fonctions des populations lymphocytaires innées est beaucoup moins connue. L'IL-7 est connue pour jouer un rôle critique pour le développement des LT $\gamma\delta$. En effet, 2 études de Maki et al. (Maki et al., 1996) et He et al. (He et al., 1996) ont pu montrer qu'une déficience pour le récepteur α de l'IL-7 (CD127^{-/-}) perturbaient grandement le répertoire $\gamma\delta$ en périphérie. Ces souris présentaient une absence de LT $\gamma\delta$ dans la peau, le foie, l'intestin et la rate. Ceci s'expliquant par un défaut de développement des LT $\gamma\delta$ au niveau du thymus indiquant que la signalisation par l'IL-7R α est indispensable dans ce processus.

Si nous savons depuis plus de 20 ans que l'IL-7 joue un rôle crucial dans leur développement, les effets de l'IL-7 sur les LT $\gamma\delta$ en périphérie ne sont connus que depuis très récemment. L'administration d'IL-7 induit l'expansion préférentielle *in vivo* des sous-populations de LT $\gamma\delta$ CD27⁺, une sous-population comme vue précédemment associée à une production importante d'IL-17A (Figure J). De plus dans un modèle de réponse immunitaire simple utilisant un agoniste TLR, le blocage du récepteur à l'IL-7 entraîne une abrogation quasi-totale de l'expansion des LT $\gamma\delta$ 17, tandis que celle du pool de LT $\gamma\delta$ producteurs d'IFN- γ reste inchangée par rapport aux souris contrôles (Michel et al., 2012). Le blocage de l'IL-7R inhibant le développement de lésions inflammatoires dans des maladies auto-immunes telles que l'arthrite rhumatoïde (van Roon et al., 2005), la sclérose multiple (Haas et al., 2011) ou le psoriasis (Bonifati et al., 1997), il est possible que ces effets reposent, au moins en partie, sur une dérégulation de l'activité des LT $\gamma\delta$ 17. Toutefois, l'utilisation de l'IL-7 comme « booster » des réponses IL-17 induites par les LT $\gamma\delta$ 17 n'a jamais été testée. Ceci pourrait d'ailleurs être

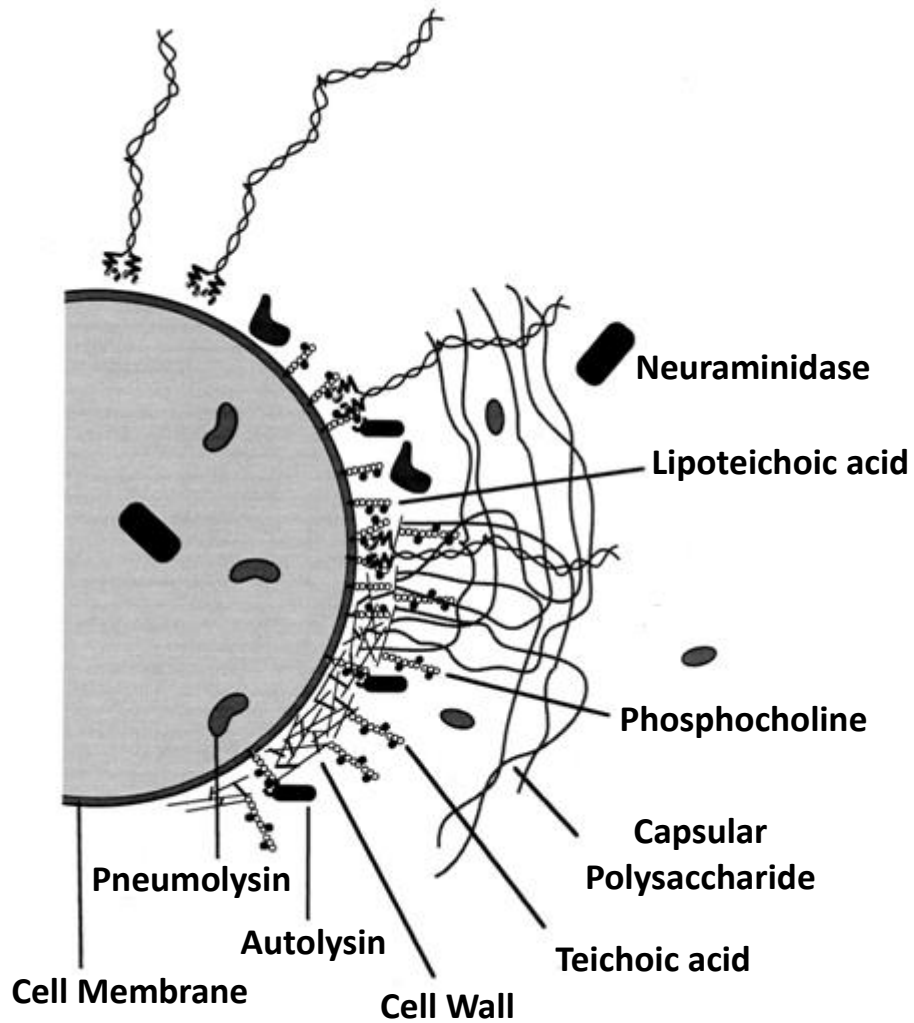
intéressant à évaluer dans des modèles d'infections bactériennes dans lesquelles cette cytokine joue un rôle bénéfique avéré. A l'instar des $LT\gamma\delta$, une sous-population particulière de lymphocytes NKT est capable de produire préférentiellement des cytokines de type Th17 (Michel et al., 2007). A la différence des lymphocytes NKT « conventionnels » dont la survie dépend de l'IL-15 (Gordy et al., 2011), les cellules NKT productrices d'IL-17 ne requièrent pas la présence de l'IL-15 pour leur survie. Par contre, l'IL-7 semble être une cytokine indispensable à leur maintien en périphérie (Webster et al., 2014) (Figure J). Enfin, les MAIT, une troisième population de lymphocytes T non conventionnels est connue pour produire de grandes quantités d'IL-17 (Le Bourhis et al., 2011). Dans ce contexte, l'IL-7 au niveau hépatique semble « éduquer » les MAIT pour leur permettre de produire des quantités plus importantes d'IL-17 (Tang et al., 2013). Les ILC3 sont également capables de produire des cytokines de type Th17 (Colonna et al., 2009). De façon similaire aux lymphocytes T non conventionnels, la déficience en IL-7 impacte négativement sur l'homéostasie des ILC3 intestinales mais sans effet majeur sur les ILC1 (Satoh-Takayama et al., 2010).

Ainsi un lien universel semble exister entre l'IL-7 et l'homéostasie des populations lymphocytaires innées productrices d'IL-17. Ceci nous permet également de mieux comprendre le tropisme préférentiel de ces cellules pour les muqueuses, un tissu riche en IL-7 produit par l'épithélium et les cellules stromales. Toutefois, aucune étude n'a pour le moment tenté de tirer à profit cette particularité à des fins thérapeutiques. En effet, il paraîtrait intéressant de tenter de « booster » le pool de cellules innées productrices d'IL-17 via l'administration d'IL-7 afin de prévenir certains types d'infections bactériennes au niveau des muqueuses.



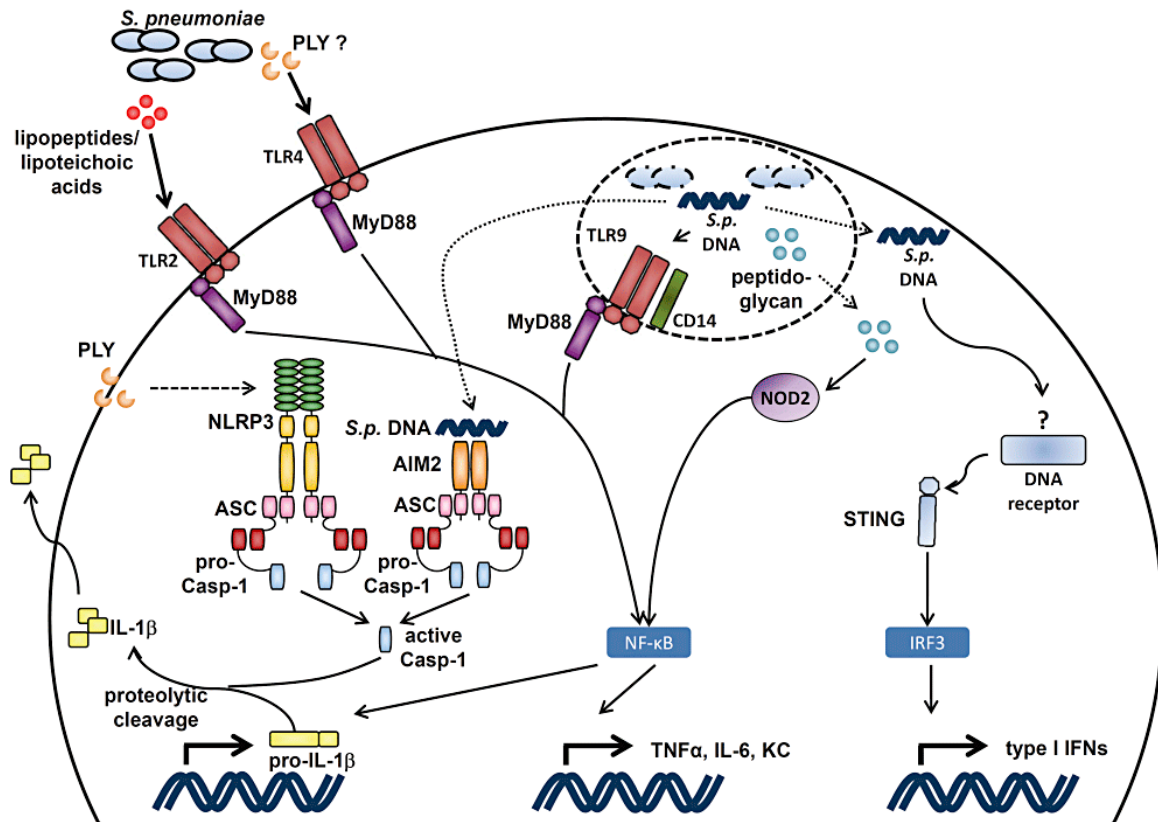
Brown et al., Nature Reviews Microbiology 2015

Figure A: Structure de la paroi des bactéries à Gram positif. Les bactéries à Gram positif possèdent une membrane lipidique unique entourée par une paroi cellulaire composée d'une couche épaisse de peptidoglycane et d'acides lipotéichoïques.



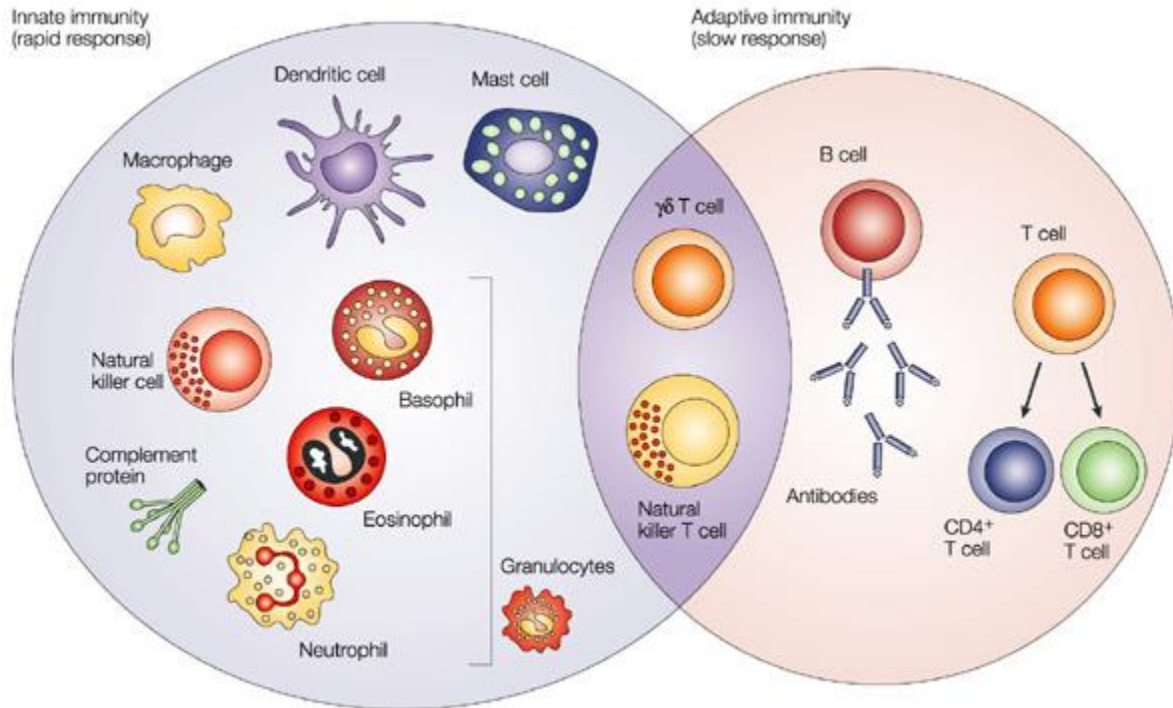
Modified from Briles et al., Clinical Microbiology Reviews 1998

Figure B: Représentation de la surface cellulaire pneumococcique.



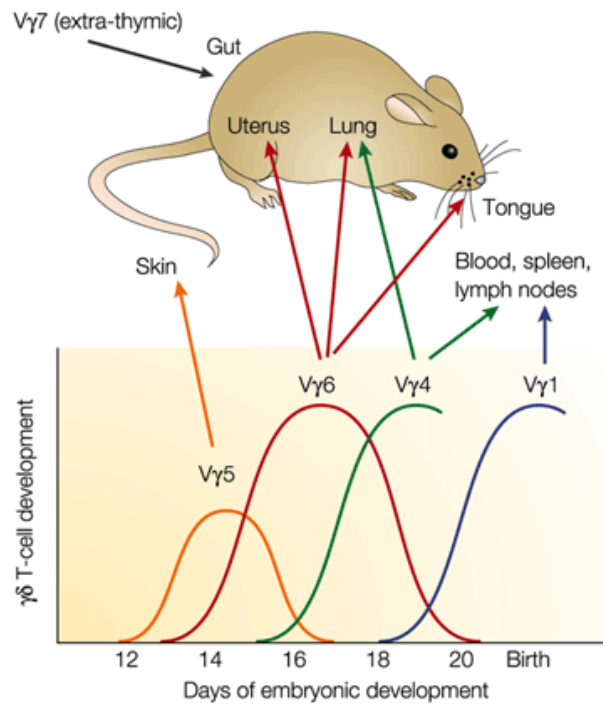
Koppe et al., Cellular Microbiology 2012

Figure C: Présentation des PRRs impliqués dans la reconnaissance de *S. pneumoniae*. Des composants de la paroi cellulaire du pneumocoque et PLY sont reconnus par TLR2 et TLR4 respectivement. *S. pneumoniae* est internalisée par les cellules phagocytaires et dégradée dans les phagosomes entraînant la libération du peptidoglycane bactérien et d'acides nucléiques. L'ADN non méthylé contenant du CpG est détecté par TLR9 dans les endosomes, alors que d'autres composants bactériens peuvent avoir accès au cytosol dû à la rupture de la membrane dépendante du PLY. L'ADN pneumococcique est détecté par AIM2. Les TLRs, ainsi que NOD2, stimulent la production de cytokines dépendantes du NF- κ B, telles que le TNF α , l'IL-6, le KC et le pro-IL-1 β . TNF α , IL-6 et KC sont produits après translation, alors que la production d'IL-1 β requiert un deuxième signal. Les inflammasomes NLRP3 et AIM2 sont activés par PLY et l'ADN bactérien respectivement, entraînant le clivage du pro-IL-1 β en IL-1 β mature.



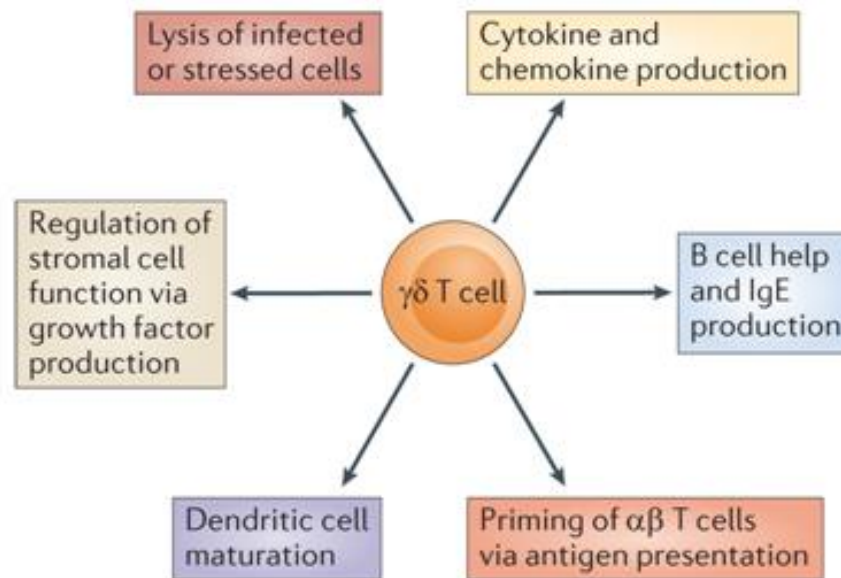
Dranoff et al., Nature Reviews Cancer 2004

Figure D: Réponse immunitaire innée et adaptative. La réponse immunitaire innée agit comme première ligne de défense contre l'infection. Elle est représentée par des facteurs solubles, tels que les protéines du complément, et divers composants cellulaires dont les granulocytes (basophiles, éosinophiles et neutrophiles), les mastocytes, les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes Natural Killer. La réponse adaptative est plus lente à se mettre en place, mais présente une spécificité et une réponse mémoire plus importantes. Elle est représentée par les anticorps, les cellules B et les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺. Les cellules T Natural killer et gamma-delta sont des lymphocytes présents à l'interface entre l'immunité innée et adaptative.



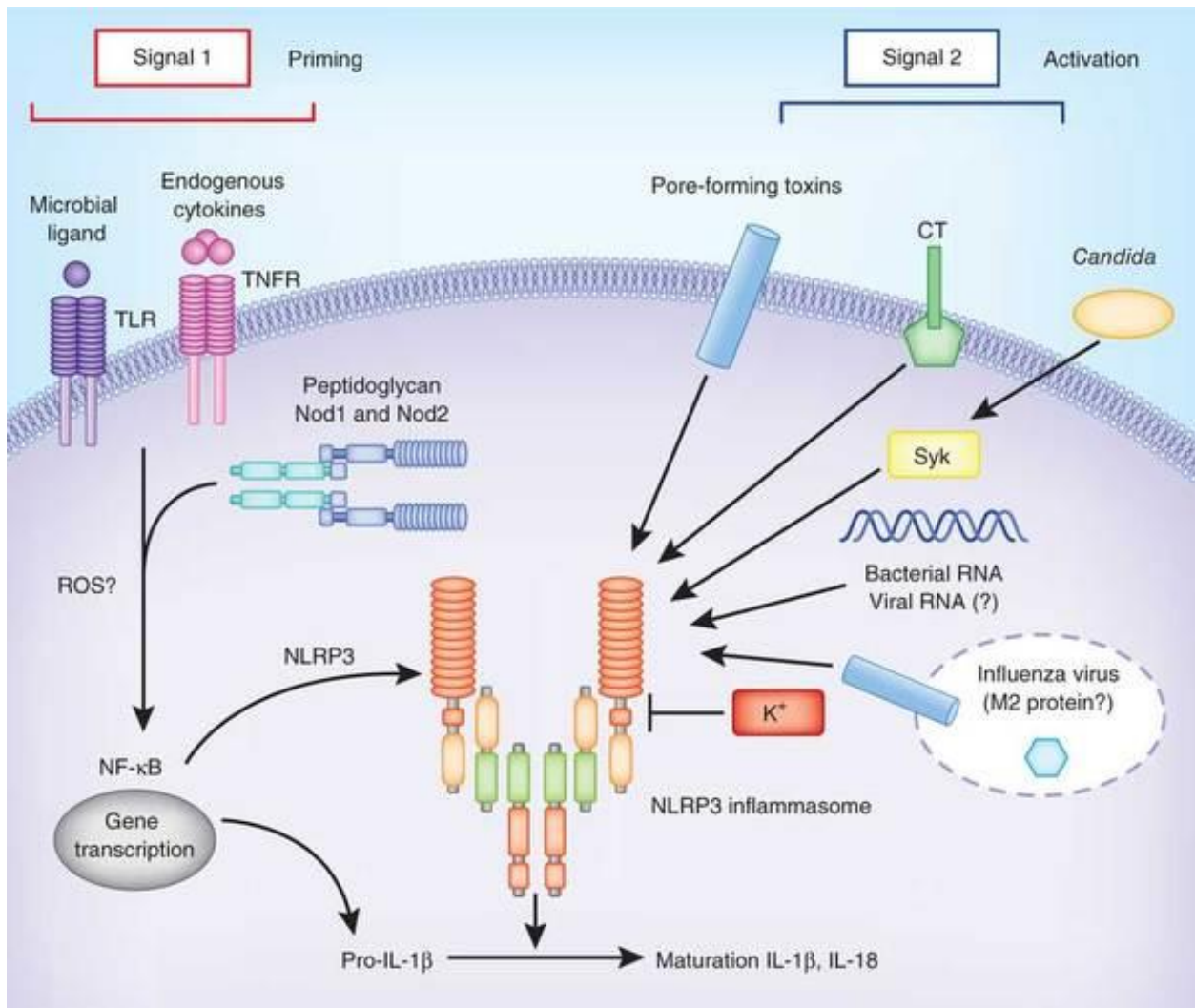
Carding et al., Nature Reviews Immunology 2002

Figure E: Ontogénie des lymphocytes T $\gamma\delta$. Les cellules T gamma-delta sont exportées à partir du thymus à des périodes définies du développement fœtal et néonatal, et migrent ensuite et peuplent différents tissus épithéliaux chez les animaux adultes.



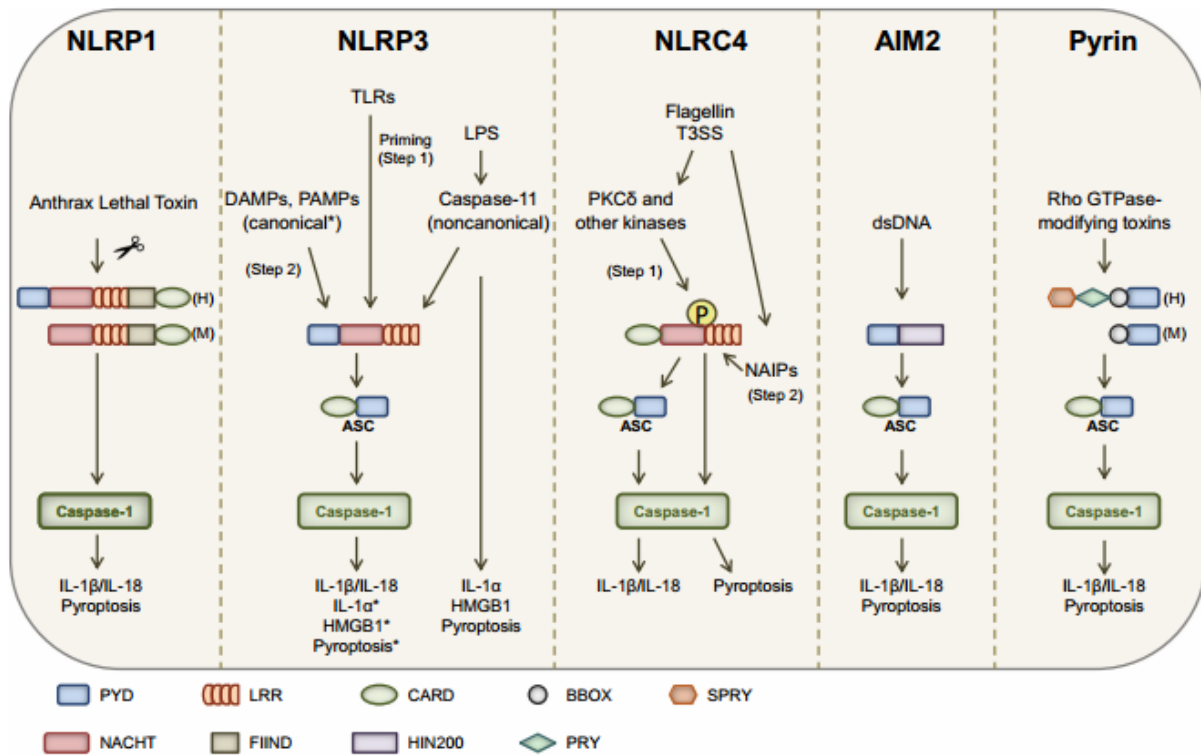
Vantourout et al., Nature Reviews Immunology 2013

Figure F: Fonctions des cellules T gamma-delta. Les cellules T gamma-delta peuvent avoir un rôle central important dans la défense de l'hôte contre une large gamme de stress stériles ou infectieux. Ce rôle est atteint via 6 mécanismes. 1- Les lymphocytes T $\gamma\delta$ peuvent directement lyser et éliminer les cellules stressées ou infectées suite à la production de granzymes. 2- Elles peuvent produire des cytokines et des chimiokines leur permettant de réguler d'autres cellules immunitaires et non-immunitaires. 3- Elles peuvent aider les cellules B et promouvoir la production d'IgE. 4- Elles peuvent présenter des antigènes pour le priming des cellules T $\alpha\beta$. 5- Elles peuvent jouer un rôle dans la maturation des cellules dendritiques. 6- Elles peuvent réguler la fonction des cellules stromales via la production de facteurs de croissance.



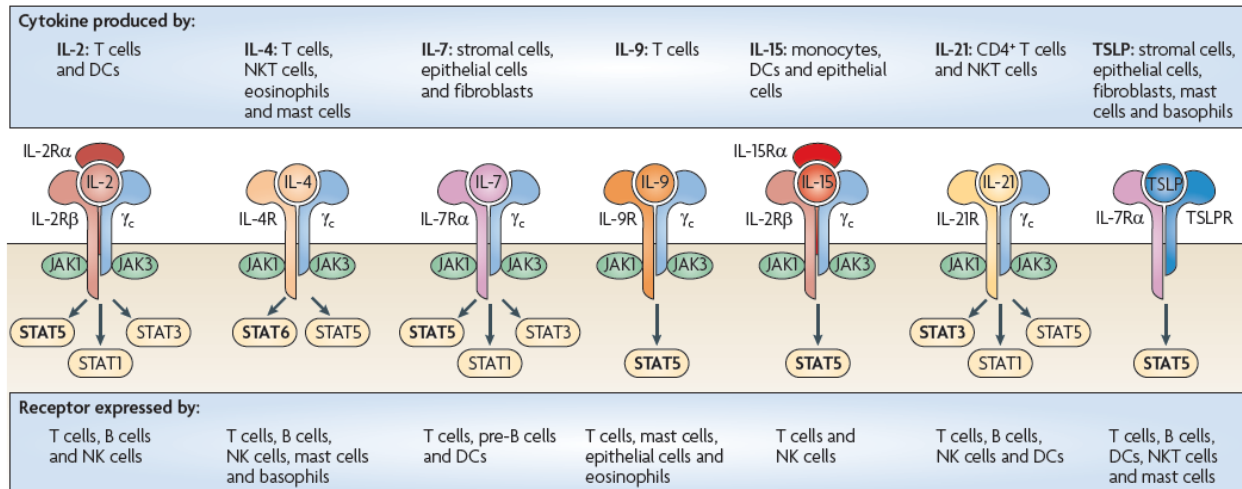
Franchi et al., Nature Immunology 2012

Figure G: Activation de l'inflammasome NLRP3. L'activation de la caspase-1 par l'inflammasome NLRP3 requiert deux signaux. Le signal 1, induit par des motifs microbiens conservés ou certaines cytokines, est nécessaire pour la surexpression des protéines NLRP3 et pro-IL-1 β . Le signal 2 induit la formation d'un complexe multi-protéique nommé inflammasome. Ce signal 2 est induit par certaines bactéries telles que *S. aureus*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae* et *V. cholerae* via la synthèse de différentes toxines spécialisées dans la formation de pores à la membrane plasmique. D'autres toxines bactériennes telles que la toxine cholérique, le virus influenza, *Candida albicans* ou de l'ARN bactérien cytosolique peuvent induire l'activation de l'inflammasome NLRP3.



Saavedra et al., Seminars in Immunopathology 2015

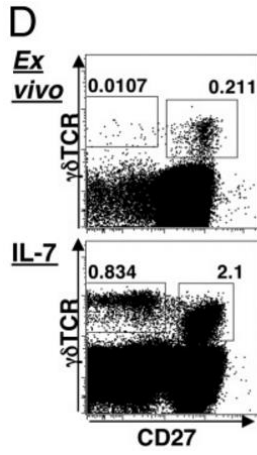
Figure H: Présentation des inflammasomes actuellement caractérisés. En fonction du stimulus, des inflammasomes particuliers sont assemblés pour recruter et activer la pro-caspase-1, aboutissant à la maturation et la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18 ainsi que l'induction de la pyroptose.



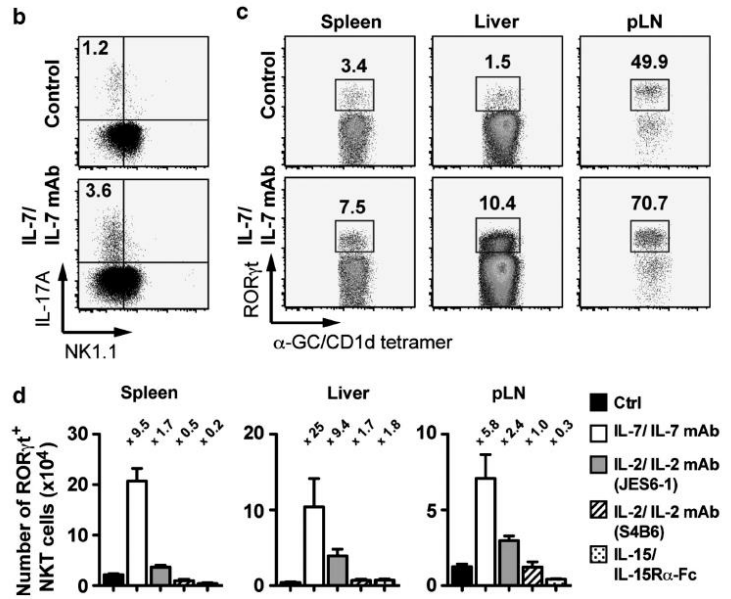
Rochman et al., Nature Reviews Immunology 2009

Figure I: Les récepteurs à l'interleukine-2 (IL-2), IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-21 et de la lymphopoïétine stromale thymique (TSLP). L'IL-2 et l'IL-15 sont les seules cytokines possédant un récepteur à 3 sous-unités. Les récepteurs de ces 2 cytokines partagent la chaîne γ commune avec les autres interleukines de cette famille, et les récepteurs à l'IL-7 et au TSLP partagent l'IL-7R alpha. La chaîne γ commune aux différents récepteurs de cette famille recrute Janus kinase 1 (JAK1) et JAK3. Le recrutement et la phosphorylation des facteurs de transcription STAT principaux pour chaque voie sont représentées en gras.

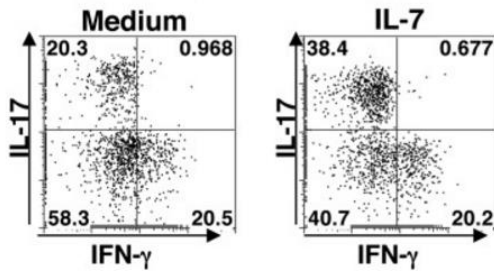
$\gamma\delta$ T cells



NKT cells



G



Michel et al., PNAS 2012

Webster et al., Mucosal Immunology 2014

Figure J: L'IL-7 favorise l'homéostasie et l'expansion des lymphocytes T $\gamma\delta$ et NKT producteurs d'IL-17.

Objectif

Mon projet de thèse avait pour but principal **d'étudier les fonctions mais aussi les mécanismes d'activation des lymphocytes T $\gamma\delta$ producteurs d'IL-17** (avec un intérêt particulier pour la sous-population CD3^{bright}) au cours de réponse immunitaire de l'hôte dans un modèle d'infection respiratoire à *S. pneumoniae*.

Notre hypothèse de travail suggérant un rôle bénéfique et protecteur de l'IL-17 dans notre modèle d'étude, nous avons eu pour ambition de **moduler l'environnement pulmonaire afin d'obtenir une meilleure réponse IL-17** au moment de l'infection. Pour cela, nous avons utilisé une approche prophylactique, basée sur l'utilisation de l'IL-7, une cytokine récemment démontrée comme jouant un rôle important dans l'homéostasie et l'activation des populations immunitaires innées productrices d'IL-17 comme les lymphocytes T $\gamma\delta$ et les lymphocytes NKT.

Mon projet de thèse a ainsi pour ambition de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-tendant la synthèse d'IL-17 par les lymphocytes T innés dans les premiers stades de l'infection à pneumocoque afin de proposer et/ou développer, dans le futur, de nouvelles stratégies prophylactiques/thérapeutiques basées sur le ciblage de populations lymphocytaires innées productrices de cette cytokine comme les lymphocytes T $\gamma\delta$.

Matériels et Méthodes

Matériels et Méthodes

Souris

Des souris wild-type males C57BL/6J de 8 à 12 semaines ont été achetées de chez Janvier (Le Genest-St-Isle, France). Les souris C57BL/6J TCR δ -KO (*Tcrd*^{-/-}), IL-17A-KO (*Il17a*^{-/-}), NKT type I-KO (*Ja18*^{-/-}) et ROR γ T-eGFP ont été élevées à l'institut Pasteur de Lille. Les souris C57BL/6J IL-1R1-KO (*Il1r1*^{-/-}) et IL-23p19-KO (*Il23p19*^{-/-}) ont été élevées à l'université d'Orléans (INEM, CNRS UMR 7355, Orléans, France). Les souris C57BL/6J *Nlrp3*^{-/-}, *Asc*^{-/-}, *Casp1/11*^{-/-} et *Tnfrsf1a*^{-/-} ont été élevées à l'université de Gand (Campus VIB). L'élevage a été réalisé dans des conditions "pathogen-free".

Echantillons humains

Le sang périphérique a été collecté d'individus sains non-fumeurs. Un consentement explicatif écrit a été reçu par les participants avant leur inclusion dans l'étude, selon le comité d'éthique sur les expérimentations humaines.

Réactifs et Anticorps

Les anticorps anti-IL-1 β , anti- Ly6G (NIMP-R14), anti-TNF- α (XT3.11) et leurs isotypes contrôles ont été achetés de chez Bio X Cell (Etats Unis) ou R&D (Lille, France). Les anticorps monoclonaux murins contre CD45 (conjugué à l'APCCy7, BV421, FITC, AF700, PeCy7 ou PE), CD3 (conjugué au Pacific Blue ou PerCPCy5.5), TCR δ (conjugué au PerCpCy5.5), TCR β (conjugué au FITC, V450 ou APC), NK1.1 (conjugué au PeCy7, PE ou FITC), Ly6G (conjugué à l'APC-Cy7, AF700 ou FITC), CD11b (conjugué au PerCPCy5.5 ou FITC), Siglec F (conjugué au Pe-CF594 ou BV421), CD11c (conjugué à l'APC ou FITC), MHCII (conjugué à l'AF700 ou

FITC), CD4 (conjugué au PE, efluor 450 ou PerCPCy5.5), CD127 (conjugué au PeCy7), CD90.2 (conjugué à l'AF700 ou BV510), V γ 1 (conjugué à l'APC), V γ 4 (conjugué au PeCy7), F4/80 (conjugué au PeCy7), CD19 (conjugué à l'APC ou FITC), Gr-1 (conjugué au FITC), CD27 (conjugué au PeCy7), IL-17A (conjugué au PE), TNF- α (conjugué au PE), pro-IL-1 β (conjugué au PE) et les isotypes contrôles ont été achetés de chez BioLegend, BD Pharmingen et eBioscience. Le glycolipide chargé PBS-57 et les tétramères CD1d contrôles non chargés (conjugués à l'APC ou PE) ont été achetés de l'institut national d'allergie et de maladies infectieuses (Atlanta, GA). L'IL-7 murin recombinant a été acheté d'eBioscience. L'anticorps monoclonal anti-IL-7 (clone M25) a été acheté de chez Bio X Cell. L'anticorps de détection du TCR V γ 6V δ 1 (clone 17D1) a été offert par Pr. R. Tigelaar (Université de Yale). L'iodure de propidium (PI) a été acheté de chez BD Pharmingen. Le TNF- α recombinant murin et humain a été acheté de chez eBioscience, le MCC950 de chez Sigma-Aldrich, les liposomes de clodronate et les liposomes contrôles de chez ClodLip BV (Amsterdam) et l'IL-23 et l'IL-1 β de chez Peprotech. La pneumolysine recombinante a été exprimée dans *E. coli* et purifiée. Les kits ELISA murins et humains sont de chez R&D et eBioscience.

Infection par S. pneumoniae

S. pneumoniae sérotype 1 a été utilisée dans cette étude. Pour certaines expériences, des souches de D39 parentale ou mutée (*ply::cat*) ont été utilisées. Les souris ont été anesthésiées et infectées par voie intranasale (i.n.) par 50 μ l de PBS contenant la bactérie vivante.

Déplétion des neutrophiles et des macrophages alvéolaires

Les neutrophiles ont été déplétés 24 h avant l'infection par *S.p.* en utilisant un anticorps anti-Ly6G (100 µg/souris i.p., clone: NIMP-R14). Les macrophages alvéolaires ont été déplétés en utilisant des liposomes de clodronate. Les liposomes de clodronate et les liposomes contrôles ont été administrés 2 fois par voie i.n. (48 et 24 h avant l'infection) (50 µl/souris).

Mesure des taux de cytokines dans les poumons

Les poumons perfusés ont été collectés dans l'azote liquide en attendant qu'ils soient manipulés. Une solution d'anti-protéase a été préparée en dissolvant une tablette d'anti-protéase (25x) dans 2 ml d'eau distillée. La solution d'extraction des protéines tissulaires T-Per (1 ml) contenant 1x de la solution d'anti-protéase a été ajoutée aux poumons qui sont ensuite homogénéisés pour 1 min. Les lysats de poumons ont été conservés sur la glace pour 20 min puis centrifugés à 10 000 rpm pour 15 min. Les surnageants ont été collectés dans des eppendorfs stériles et conservés à -20° jusqu'à l'analyse des cytokines.

Préparation des cellules immunes pulmonaires

Les souris traitées avec l'anti-TNF- α (150 µg/souris i.p.) ou son isotype contrôle, ou celles qui sont traitées tous les 2 jours avec une dose du complexe IL-7 (400 ng/souris)/ M25 (2 µg/souris) (3 doses en total) en i.n. ont été infectées ou non par *S. pneumoniae*. Les cellules pulmonaires mononucléaires (MNCs) ont été préparées selon les procédures classiques. Brièvement, les poumons ont été perfusés par du PBS 2% FCS, excisés et finement hachés, suivi par une digestion enzymatique pour 20 min à 37°C dans du PBS contenant 1 mg/ml de collagénase type VIII (Sigma-Aldrich) et 1 µg/ml de DNase type I (Roche). Après lavage, les homogénats pulmonaires ont été

suspendus dans un gradient de Percoll™ 20%, et centrifugés à 2000 rpm sans arrêt à la température ambiante pour 15 min. Le culot était ensuite lavé avec du PBS 2% FCS et les globules rouges ont été éliminés en utilisant une solution de lyse (Sigma-Aldrich).

Marquage des leucocytes pulmonaires vasculaires vs interstitiels

Les souris anesthésiées ont été injectées par 2 µg d'anti-CD45 marqué au PeCy7 (clone: 30-F11) via la veine retro-orbitale. L'anticorps est ensuite laissé circuler pour 5 min afin de marquer tous les leucocytes dans l'espace vasculaire. Après perfusion (pour éliminer les leucocytes circulants), les poumons ont été collectés et les MNCs pulmonaires ont été préparés comme décrit précédemment. La suspension cellulaire a été ensuite marquée par des anticorps appropriés pour la détection des populations cellulaires puis par de l'anti-CD45 conjugué au PE (clone I3/2.3) afin de marquer tous les leucocytes pulmonaires dont les leucocytes marginaux et interstitiels. Les leucocytes marginaux ont été définis comme des cellules double positives pour CD45-PeCy7 et CD45-PE, et les leucocytes interstitiels comme des cellules négatives pour CD45-PeCy7 et positives pour CD45-PE.

Tri cellulaire et essais in vitro/ex vivo

Les poumons ont été collectés de souris naïves ou infectées et les suspensions cellulaires ont été préparées comme décrit précédemment. Les cellules ont été ensuite triées en utilisant un trieur Aria (BD Biosciences). Afin de purifier les cellules T $\gamma\delta$, les MNCs pulmonaires ont été marqués par un anti-CD3 (conjugué au PB), anti-TCR δ (conjugué au PerCp-Cy5.5) et anti-CD27 (conjugué au PeCy7). Pour la purification des neutrophiles, les MNCs pulmonaires ont été marqués par un anti-Ly6G (conjugué au FITC) et anti-CD11b (conjugué au PerCp-Cy5.5). Après marquage

cellulaire, les cellules ont été triées en utilisant un FACS Aria (BD Biosciences). Ce protocole présente > 98% de pureté cellulaire comme évalué par FACS. Dans certaines expériences, les neutrophiles pulmonaires ont été enrichis en utilisant une sélection positive (anti-Ly6G) sur une colonne LS via un séparateur MidiMACS™ (Miltenyi Biotec). La pureté après l'enrichissement MACS était entre 85 et 90%. Pour les essais de stimulation *in vitro*, les neutrophiles ont été cultivés pour 3 h dans un milieu complet RPMI 5% FCS contenant du TNF- α recombinant, puis la pneumolysine a été ajoutée pour 90 min supplémentaires. Les cellules T $\gamma\delta$ CD27⁻ ou CD27⁺ purifiées ont été cultivées 20 h dans un milieu complet contenant de l'IL-23 recombinant (1 ng/ml), et/ou de l'IL-1 β recombinant (1 ng/ml), ou du milieu conditionné provenant de neutrophiles cultivés isolés de souris infectées ou naïves. Dans certains cas, de l'anti-IL-1 β (5 μ g/ml) a été ajouté au milieu de culture.

Pour les essais de stimulation *in vitro* des cellules pulmonaires provenant des souris WT, *Tcrd*^{-/-} et *Ja18*^{-/-} traitées ou non avec l'IL-7, les leucocytes provenant des suspensions cellulaires ont été cultivés 20 h dans un milieu complet contenant du PMA (100 ng/ml) et de l'ionomycine (1 μ g/ml).

Marquage FACS intracellulaire et cytopins

Les poumons ont été collectés à des temps différents et les MNCs ont été préparés comme décrit précédemment. Les cellules ont été incubées dans du RPMI 1640 5% FCS contenant du Golgi Plug/Golgi Stop (BD Biosciences) pour 2 h à 37°C. Ensuite, les cellules ont été incubées avec des dilutions appropriées des différents anticorps pour 30 min dans du PBS 2% FCS. Les cellules étaient ensuite lavées et fixées en utilisant une solution de fixation (eBioscience, CliniSciences, Montrouge, France). Les cellules fixées étaient ensuite perméabilisées dans une solution tampon de perméabilisation (eBioscience), selon les instructions du fabricant. Les cellules étaient

marquées par des anticorps conjugués au PE contre TNF- α , IL-17A ou pro-IL-1 β et analysées sur LSR Fortessa ou Canto II (BD Biosciences). Les analyses FACS ont été réalisées en utilisant le logiciel FlowJo. Une analyse cellulaire basée sur la morphologie a été réalisée sur les cytopins provenant des préparations du lavage broncho-alvéolaire des souris PBS ou infectées par *S.p.* et marqués ensuite selon la coloration May-Grünwald Giemsa.

Western blot

Les lysats protéiques des neutrophiles pulmonaires ont été préparés dans 1% NP-40 contenant une solution tampon de lyse. Le lysat des protéines a été dénaturé en le portant à ébullition dans une solution tampon et un SDS-PAGE est réalisé. Les protéines séparées ont été ensuite transférées sur des membranes PVDF et marquées en utilisant des anticorps primaires contre IL-1 β (GeneTex), NLRP3 (AdipoGen) et β -actine couplée au HRP (Santa Cruz). Les membranes ont été ensuite exposées aux anticorps secondaires correspondants (Jackson Immuno Research).

Isolement et culture des cellules humaines

Afin d'obtenir les leucocytes totaux, les échantillons sanguins collectés dans des tubes héparinés ont été traités par une solution EL (Qiagen) selon les instructions du fabricant afin d'éliminer les érythrocytes. Les neutrophiles ont été ensuite isolés comme décrit précédemment. Cette méthode présentait une pureté de >85% comme évalué par FACS et par la coloration May-Grünwald Giemsa (Sigma Aldrich). Les cellules (4×10^5 /puits) ont été cultivées pour 3 h dans un milieu complet RPMI 5% FCS contenant du TNF- α recombinant humain (100 ng/ml), puis de la pneumolysine (500 ng/ml) a été ajoutée pour 90 min supplémentaires. Après culture, la viabilité cellulaire a été évaluée par marquage à l'iodure de propidium.

Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel GraphPad Prism. La signification du test statistique a été évaluée en utilisant les tests non-paramétriques Mann-Whitney *U* ou Kruskal-Wallis (suivi par un Dunn's post-test) afin de comparer les moyennes des réplicats biologiques. Les taux de survie suite à l'infection par *S. pneumoniae* ont été analysés en utilisant un test log-rank. Les résultats présentant une valeur *P* moins que 0.05 ont été considérés significatifs. Ns: non significatif; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

Résultats

I. Mécanismes d'activation des cellules T $\gamma\delta$ productrices d'IL-17A au cours de l'infection respiratoire par *S. pneumoniae*.

L'IL-17A joue un rôle antibactérien important et précoce au cours de l'infection pulmonaire à *Streptococcus pneumoniae*.

Afin d'étudier le rôle de l'IL-17A dans la résistance de l'hôte dans un modèle expérimental d'infection pneumococcique invasive, nous avons utilisé des souris génétiquement modifiées incapables de produire cette cytokine (*Il17a^{-/-}*, C57BL/6). Ainsi nous avons pu montrer que la déficience en IL-17A impacte négativement sur la survie des animaux (**Fig. 1a**). De plus, l'absence d'IL-17A se traduit par un moins bon contrôle de la charge bactérienne dans leurs poumons ainsi qu'une dissémination en systémique du pathogène plus importante (**Fig. 1b**). Nos résultats montrent également une réduction du recrutement neutrophilique au cours de l'infection (**Fig. 1c**). Les polynucléaires jouent un rôle central dans l'élimination des pathogènes extracellulaires comme le pneumocoque (Mizgerd et al., 2008). Nous avons pu confirmer ceci dans notre modèle car la déplétion sélective en neutrophiles (en utilisant un anticorps déplétant anti-Ly6G) entraîne une mort significativement plus précoce des animaux traités (**Fig. 1d**). Ainsi nos résultats indiquent un rôle central de l'IL-17A dans le contrôle de la charge bactérienne et de la dissémination en contrôlant la neutrophilie.

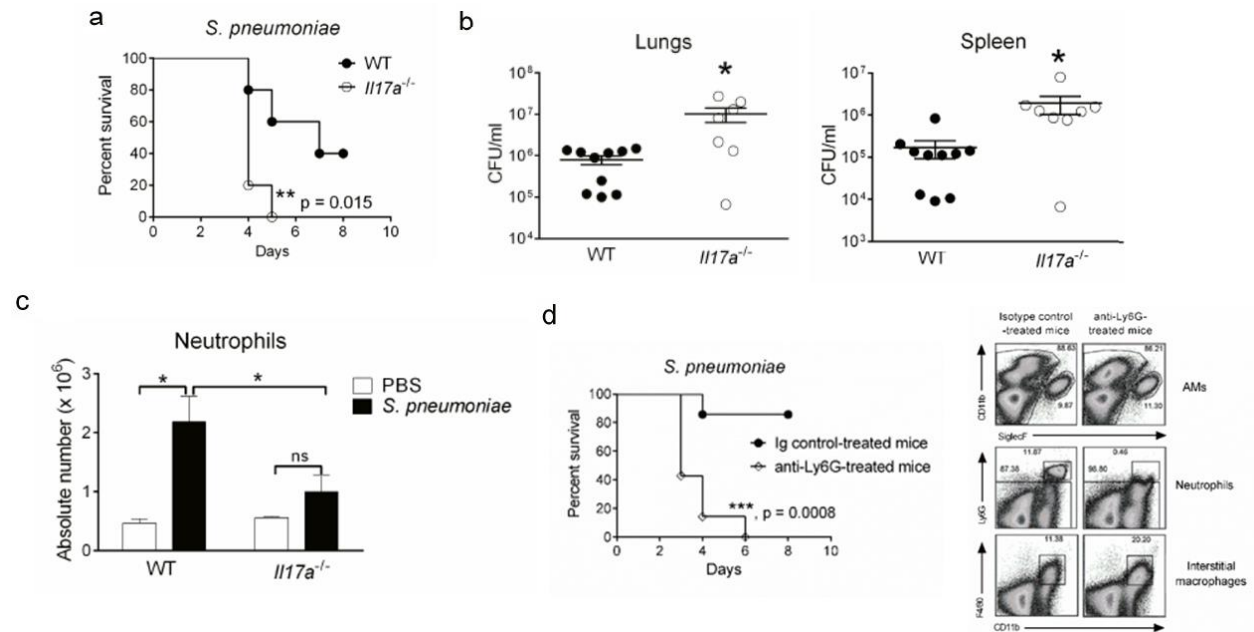


Figure 1: L'IL-17A est essentiel pour le contrôle de l'infection par *S. pneumoniae*. (a-d) Les souris C57BL/6 WT ou déficientes en IL-17A étaient infectées par *S.p.* (i.n.) (5×10^5 CFU) (a) La survie des souris était surveillée tous les jours (n = 10). (b) Le nombre de CFU était déterminé 60 h post infection (p.i.) dans les poumons (*panel gauche*) et les rates (*panel droit*). Les résultats d'une expérience représentative (n = 7-10, 2 expériences) sont montrés. (c) Le nombre absolu des neutrophiles pulmonaires était évalué par FACS (CD11b⁺ Ly6G⁺) 12 h p.i.. Les moyennes \pm SEM de 2 expériences (n = 4-5) ont été représentées. (d) La survie des souris WT prétraitées ou non par un anti-Ly6G (NIMP-R14; 100 μ g/souris) était surveillée tous les jours (n = 7) (*panel gauche*). La spécificité du traitement par l'anti-Ly6G a été évaluée par FACS. La fréquence des macrophages alvéolaires, neutrophiles et macrophages interstitiels parmi les cellules pulmonaires CD45⁺ des souris traitées par l'anti-Ly6G ou l'isotype contrôle était représentée dans le *panel droit*.

Les lymphocytes T $\gamma\delta$, en particulier la sous-population résidente V γ 6V δ 1⁺, constituent la source majeure et la plus précoce d'IL-17 au cours de l'infection.

Afin de déterminer la ou les sources majeures d'IL-17A dans les phases précoces de l'infection pneumococcique, nous avons réalisé une analyse par cytométrie en flux couplée à une approche de marquage intracellulaire. En réalisant un criblage large des populations immunes connues pour produire de l'IL-17A sous certaines conditions (**Fig. 2a**), nous avons pu identifier 3 populations lymphocytaires innées capables de produire de façon significative cette cytokine, les lymphocytes T $\gamma\delta$, les lymphocytes NKT et les cellules lymphoïdes innées (ILCs) (**Fig. 2b**). Toutefois, les lymphocytes T $\gamma\delta$ semblent être numériquement la principale source de cette cytokine (**Fig. 2b**). Sur la base de l'expression de leur TCR, nous avons pu démontrer que la population V γ 6V δ 1⁺ constitue la source principale d'IL-17A au sein de la population de lymphocytes T $\gamma\delta$ totale (**Fig. 2c**). Nous avons également pu confirmer grâce à l'utilisation d'un Ac spécifique nos résultats antérieurs suggérant, sur des bases génomiques (Paget et al., 2015), que les lymphocytes T $\gamma\delta$ CD3^{bright} expriment un TCR clonal V γ 6V δ 1 (**Fig. 2d**).

Afin d'expliquer leur aptitude à produire rapidement de grandes quantités d'IL-17A, nous avons émis l'hypothèse que les lymphocytes T V γ 6V δ 1⁺ pourraient avoir une localisation tissulaire particulière. Une analyse histologique ne permettant pas de pouvoir étudier les différentes populations de lymphocytes T $\gamma\delta$ (Wands et al., 2005), nous avons utilisé une stratégie par cytométrie en flux permettant de discriminer les cellules présentes dans le compartiment pulmonaire interstitiel des cellules marginalisées dans la vasculature (Barletta et al., 2012). De façon intéressante, il semble que la population V γ 6V δ 1⁺ soit presque exclusivement représentée dans le parenchyme tissulaire (**Fig. 2e**) alors que le reste de la population T $\gamma\delta$ (non-V γ 6V δ 1⁺)

est préférentiellement localisée dans le compartiment vasculaire (**Fig. 2e,f**). Il est à noter que cette distribution n'est pas affectée au cours de l'infection (**Fig. 2g**).

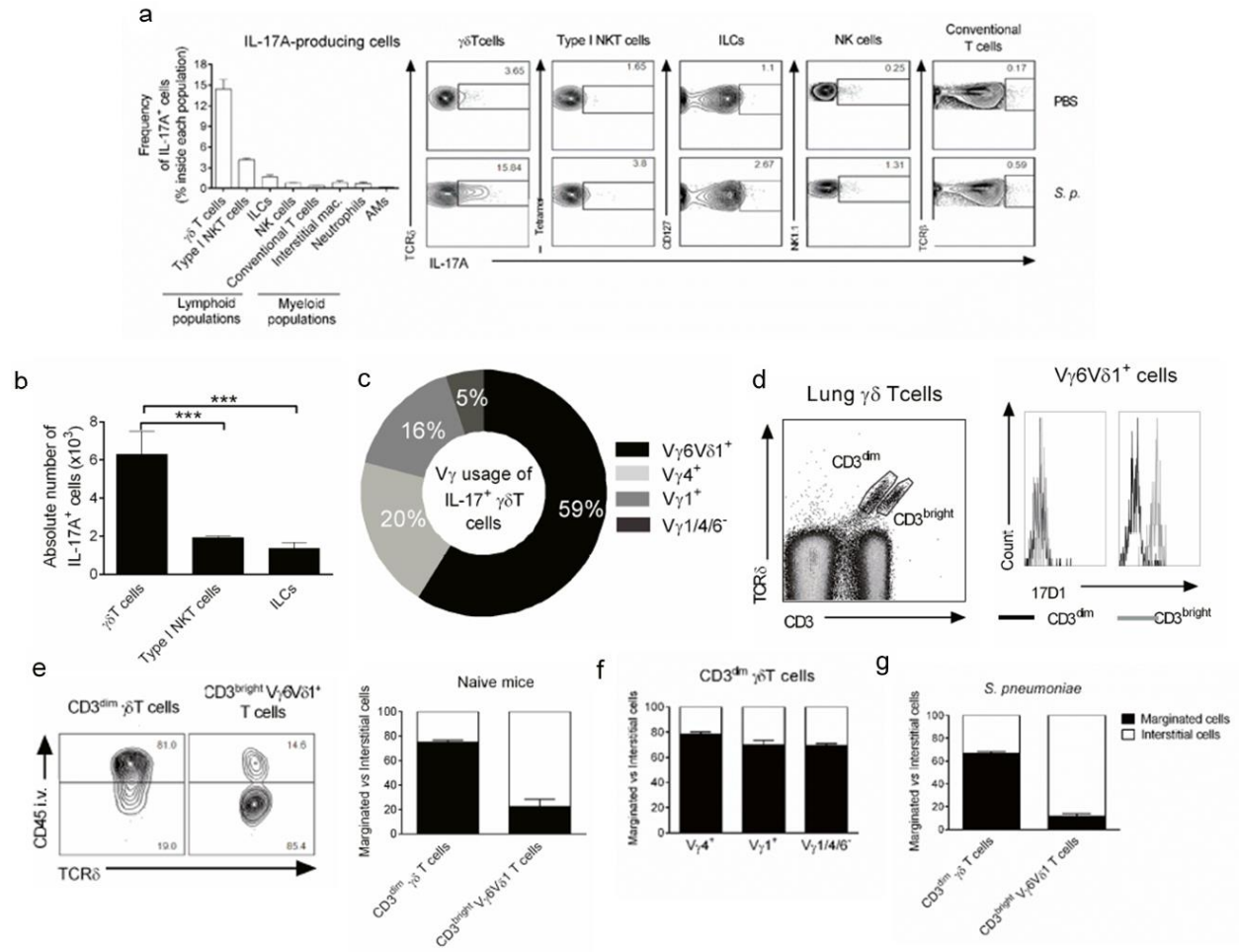


Figure 2: Les lymphocytes T V γ 6V δ 1⁺ sont la source principale d'IL-17A suite à l'infection par S.p.. (a) Les souris étaient infectées (i.n.) par S.p. (5×10^5 CFU) puis sacrifiées 12 h p.i.. Les cellules pulmonaires lymphoïdes et myéloïdes ont été évaluées pour la production intracellulaire d'IL-17A (*panel gauche*). Des dots plots représentatifs de la production d'IL-17A par les cellules lymphoïdes des souris contrôles et infectées ont été représentés dans le *panel droit*. (b) Le nombre absolu des populations lymphocytaires pulmonaires productrices d'IL-17A a été évalué par marquage intracellulaire 12 h p.i. (n = 8, 2 expériences). (c) Les cellules T $\gamma\delta$ IL-17A⁺ des souris infectées étaient analysées par FACS pour l'expression de la chaîne V γ 12 h p.i.. Une charte représentant les moyennes de 2 expériences était montrée (n = 6). (d) Un dot plot représentatif des cellules T $\gamma\delta$ pulmonaires est montré dans le *panel gauche*. Les cellules T $\gamma\delta$ CD3^{bright} vs CD3^{dim} ont été marquées en présence ou non de l'anticorps 17D1 (*panel droit*). (e) Les moyennes \pm SEM des populations CD45⁺ vs CD45⁻ provenant des poumons de souris naïves de 3 expériences (n = 6) sont représentées dans le *panel gauche*. Un dot plot représentatif du marquage anti-CD45 (*in vivo*) des populations $\gamma\delta$ a été représenté dans le *panel droit*. (f,g) La localisation des populations de cellules T $\gamma\delta$

dans les compartiments pulmonaires a été évaluée par une approche FACS. **(f)** Localisation des cellules T $\gamma\delta$ CD3^{dim} basée sur l'expression de la chaîne V γ chez les souris naïves. **(g)** Analyse des cellules CD3^{dim} vs CD3^{bright} V γ 6V δ 1⁺ chez les souris infectées par *S.p.* (12 h p.i.) (n = 4-5, 3 expériences).

Les lymphocytes T $\gamma\delta$ contrôlent la survie et la charge bactérienne au cours de l'infection par *S. pneumoniae*.

Au vue de ces résultats, nous avons étudié l'impact d'une déficience en lymphocytes T $\gamma\delta$ sur la réponse de l'hôte au cours de l'infection pneumococcique. Une fois comparées aux souris wild-type (WT) contrôles, les souris *Tcrd*^{-/-} infectées par *S.p.* succombent plus rapidement à l'infection (**Fig. 3a**). Cette susceptibilité accrue s'accompagne d'un déficit dans le contrôle de la répllication bactérienne dans les poumons et une dissémination accrue (**Fig. 3b**). En accord avec leur rôle dans la production d'IL-17A, les animaux déficients en lymphocytes T $\gamma\delta$ présentent une neutrophilie réduite (**Fig. 3c**). Pris dans leur ensemble, ces résultats montrent que les lymphocytes T $\gamma\delta$ jouent un rôle important dans le contrôle de la charge bactérienne médié par les neutrophiles probablement de façon IL-17-dépendante.

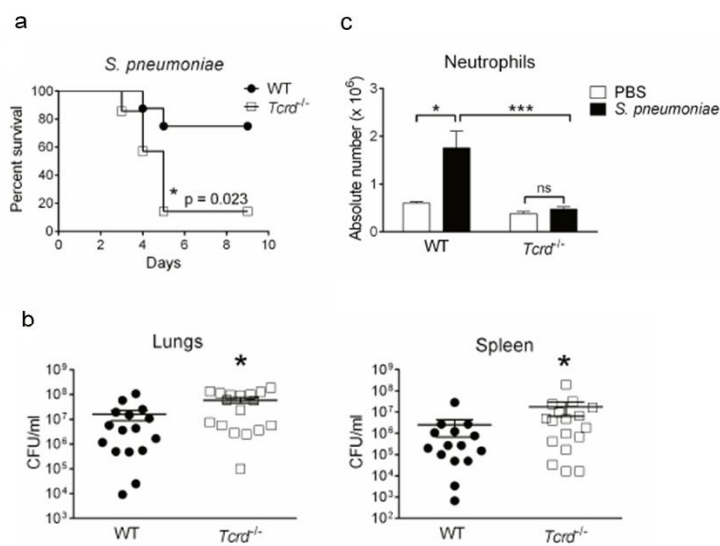


Figure 3: Les lymphocytes T $\gamma\delta$ jouent un rôle important dans le contrôle de l'infection pneumococcique. (a-c) Les souris WT et *Tcrd*^{-/-} ont été infectées par *S.p.* (5×10^5 CFU). (a) La survie des souris a été suivie tous les jours (n = 7-8). (b) Le nombre de CFU a été déterminé 60 h p.i. dans les poumons (*panel gauche*) et les rates (*panel droit*) (n = 16-17, 2 expériences). (c) Le nombre absolu des neutrophiles dans les poumons des souris WT ou *Tcrd*^{-/-} contrôles ou infectées par *S.p.* a été évalué par FACS 12 h p.i. (n = 7-8, 2 expériences).

L'IL-23 et l'IL-1 participent à la production d'IL-17A par les lymphocytes T $\gamma\delta$ durant l'infection par *S. pneumoniae*.

La production d'IL-17 par les lymphocytes T $\gamma\delta$ en contexte infectieux se fait en réponse à des cytokines activatrices telles que l'IL-23 et l'IL-1 β (Paget et al., 2015; Sutton et al., 2009). De façon intéressante, l'IL-23 et l'IL-1 β sont produites précocement au cours de l'infection pneumococcique (José et al., 2015; Ma et al., 2010). Dans ce contexte, nous avons utilisé des animaux *Il23a*^{-/-} et *Il1r1*^{-/-} afin d'évaluer la contribution respective de l'IL-23 et de l'IL-1 β dans la production d'IL-17A par les lymphocytes T $\gamma\delta$ pulmonaires. En adéquation avec notre hypothèse, le déficit en IL-23 ainsi que le blocage de la signalisation dépendante du récepteur à l'IL-1R semblait inhiber fortement la capacité des lymphocytes T $\gamma\delta$ à produire de l'IL-17A au cours de l'infection (**Fig. 4a**). Cette inhibition était logiquement associée à une réduction sévère du recrutement neutrophilique dans les poumons (**Fig. 4b**). Il est toutefois à noter que la fréquence des lymphocytes T CD3^{bright} V γ 6V δ 1⁺ chez les souris *Il23a*^{-/-} était significativement altérée en comparaison aux souris WT contrôles et *Il1r1*^{-/-} (**Fig. 4c**). Ainsi ces résultats démontrent que l'IL-23 et l'IL-1 β sont nécessaires pour la production d'IL-17A par les lymphocytes T $\gamma\delta$ et pour le recrutement neutrophilique suite à l'infection par *S. pneumoniae*.

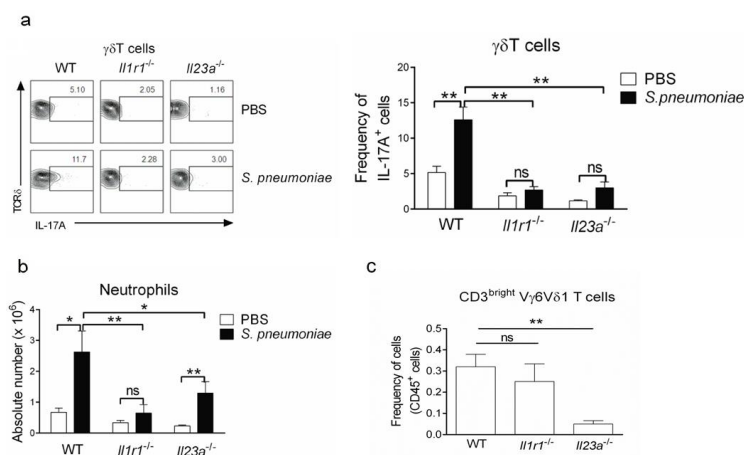


Figure 4: L'activation des cellules $\gamma\delta$ T17 dépend des signaux médiés par l'IL-23 et l'IL-1R. (a,b) Les souris C57BL/6 WT, *Il1r1*^{-/-} ou *Il23a*^{-/-} ont été infectées par *S.p.* et les cellules pulmonaires ont été analysées par cytométrie de flux 12 h p.i. (a) Des dots plots de production d'IL-17A par les cellules T $\gamma\delta$ (panel gauche). Fréquence des cellules T $\gamma\delta$ productrices d'IL-17A (panel droit). (b) Le nombre absolu des neutrophiles pulmonaires a été analysé (n = 6, 2 expériences). (c) La fréquence des cellules CD3^{bright} V γ 6V δ 1⁺ chez les souris naïves WT, *Il1r1*^{-/-} ou *Il23a*^{-/-} a été évaluée par FACS (n = 5, 2 expériences).

Les neutrophiles représentent la source majeure d'IL-1 β pulmonaire suite à l'infection pneumococcique.

A la vue de l'importance de l'IL-1 β dans l'activation des lymphocytes T $\gamma\delta$ producteurs d'IL-17A ($\gamma\delta$ T17), nous nous sommes ensuite intéressés à déterminer les sources cellulaires de cette cytokine dans notre modèle. L'IL-1 β étant exprimée en premier lieu sous une pro-forme biologiquement inactive (proIL-1 β), nous avons étudié par cytométrie en flux les principales populations exprimant la protéine inactive proIL-1 β . L'IL-1 β étant principalement dérivée de la lignée myéloïde, nous avons donc analysé la capacité des cellules myéloïdes pulmonaires à exprimer le proIL-1 β en réponse à l'infection pneumococcique. Malgré que l'infection par *S. pneumoniae* induit une augmentation du proIL-1 β dans toutes les populations cellulaires testées 6 h p.i. (**Fig. 5a**), nous avons pu observer que les neutrophiles semblent être la source principale de cette pro-cytokine (**Fig. 5b**). Afin de déterminer si les neutrophiles étaient capables de produire de l'IL-1 β bioactive, nous avons mis en culture des neutrophiles pulmonaires purifiés par enrichissement positif (MACS, anti-Ly6G) de souris naïves ou infectées par *S. pneumoniae*. L'analyse des surnageants de culture a pu démontrer par ELISA la présence d'un taux important d'IL-1 β dans les cultures de neutrophiles, alors qu'en revanche, des taux très faibles étaient observés dans la fraction négative non neutrophilique (**Fig. 5c**). De plus, la déplétion *in vivo* en neutrophiles réduisait fortement les taux d'IL-1 β retrouvés dans le poumon des souris infectées (**Fig. 5d**). Nos résultats mettent ainsi en évidence le rôle important des neutrophiles pulmonaires dans la production d'IL-1 β pendant la réponse précoce de l'hôte à l'infection pneumococcique.

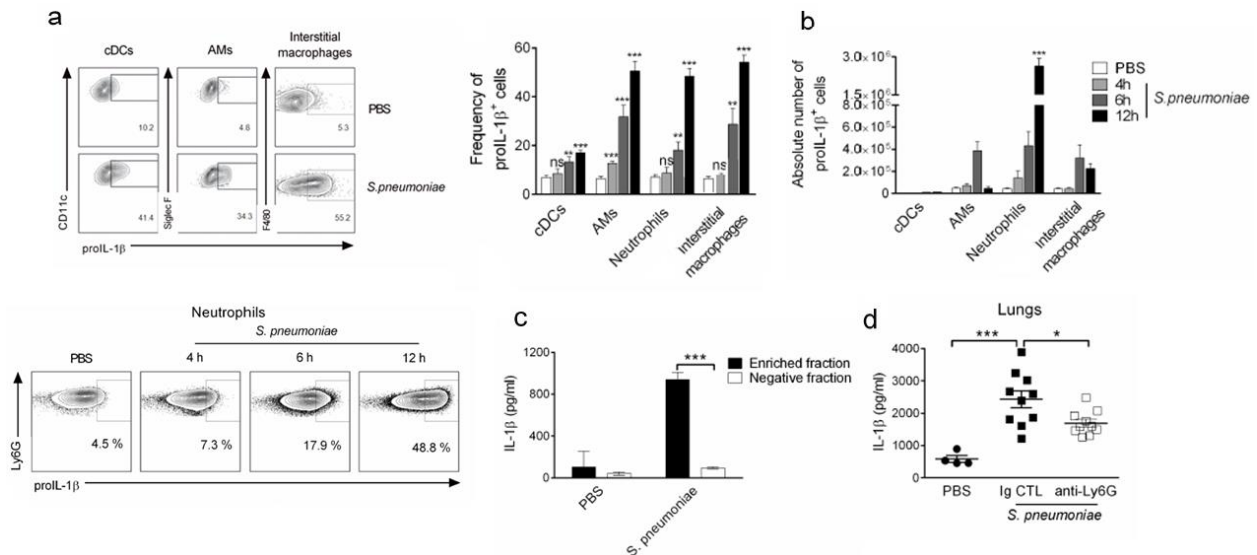


Figure 5: Les neutrophiles sont la source précoce majeure d'IL-1 β en réponse à l'infection pneumococcique.

(a,b) L'expression de proIL-1 β par les cellules myéloïdes provenant de souris WT contrôles ou infectées *S.p.* a été analysée par FACS. (a) Des dots plots représentatifs de l'expression de proIL-1 β par les cDCs, AMs et macrophages interstitiels (*panel gauche*) 12 h p.i., et par les neutrophiles à différentes cinétiques (*panel en bas*). Fréquence des cellules myéloïdes proIL-1 β ⁺ analysée à différentes cinétiques suite à l'infection pneumococcique (*panel droit*). (b) Nombre absolu des cellules myéloïdes proIL-1 β ⁺ analysée à différentes cinétiques p.i.. (c) 4 x 10⁵ neutrophiles pulmonaires enrichis par MACS provenant de souris naïves ou infectées par *S.p.* (12 h p.i.) ont été incubés pendant 3 h à 37°C dans un milieu complet. Les taux d'IL-1 β dans les surnageants provenant de la culture des fractions positive et négative ont été mesurés par ELISA (n = 6, 2 expériences). (d) Les taux d'IL-1 β dans les poumons totaux des souris contrôles ou celles dont les neutrophiles ont été déplétés étaient évalués 12 h p.i. (n= 4-10, 2 expériences).

L'accumulation de proIL-1 β au sein des neutrophiles requiert le TNF- α produit par les macrophages alvéolaires.

La synthèse d'IL-1 β nécessite deux actions subséquentes et indépendantes permettant 1) l'induction de l'expression de la forme inactive proIL-1 β et 2) le clivage enzymatique de la forme inactive en forme active dite « phase de maturation ». Ainsi, nous nous sommes tout d'abord intéressés aux mécanismes impliqués dans l'étape de priming aboutissant à l'up-régulation de la protéine proIL-1 β . Cette augmentation d'expression est associée à de nombreux types de signaux NF- κ B dépendants. Des études récentes ont pu démontrer que le TNF- α était suffisant dans l'augmentation des taux protéiques de proIL-1 β dans les cellules myéloïdes *in vitro* et *in vivo* incluant les neutrophiles (Chow et al., 2014; Franchi et al., 2009). Le TNF- α est produit très rapidement suite à l'infection pneumococcique (**Fig. 6a**) notamment dans le compartiment aérien (**Fig. 6b**). En accord avec la présence unique des macrophages alvéolaires (AMs) dans les espaces aériens (**Figure 6c**), nous avons identifié ces derniers comme les seules cellules hématopoïétiques (CD45⁺) productrices de TNF- α (**Fig. 6d**). De plus, la déplétion spécifique des AMs (**Fig. 6e**) inhibait la production précoce de TNF- α dans les poumons des souris infectées (**Fig. 6f**). Afin de déterminer si le TNF- α était nécessaire dans notre modèle pour la synthèse de proIL-1 β par les neutrophiles, nous avons traité les souris avec un anticorps anti-TNF- α . En lien avec notre hypothèse, la neutralisation du TNF- α inhibait de façon significative les taux de proIL-1 β dans les neutrophiles mais aussi les autres cellules myéloïdes (**Fig. 6g**). Le traitement par l'anti-TNF- α était aussi associé à une diminution de la fréquence et du nombre absolu des lymphocytes $\gamma\delta$ T17 pulmonaires (**Fig. 6h**), ainsi qu'une diminution du recrutement

neutrophilique (**Fig. 6i**). De plus, les taux d'IL-1 β dans les poumons avaient diminué suite à la déplétion des AMs (**Fig. 6j**).

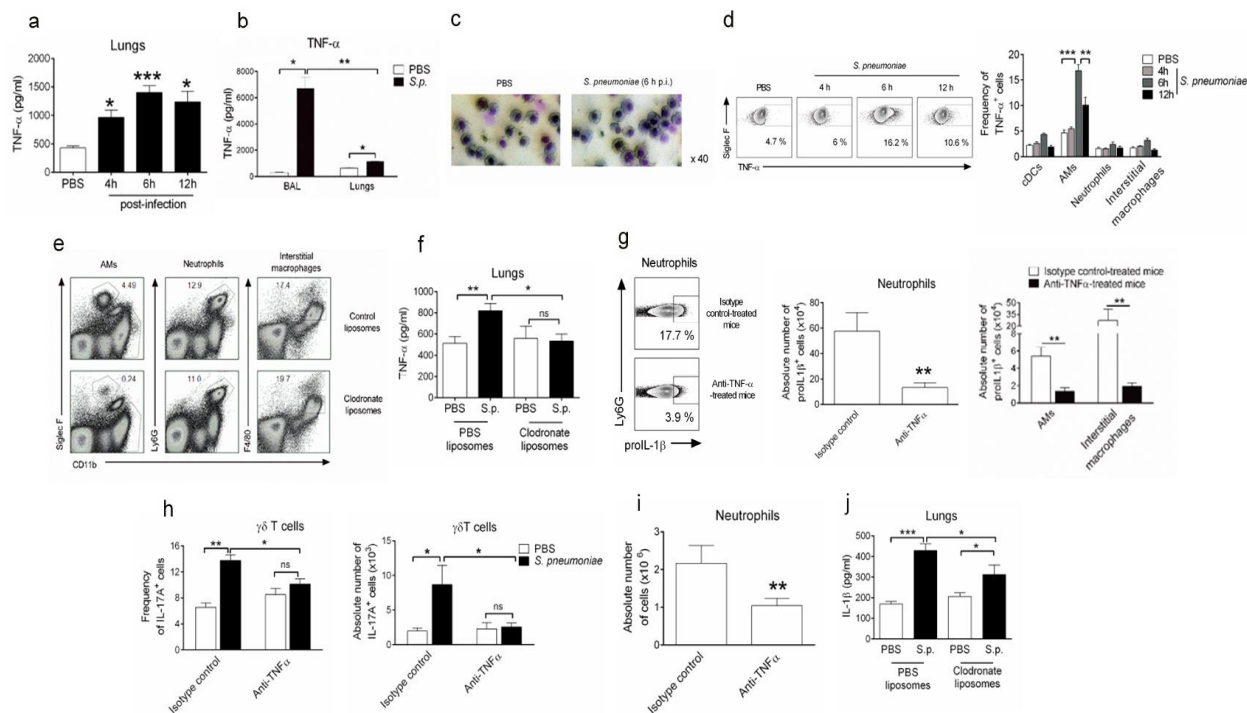


Figure 6: L'up-régulation du proIL-1 β dans les neutrophiles dépend du TNF- α produit par les macrophages alvéolaires. (a) La production du TNF- α dans les poumons a été évaluée à des cinétiques différentes suite à l'infection pneumococcique par ELISA (n = 5-9, 3 expériences). (b,c) Les souris WT étaient infectées ou non par *S.p.* puis sacrifiées 6 h p.i.. (b) Les taux de TNF- α dans le lavage broncho-alvéolaire (BAL) ou dans le tissu pulmonaire (après élimination du BAL et perfusion du poumon) ont été déterminés par ELISA (n = 3-5) (c) Morphologie des cellules du BAL suite à la coloration Giemsa du cytopspin. Une figure représentative de chaque groupe est montrée (n = 5). (d) Des dots plots des AMs TNF- α ⁺ ont été représentés à différentes cinétiques (*panel gauche*) et les moyennes \pm SEM de la fréquence des populations myéloïdes TNF- α ⁺ ont été montrées dans le *panel droit* (n = 5-9). (e) Les souris WT ont été traitées en i.n. 2 fois (jour -2 et jour -1) par du liposome contrôle ou du liposome clodronate (50 μ l) et la spécificité de la déplétion a été évaluée au jour 0 par FACS. Des dots plots représentatifs de la fréquence des macrophages alvéolaires, neutrophiles et macrophages interstitiels parmi les cellules pulmonaires CD45⁺ ont été montrés. (f) Les souris contrôles ou celles qui sont traitées par le liposome clodronate ont été infectées ou non par *S.p.*. Les taux de TNF- α dans les poumons totaux ont été mesurés 12 h p.i. par ELISA (n = 6-10, 2 expériences). (g-i) Les souris traitées par l'isotype contrôle ou par l'anti-TNF- α ont été infectées par *S.p.* puis sacrifiées 12 h p.i. (g) Un dot plot représentatif de l'expression de proIL-1 β par les neutrophiles est montré dans la *panel gauche*. Les moyennes \pm SEM du nombre absolu des neutrophiles (*panel au milieu*), AMs et macrophages interstitiels (*panel droit*) proIL-1 β ⁺ de 2 expériences sont représentées (n = 5-6). (h)

Les moyennes \pm SEM de la fréquence (*panel gauche*) et du nombre absolu (*panel droit*) des cellules T $\gamma\delta$ IL-17A⁺ ont été montrées (n = 5-6). **(i)** Nombre absolu des neutrophiles. **(j)** Les souris traitées par les liposomes contrôles ou les liposomes clodronate ont été infectées ou non par *S.p.*. Les taux d'IL-1 β dans les poumons totaux ont été quantifiés 12 h p.i. par ELISA (n = 6-10, 2 expériences).

L'activité du TNF- α sur le neutrophile dans la synthèse de proIL-1 β est dépendante du récepteur TNF-R1.

Le TNF- α peut exercer son activité biologique via le recrutement des récepteurs TNF-R1 et TNF-R2. Grâce à l'utilisation de souris déficientes pour le récepteur TNF-R1, nous avons pu démontrer le rôle important de ce récepteur dans l'augmentation d'expression du proIL-1 β au sein des neutrophiles après infection (**Fig. 7a**). Cette observation s'associait à une réduction de la neutrophilie post-*S. pneumoniae* infection (**Fig. 7b**). De plus, l'incubation *in vitro* de neutrophiles pulmonaires purifiés par FACS avec du TNF- α recombinant permettait d'induire rapidement une augmentation de l'expression de proIL-1 β et cela de façon dose-dépendante (**Fig. 7c**). Dans leur ensemble, ces résultats suggèrent que l'augmentation du proIL-1 β au sein des neutrophiles est fortement régulée par le TNF- α produit par les AMs pendant les phases précoces de l'infection pneumococcique.

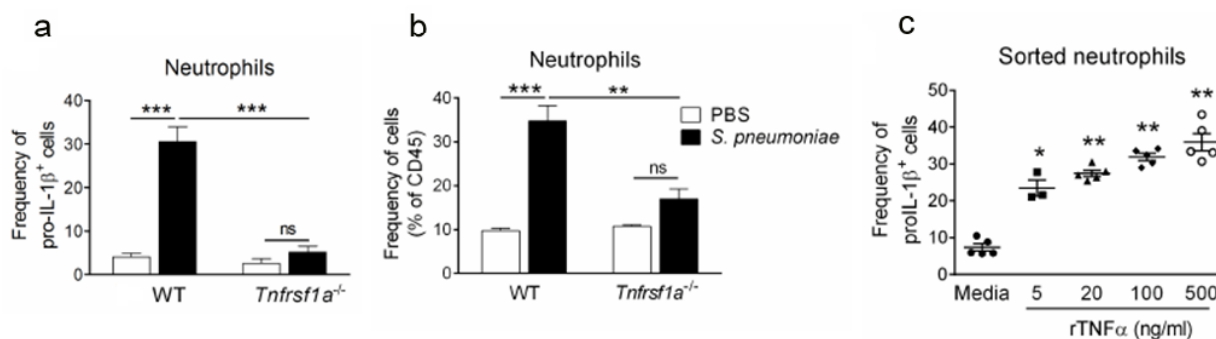


Figure 7: L'expression du proIL-1 β par les neutrophiles dépend de la voie TNF- α /TNFR1. **(a,b)** Les souris WT et *Tnfrsf1a*^{-/-} ont été infectées par *S.p.* puis sacrifiées 12 h p.i.. Moyennes \pm SEM de la fréquence des neutrophiles proIL-1 β ⁺ **(a)** et totaux **(b)** (n = 6-14, 2 expériences). **(c)** 2 x 10⁵ neutrophiles pulmonaires de souris naïves ont été triés par FACS puis cultivés pour 3 h à 37°C dans un milieu complet en présence de TNF- α recombinant aux concentrations indiquées. Les cellules ont été ensuite analysées par FACS pour l'expression de proIL-1 β (n = 3-5, 2 expériences).

La maturation et la sécrétion d'IL-1 β au cours de l'infection dépend de l'inflammasome NLRP3.

La maturation de l'IL-1 β par les neutrophiles a été initialement décrite comme étant dépendante de l'activité protéasique de certaines sérine protéases (élastase et protéinase 3) dans le clivage du proIL-1 β en IL-1 β mature (Karmakar et al., 2012). Toutefois, des données récentes ont aussi suggéré que les neutrophiles pourraient exprimer des inflammasomes fonctionnels pouvant induire la production d'IL-1 β bioactive grâce à l'activité de la caspase-1 (Karmakar et al., 2015). En adéquation avec ces études, nous avons pu observer que les taux d'IL-1 β dans le tissu pulmonaire des souris infectées par *S. pneumoniae* étaient plus faibles chez les souris déficientes en caspase-1 en comparaison avec les souris WT, indiquant l'implication d'un inflammasome dans notre modèle (**Fig. 8a**). Parmi les différents inflammasomes décrits, l'inflammasome NLRP3 est très certainement le mieux caractérisé. Afin d'étudier son rôle dans notre modèle, nous avons comparé les taux d'IL-1 β pulmonaires de souris WT infectées avec des animaux déficients pour certains composants de l'inflammasome NLRP3 (souris *Nlrp3*^{-/-} et *Asc*^{-/-}). Ainsi les souris *Nlrp3*^{-/-} et *Asc*^{-/-} présentaient des niveaux diminués d'IL-1 β par rapport aux souris contrôles (**Fig. 8a**) suggérant un rôle de l'inflammasome NLRP3. Pour confirmer cela, nous avons utilisé *in vivo* un inhibiteur spécifique de l'inflammasome NLRP3, MCC950 (Coll et al., 2015). Ce traitement a ainsi permis de réduire les taux d'IL-1 β retrouvés dans les poumons des souris infectées par *S.p.* (**Fig. 8b**).

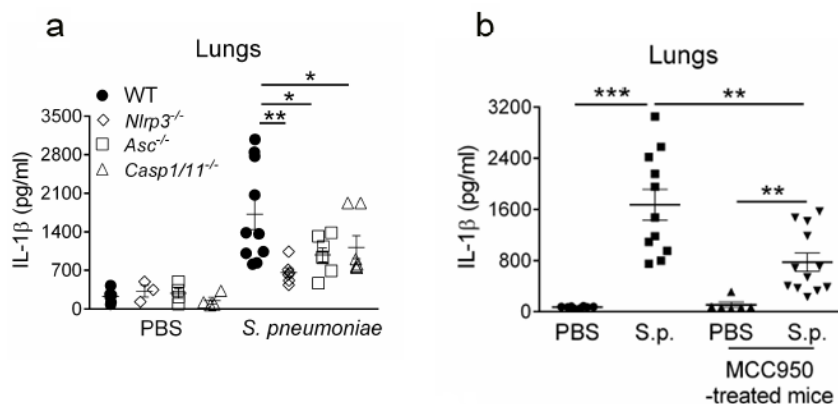


Figure 8: L'inflammasome NLRP3 est essentiel pour la maturation et la production d'IL-1 β au cours de l'infection pneumococcique. (a) Les taux de production d'IL-1 β ont été évalués dans les poumons totaux des souris WT, *Nlrp3*^{-/-}, *Asc*^{-/-} et *Casp1/11*^{-/-} PBS ou infectées (12 h) (n = 6-10, 2 expériences). (b) Les souris WT PBS ou infectées par *S.p.* étaient traitées ou non par MCC950 (1 mg/souris i.n., 2 h p.i.) puis sacrifiées 12 h p.i.. Les

poumons étaient collectés, homogénéisés et la production d'IL-1 β a été quantifiée dans les homogénats par ELISA (n = 6-12, 2 expériences).

La production d'IL-1 β par les neutrophiles est dépendante de l'inflammasome NLRP3.

Afin d'évaluer spécifiquement le rôle de l'inflammasome NLRP3 au sein des neutrophiles dans la production d'IL-1 β par ces derniers, nous avons étudié les signes de priming de l'inflammasome NLRP3 dans les neutrophiles. Pour ceci, nous avons analysé les échantillons protéiques et d'ARNm de neutrophiles pulmonaires purifiés à partir des souris contrôles ou infectées par *S.p.*. Nous avons observé des taux importants d'expression de la protéine NLRP3 (**Fig. 9a**) et des transcrits d'ARNm de *Nlrp3* dans les neutrophiles des souris infectées (**Fig. 9b**). D'une façon intéressante, le traitement par MCC950 inhibait la production *ex vivo* d'IL-1 β par les neutrophiles pulmonaires des souris infectées (**Fig. 9c**). De plus, une analyse par Western blot des neutrophiles purifiés à partir de souris infectées a démontré une maturation de l'IL-1 β sous sa forme bioactive p17 (**Fig. 9a**).

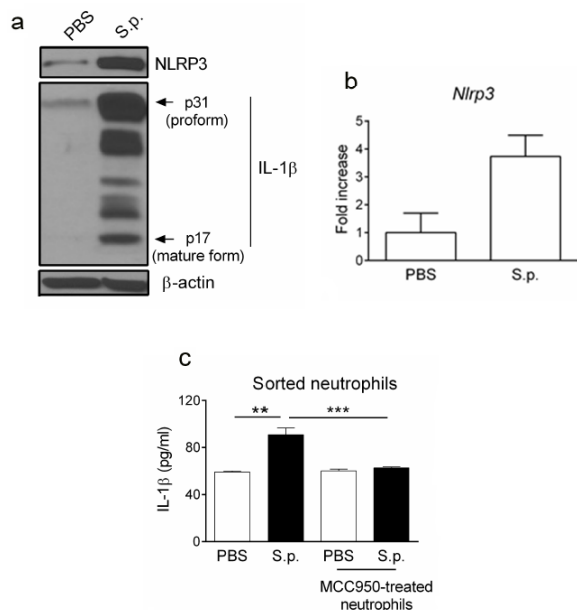


Figure 9: L'inflammasome NLRP3 est essentiel pour la production d'IL-1 β par les neutrophiles.

(a-c) Les neutrophiles pulmonaires des souris PBS ou infectées (12 h p.i.) étaient purifiés par tri FACS. (a) Les lysats des neutrophiles étaient utilisés pour réaliser un western blot d'expression de β -actine, d'IL-1 β et de NLRP3. (b) Les neutrophiles ont été analysés par RT-qPCR pour évaluer les taux des transcrits d'ARNm de *Nlrp3* normalisés par rapport au gène de ménage (*Gapdh*). (c) Les neutrophiles ont été cultivés pour 3 h à 37°C dans un milieu complet en présence ou non de MCC950 (10 μ M). Les taux de production d'IL-1 β dans les surnageants étaient analysés par ELISA (2 expériences).

L'activation de l'inflammasome NLRP3 neutrophilique dépend de la pneumolysine bactérienne.

De nombreuses molécules ont pu être décrites comme participant plus ou moins directement à l'activation de l'inflammasome. Parmi ceci, un facteur de virulence de *S.p.*, la pneumolysine

(Ply), est considéré comme un activateur de NLRP3 (McNeela et al., 2010). Cette activité s'explique par le fait que les pores formés sur les membranes cellulaires par cette toxine entraînent une modification des flux de K^+ aboutissant à l'assemblage et l'activation de l'inflammasome NLRP3. Grâce à l'utilisation d'une souche de pneumocoque déficiente pour la Ply (D39 Δ ply) (**Fig. 10a**), nous avons pu démontrer *in vivo* le rôle de ce facteur de virulence dans la production d'IL-1 β au niveau pulmonaire (**Fig. 10b**). En contrôle, nous avons pu démontrer que la complémentation de la souche déficiente en Ply a permis la restauration des taux d'IL-1 β normalement produits par la souche sauvage (**Fig. 10b**).

Afin de récapituler nos observations *in vivo*, nous avons ajouté de la Ply recombinante sur des neutrophiles purifiés préalablement sensibilisés ou non avec du TNF- α pour mimer la phase de priming. En accord avec notre hypothèse, l'ajout de Ply induisait la production d'IL-1 β (**Fig. 10c**). De plus, les neutrophiles pulmonaires de souris *Nlrp3*^{-/-} ou *Casp1/11*^{-/-} ne répondaient pas aux mêmes stimuli en termes de production d'IL-1 β (**Fig. 10d**). Ces résultats indiquent que la production d'IL-1 β par les neutrophiles est gouvernée par l'activité caspase-1 dépendante de l'inflammasome NLRP3.

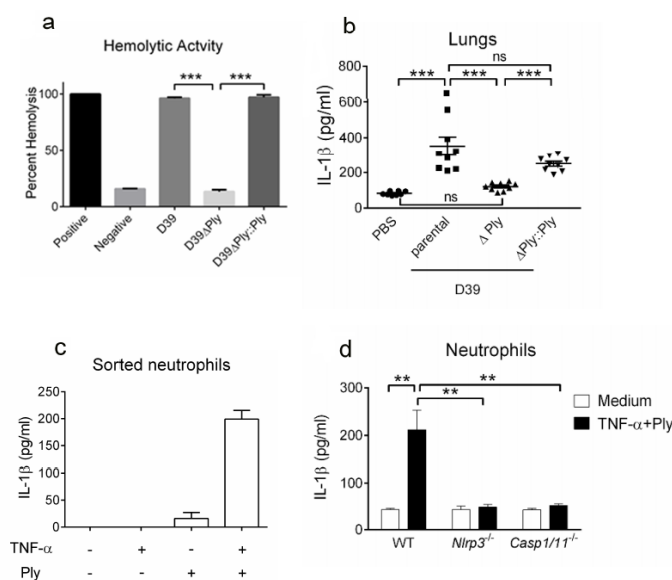


Figure 10: La pneumolysine pneumococcique active l'inflammasome NLRP3 neutrophilique.

(a) Activité hémolytique des différentes souches D39. Les résultats montrés représentent un pool de 3 expériences. (b) Les souris WT ont été infectées en i.n. par les souches de D39 parentale, mutée et complétement (4 x 10⁶ CFU/souris). Les souris ont été sacrifiées 12 h p.i. et l'IL-1 β a été mesuré dans les homogénats pulmonaires (n = 8-9, 2 expériences). (c,d) 2 x 10⁵ neutrophiles pulmonaires des souris PBS WT, *Nlrp3*^{-/-} et *Casp1/11*^{-/-} étaient incubés dans un milieu RPMI complet à 37°C avec ou sans du TNF- α recombinant (100 ng/ml) pour 3 h et la pneumolysine était ensuite ajoutée pour 90 min supplémentaires (500 ng/ml). La sécrétion d'IL-1 β dans les surnageants a été quantifiée par ELISA (2 expériences).

Le TNF- α et la pneumolysine sont suffisants pour induire la sécrétion d'IL-1 β dépendante de l'inflammasome NLRP3 par des neutrophiles humains.

Afin de voir si les mécanismes observés étaient transposables aux neutrophiles humains, nous avons préparé des leucocytes totaux à partir du sang périphérique de donneurs sains, et mis en culture avec du TNF- α , pour 3 h, puis avec de la Ply pour 90 min supplémentaires. Comme observé chez la souris, le traitement par le TNF- α seul ou la Ply seule n'induisait pas de production d'IL-1 β par les leucocytes humains, alors que la combinaison des deux stimuli aboutissait à une sécrétion d'IL-1 β (**Fig. 11a**). Cet effet semblait dépendant de l'inflammasome NLRP3 car un traitement avec le MCC950 inhibait totalement la sécrétion d'IL-1 β (**Fig. 11a**). Afin d'étudier spécifiquement leur effet sur les neutrophiles, nous avons isolé et purifié des neutrophiles provenant du sang périphérique de donneurs sains (**Fig. 11b**). De façon intéressante, les neutrophiles humains exprimaient constitutivement le TNF-R1 (**Fig. 11c**). De façon similaire aux résultats obtenus sur les leucocytes totaux, les neutrophiles humains produisaient de l'IL-1 β en réponse à la combinaison TNF- α /Ply. (**Fig. 11d**). Nos résultats suggèrent ainsi que l'inflammasome NLRP3 permet d'induire la production d'IL-1 β par des neutrophiles humains selon un mécanisme TNF- α /Ply-dépendant.

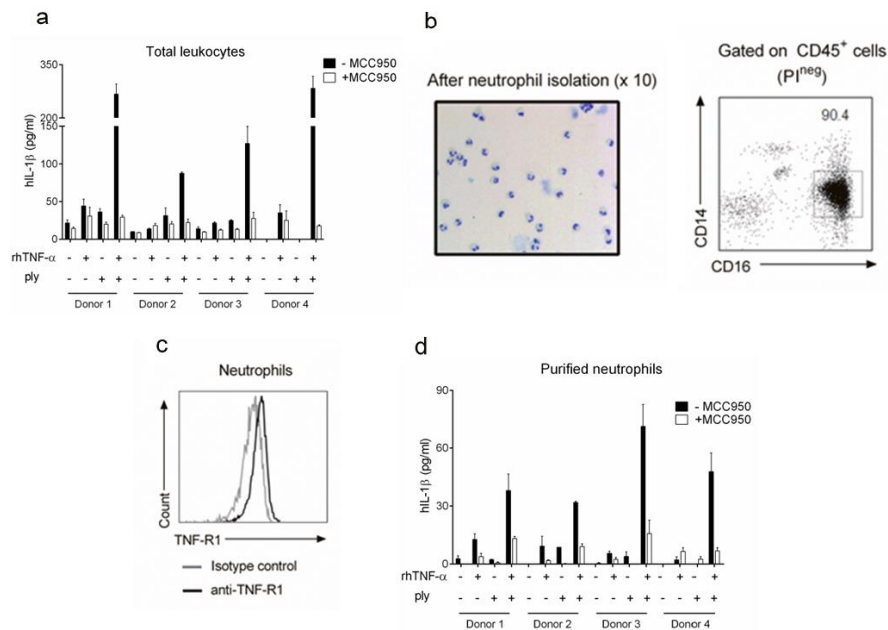


Figure 11: Les neutrophiles humains produisent de l'IL-1 β selon un mécanisme dépendant de l'inflammasome NLRP3 en réponse au TNF- α et à la Ply. (a) 4×10^5 leucocytes du sang périphérique de donneurs sains non-fumeurs ont été cultivés dans un milieu complet avec du TNF- α recombinant humain, avec ou sans MCC950 (10 μ M) pour 3 h puis stimulés avec de la Ply (500 ng/ml) pour 90 min supplémentaires. Les surnageants ont été collectés et testés pour leur production d'IL-1 β . (b) Analyse de la pureté des neutrophiles humains en utilisant une approche basée sur la morphologie (*panel gauche*) et une approche FACS (CD16⁺ CD14^{low}) (*panel droit*). (c) Analyse de l'expression de TNF-R1 sur les neutrophiles humains avant la culture *in vitro*. Les résultats montrés sont représentatifs de 9 donneurs. (d) 2.5×10^5 neutrophiles purifiés du sang périphérique des donneurs sains non-fumeurs ont été cultivés dans un milieu complet avec du TNF- α recombinant humain avec ou sans MCC950 (10 μ M) pour 3 h puis stimulés avec de la Ply pour 90 min supplémentaires. Les surnageants ont été collectés et testés pour leur production d'IL-1 β .

L'IL-1 β dérivé des neutrophiles est impliqué dans l'activation des lymphocytes $\gamma\delta$ T17 au cours de l'infection pneumococcique.

Afin d'établir un lien direct entre la production d'IL-1 β par les neutrophiles et l'activation des lymphocytes $\gamma\delta$ T17, nous avons analysé la capacité des lymphocytes T $\gamma\delta$ à produire de l'IL-17A en absence de neutrophiles. De façon intéressante, nous avons démontré que la déplétion en neutrophiles inhibait significativement la capacité des lymphocytes T $\gamma\delta$ à produire de l'IL-17A pendant les phases précoces de l'infection (**Fig. 12a**). Il est important de noter que les neutrophiles ne possèdent pas un rôle antibactérien direct durant la phase précoce de l'infection (**Fig. 12b**).

De plus, les lymphocytes T $\gamma\delta$ CD27⁻ pulmonaires purifiés et cultivés dans un milieu conditionné provenant de la culture des neutrophiles pulmonaires de souris infectées par *S. pneumoniae* produisaient de l'IL-17A (**Fig. 12c**). Comme attendu, la sécrétion d'IL-17A était seulement détectée à partir des lymphocytes T $\gamma\delta$ CD27⁻ et non par la population CD27⁺ connue pour produire de l'IFN- γ (**Fig. 12d**). De plus, la neutralisation *in vitro* de l'IL-1 β inhibait la production d'IL-17A par les lymphocytes T $\gamma\delta$ indiquant que cet effet était totalement dépendant de l'IL-1 β et ne requiert pas de contact direct entre les cellules (**Fig. 12c**). Collectivement, nos résultats indiquent que *S. pneumoniae* induit une sécrétion rapide d'IL-1 β par les neutrophiles contribuant fortement à la production d'IL-17A par les lymphocytes T $\gamma\delta$ pulmonaires (**Schéma 1**).

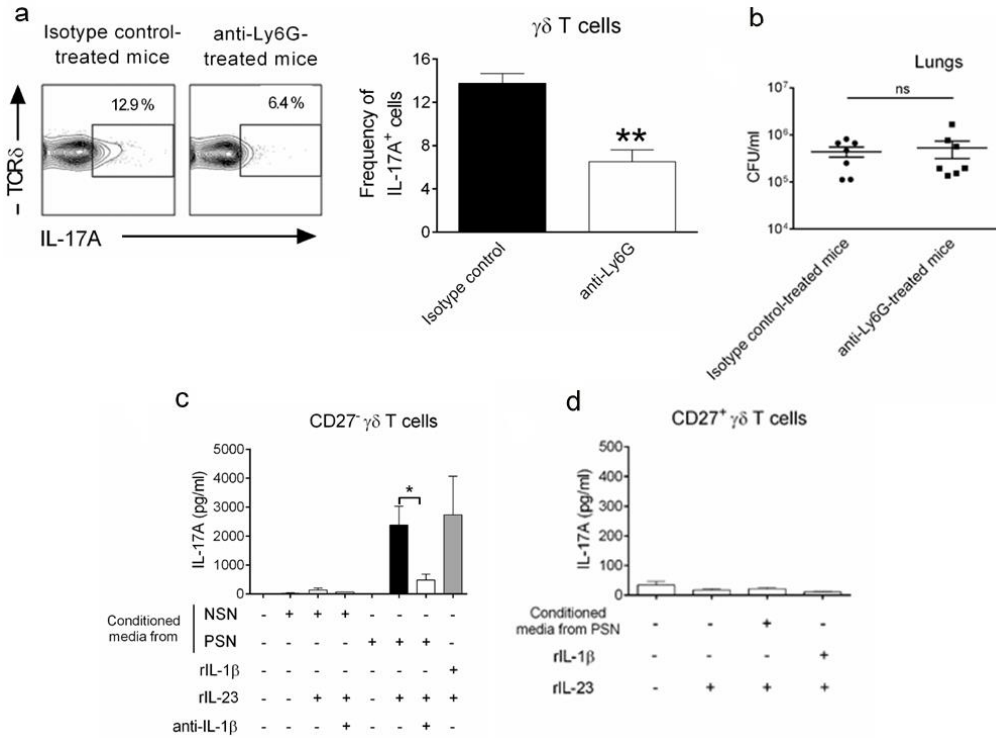


Figure 12: La production d'IL-17A par les cellules $\gamma\delta$ T17 est dépendante de l'IL-1 β dérivé des neutrophiles.

(a) La production d'IL-17A par les cellules T $\gamma\delta$ pulmonaires a été évaluée dans les souris infectées contrôles ou celles dont les neutrophiles ont été déplétés 6 h p.i. Un dot plot représentatif des cellules T $\gamma\delta$ IL-17A $^+$ a été représenté dans le *panel gauche*. Les moyennes \pm SEM de la fréquence des cellules T $\gamma\delta$ IL-17A $^+$ de 2 expériences (n = 6) ont été représentées dans le *panel droit*. (b) Les colonies bactériennes ont été comptées dans les poumons des souris contrôles et celles dont les neutrophiles ont été déplétés 4 h p.i. (n=3-4, 2 expériences). (c,d) Les cellules T $\gamma\delta$ CD27 $^-$ (c) et CD27 $^+$ (d) pulmonaires triées ont été incubées à 37°C pour 20 h dans un milieu complet et conditionné (ratio 1:1) provenant de neutrophiles non sensibilisés (NSN) ou de neutrophiles sensibilisés avec du pneumocoque (PSN). Dans certaines conditions, de l'anti-IL-1 β (5 μ g/ml), de l'IL-1 β r (1 ng/ml) et de l'IL-23r (1 ng/ml) ont été ajoutés au milieu de culture. Le milieu conditionné est représenté par les surnageants des neutrophiles pulmonaires de souris naïves (NSN) ou de souris infectées par *S.p.* (PSN), purifiés et cultivés. Les neutrophiles des souris infectées ont été purifiés 12h p.i. Les taux d'IL-17A dans les surnageants ont été mesurés par ELISA. Les moyennes \pm SEM des concentrations d'IL-17A de 3 expériences (n =3-5) ont été représentées.

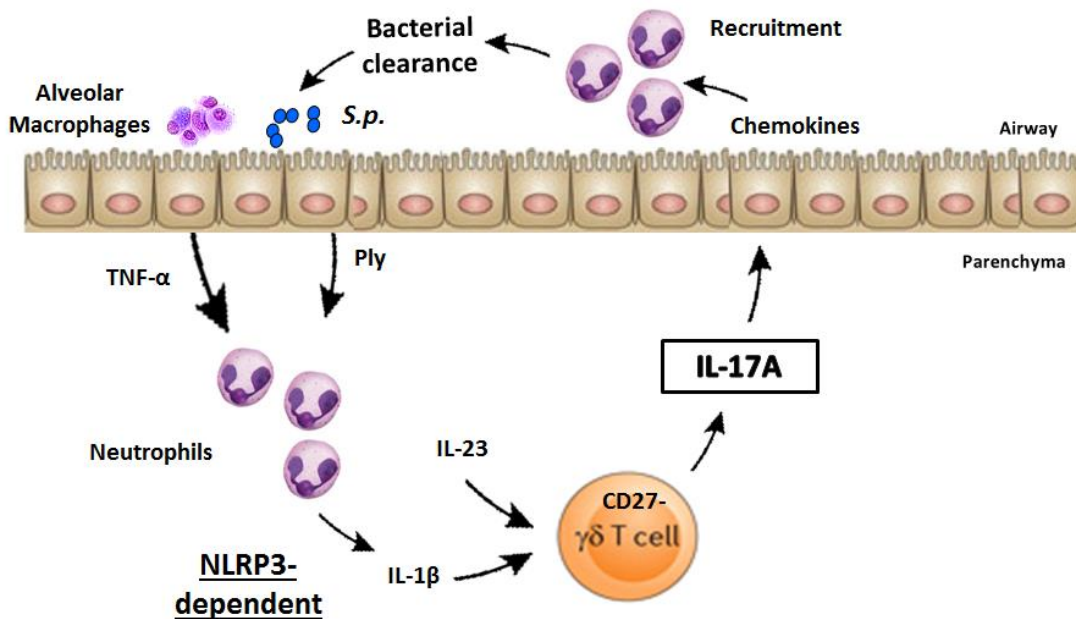


Schéma 1: Mécanisme de production d'IL-17A par les cellules T $\gamma\delta$ dans le modèle d'infection par *S. pneumoniae*.

II. Manipulation des lymphocytes T innés producteurs d'IL-17A à des fins thérapeutiques.

A la vue de l'importance des lymphocytes T innés producteurs d'IL-17A, en particulier les lymphocytes T $\gamma\delta$, dans le contrôle des infections bactériennes pulmonaires, nous avons émis l'hypothèse qu'en manipulant positivement leur nombre et leur fonction, nous pourrions obtenir des effets bénéfiques dans notre modèle d'infection respiratoire à *Streptococcus pneumoniae*. Comme présenté précédemment, l'IL-7 est une cytokine homéostatique d'intérêt, connue depuis longtemps pour exercer un rôle important dans le développement de nombreuses populations lymphocytaires (Mackall et al., 2011). Plus récemment, certains travaux ont pu démontrer l'importance sélective de cette cytokine dans le maintien et la fonction des lymphocytes T innés producteurs d'IL-17A en périphérie notamment les lymphocytes T $\gamma\delta$ et les lymphocytes NKT (Michel et al., 2012; Webster et al., 2014). Ainsi nous nous sommes proposés par une approche prophylactique d'administrer de l'IL-7 localement dans les poumons de souris (voie i.n.) afin d'essayer de booster le pool local de lymphocytes T innés producteurs d'IL-17A avec pour ambition d'observer une réponse antibactérienne plus efficace chez les animaux traités. Comme énoncé dans l'introduction, nous proposons d'administrer l'IL-7 sous forme complexée à un

anticorps spécifique (clone M25) afin d'augmenter la durée de demi-vie ainsi que la biodisponibilité de la molécule.

Le traitement intranasal avec le complexe IL-7/anti-IL-7 (M25) augmente le pool local des cellules T innées présentant un phénotype Th17-like.

Afin d'étudier les effets du complexe IL-7/M25 sur l'homéostasie des populations immunitaires innées du poumon, nous avons traité par voie intranasale (i.n.) des souris naïves avec le complexe trois fois à raison d'une dose tous les 2 jours (**Schéma 2**).

Une semaine après le début du traitement, nous avons évalué la fréquence et le nombre absolu des populations immunitaires au niveau du poumon et en périphérie par cytométrie en flux. Premièrement, nos résultats montraient que le traitement n'affecte pas les populations cellulaires de l'immunité adaptative englobant les lymphocytes T conventionnels CD4⁺ et CD8⁺ ainsi que les lymphocytes B. Par contre, l'analyse du compartiment lymphocytaire inné indiquait une augmentation significative de la fréquence des lymphocytes T $\gamma\delta$ CD27⁻ (**Fig. 13a**), une population connue pour sa capacité à produire sélectivement de l'IL-17A (Ribot et al., 2009). A l'inverse, les lymphocytes T $\gamma\delta$ CD27⁺, connus pour produire de l'IFN- γ , n'étaient pas affectés par le traitement (**Fig. 13a**). De façon plus détaillée, la fréquence des lymphocytes T CD3^{bright} V γ 6V δ 1⁺, représentant la source majoritaire d'IL-17A parmi la population $\gamma\delta$ pulmonaire (Paget et al., 2015; Roark et al., 2004), était augmentée suite au traitement à l'IL-7 (**Fig. 13b**). De plus, le traitement aboutissait aussi à une augmentation significative de la fréquence des lymphocytes NKT (**Fig. 13c**). Toutefois, à l'instar des lymphocytes T $\gamma\delta$, cet effet s'expliquait principalement par une augmentation de la population NK1.1⁻, connue pour sa capacité à produire de l'IL-17A (Michel et al., 2007) (**Fig. 13d**). Dans le but de confirmer nos observations, nous avons utilisé des souris rapporteurs *Rorc-eGFP*, un facteur de transcription essentiel pour la production d'IL-17 (Ivanov II et al., 2006). En accord avec nos données phénotypiques basées sur des marqueurs membranaires, nous avons pu également observer une augmentation de l'expression de ROR γ t après traitement au sein des populations de lymphocytes T $\gamma\delta$ et NKT totales (**Fig. 13e**). De façon intéressante notre effet semble local car nous n'avons pas observé de modulation des populations de lymphocytes T $\gamma\delta$ et NKT dans les rates des souris traitées (**Fig. 13f**).

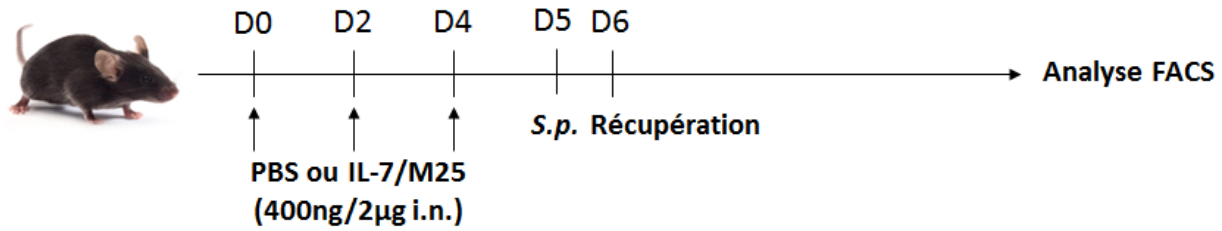


Schéma 2: Protocole d'administration du complexe IL-7/M25

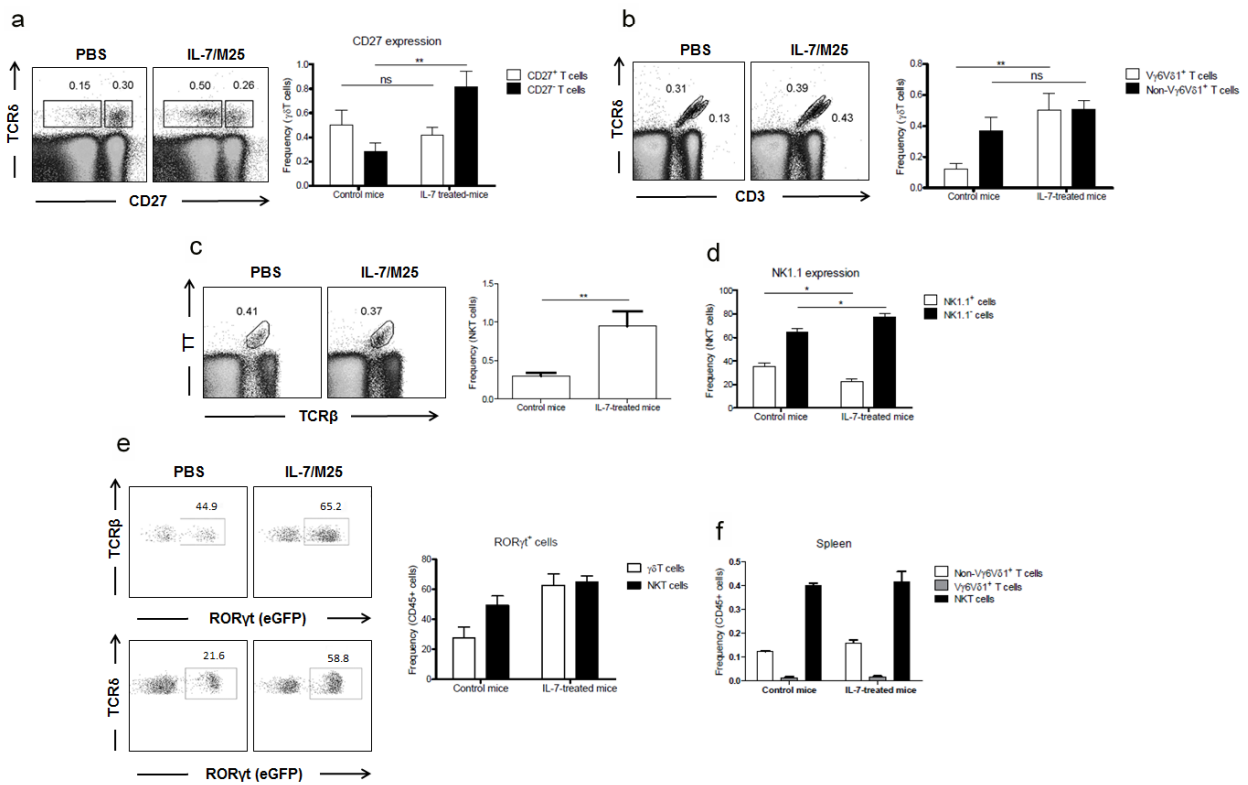


Figure 13: Le traitement par l'IL-7 augmentait le pool cellulaire Th17-like. (a-f) Les souris C57BL/6 WT ont été traitées ou non par 3 doses du complexe IL-7/M25 tous les 2 jours, puis elles étaient sacrifiées et les cellules étaient analysées par FACS. (a,b) Des dots plots représentatifs (*panel gauche*) et la fréquence (*panel droit*) des cellules T $\gamma\delta$ CD27⁻ et CD27⁺ (a) et des cellules V γ 6V δ 1⁺ et non-V γ 6V δ 1⁺ (b) ont été analysées par FACS. (c) Des dots plots des cellules NKT (*panel gauche*) et la fréquence de ces dernières (*panel droit*) ont été représentés. (d) Fréquence des populations NK1.1⁻ et NK1.1⁺. (e) Des dots plots représentatifs (*panel gauche*) et Fréquence (*panel droit*) des cellules T $\gamma\delta$ et NKT ROR γ t⁺. Une expérience (n = 4-5) est représentée. (f) Fréquence des cellules T $\gamma\delta$ et NKT dans les rates (n = 4-5, 4 expériences).

Le traitement à l'IL-7 augmente la capacité des leucocytes pulmonaires à produire de l'IL-17A.

Dans le but de relier nos observations phénotypiques à une fonction biologique, des leucocytes pulmonaires de souris contrôles ou traitées avec l'IL-7 ont été stimulés *ex vivo*. Si la capacité des cellules à produire de l'IFN- γ n'était pas modifiée entre les 2 groupes (**Fig. 14a**), nous avons pu mettre en évidence une augmentation des taux d'IL-17A produits par les cellules pulmonaires des souris traitées par l'IL-7 (**Fig. 14a**). En accord avec les données de cytométrie en flux, nous n'avons pas observé de modulation de production cytokinique par les splénocytes (**Fig. 14b**) confirmant un effet local de ce traitement.

Afin de déterminer les sources cellulaires responsables de cette augmentation de production d'IL-17A, nous avons traité *in vivo* des souris WT, *Tcr δ ^{-/-}* (déficientes en lymphocytes T $\gamma\delta$) et *Jal8^{-/-}* (déficientes en lymphocytes NKT) avec de l'IL-7 puis les cellules pulmonaires ont été stimulées *ex vivo*. De façon intéressante, la déficience en lymphocytes T $\gamma\delta$ et, dans une moindre mesure, en lymphocytes NKT réduisait la production en IL-17A des leucocytes pulmonaires par rapport aux cellules des souris contrôles (**Fig. 14c**). De plus, l'effet du traitement IL-7 était aboli dans les souris *Tcr δ ^{-/-}* alors que la déficience en lymphocytes NKT n'affectait pas significativement son activité biologique (**Fig. 14c**). Pris dans leur ensemble, nos résultats suggèrent que les effets positifs de l'IL-7 sur la production d'IL-17A semblent principalement dus aux lymphocytes T $\gamma\delta$ pulmonaires.

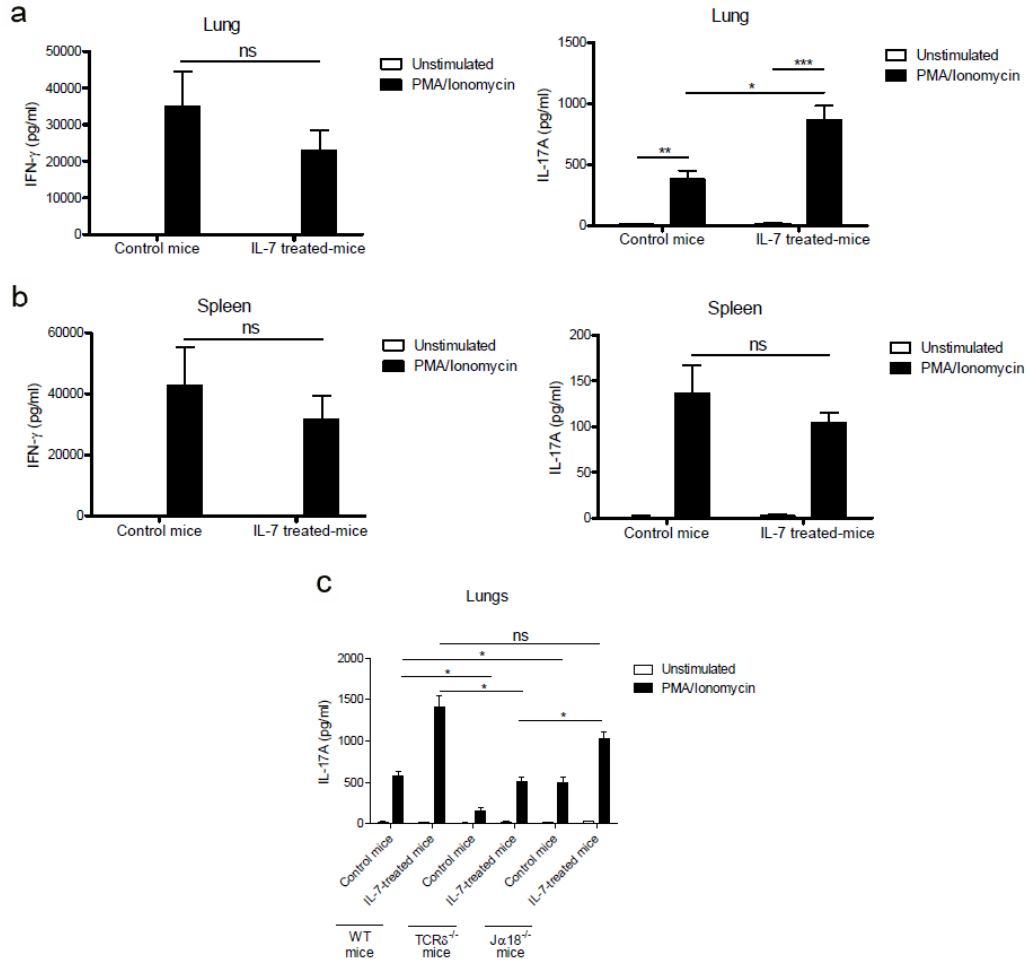


Figure 14: Le traitement par l'IL-7 augmentait la production d'IL-17A par les leucocytes *ex vivo*. Les souris ont été traitées ou non par le complexe IL-7/M25 (3 doses) tous les 2 jours et les leucocytes étaient ensuite stimulés ou non *ex vivo* par PMA/Ionomycine pour 20 h. **(a,b)** Les taux d'IFN- γ (*panel gauche*) et d'IL-17A (*panel droit*) dans les surnageants des cellules pulmonaires **(a)** et spléniques **(b)** ont été mesurés par ELISA (n = 4-5, 2 expériences). **(c)** Les taux d'IL-17A ont été mesurés par ELISA suite à la stimulation *ex vivo* des leucocytes pulmonaires des souris WT, $TCR\delta^{-/-}$ et $J\alpha18^{-/-}$ par PMA/ionomycine (n = 4-5, 1 expérience).

Le traitement prophylactique à l'IL-7 augmente la production d'IL-17A par les cellules T $V\gamma6V\delta1^+$ suite à l'infection pneumococcique.

Nous avons précédemment montré que l'IL-17A était essentiel pour le contrôle de la charge bactérienne et la survie des souris suite à l'infection pneumococcique (Hassane et al., en révision). Nous avons également pu mettre en évidence les lymphocytes T $\gamma\delta$, particulièrement la population $V\gamma6V\delta1^+$, comme étant la source majeure d'IL-17A précoce dans ce modèle

infectieux (Hassane et al., en révision; Paget et al., 2015). Pour cette raison, nous avons évalué les effets de l'IL-7 sur la stimulation de la réponse immunitaire de l'hôte au cours de l'infection pneumococcique. Grâce à une approche de FACS intracellulaire, nous avons pu montrer une augmentation du nombre absolu des lymphocytes T $\gamma\delta$ producteurs d'IL-17A chez les souris infectées ayant reçu le traitement IL-7 (**Fig. 15a**). De façon plus spécifique, le traitement à l'IL-7 induisait une augmentation de la fréquence des lymphocytes T $V\gamma6V\delta1^+$ à produire de l'IL-17A mais pas des autres populations de lymphocytes T $\gamma\delta$ (non- $V\gamma6V\delta1^+$) (**Fig. 15b**). Par contre, nous n'avons pas observé d'effet significatif sur les lymphocytes NKT producteurs d'IL-17A (**Fig. 15c**). Nos résultats montrent ainsi que le traitement par l'IL-7 induit une modulation homéostatique et fonctionnelle du pool de lymphocytes T $\gamma\delta$ producteurs d'IL-17A, en particulier la population $CD3^{\text{bright}} V\gamma6V\delta1^+$.

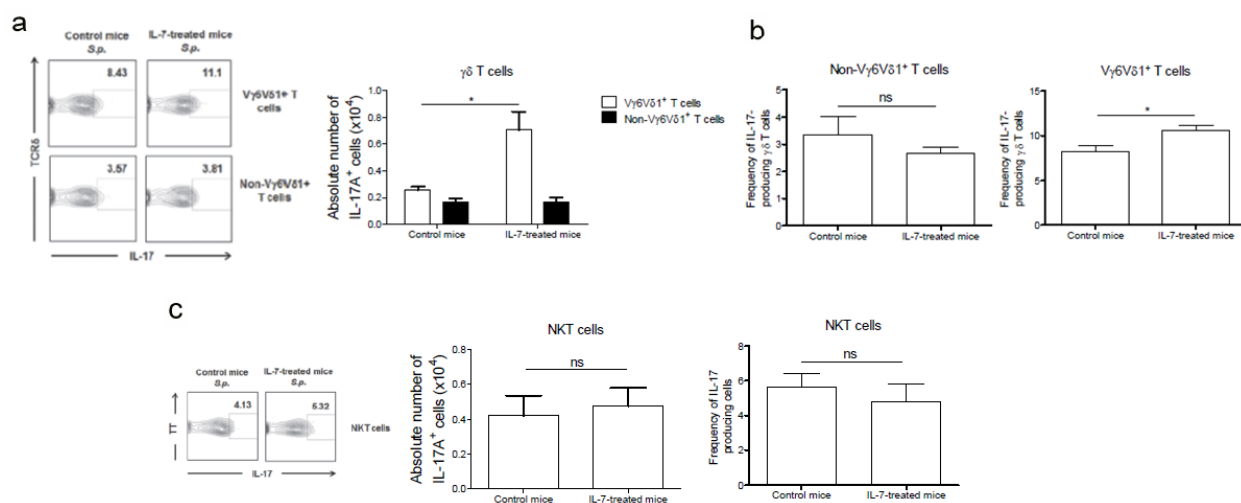


Figure 15: Le traitement par l'IL-7 induisait une production d'IL-17A par les cellules T $V\gamma6V\delta1^+$ suite à l'infection par *S. pneumoniae*. Les souris infectées par *S.p.* ont été traitées ou non par le complexe IL-7/M25 puis les cellules pulmonaires étaient évaluées par FACS 12 h p.i.. **(a)** Des dots plots pour la production d'IL-17 par les cellules T $\gamma\delta$ (*panel gauche*) et le nombre absolu des cellules T $\gamma\delta$ IL-17A+ (*panel droite*) ont été représentés. **(b)** Les fréquences des cellules non- $V\gamma6V\delta1^+$ (*panel gauche*) et $V\gamma6V\delta1^+$ (*panel droite*) productrices d'IL-17A ont été analysées par FACS (n = 4-5, 3 expériences). **(c)** Des dots plots pour la production d'IL-17 par les cellules NKT (*panel gauche*), le nombre absolu (*panel au milieu*) et la fréquence (*panel droite*) des cellules NKT IL-17A+ ont été représentés.

Le traitement par l'IL-7 contrôle la charge bactérienne en influençant sur la neutrophilie mais n'a pas d'effet sur la survie d'animaux infectés par *S. pneumoniae*.

Afin d'évaluer l'impact du traitement à l'IL-7 sur les paramètres pathologiques de l'infection pneumococcique, nous avons traité de façon prophylactique des souris WT avant infection i.n. avec *S. pneumoniae*. De façon intéressante, nous avons observé que le traitement par l'IL-7 diminuait fortement la charge bactérienne dans les poumons (-3log en moyenne) (**Fig. 16a**). De plus, cette réduction au niveau local s'accompagnait d'une diminution massive de la dissémination bactérienne (**Fig. 16a**). Il est à noter que 83% (10/12) des animaux traités ne présentaient pas de signes de dissémination bactérienne contre 25% (3/12) dans le groupe contrôle. En adéquation avec leur rôle bénéfique dans l'élimination bactérienne, nous avons pu montrer que cette augmentation de l'activité antibactérienne chez les animaux traités s'accompagnait d'une augmentation du recrutement neutrophilique (**Fig. 16b**). Malheureusement, malgré le contrôle important de la charge bactérienne locale et systémique chez les souris traitées, celles-ci ne présentaient pas d'amélioration significative de leur survie (**Fig. 16c**). Pris dans leur ensemble, le traitement prophylactique à l'IL-7 permet de mieux contrôler la répllication et la diffusion bactérienne chez les souris mais ne s'associe pas à une survie accrue des animaux à l'infection.

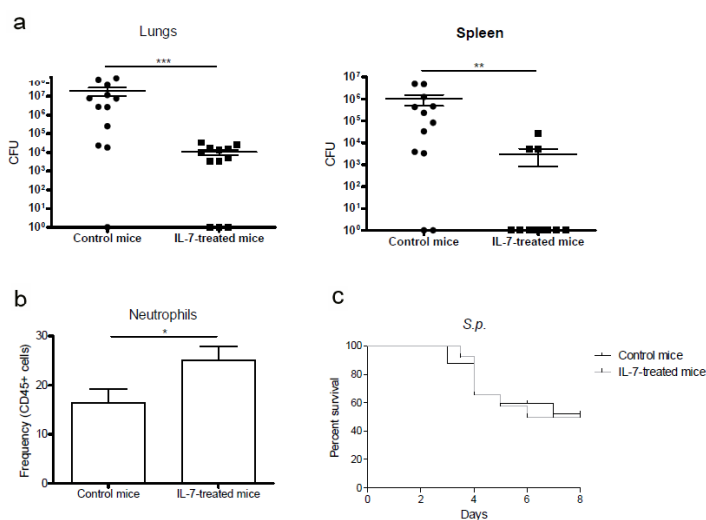


Figure 16: Le traitement par l'IL-7 induit une diminution de la charge bactérienne et une amélioration de la neutrophilie. (a) Les souris contrôles ou traitées par l'IL-7 ont été infectées par *S.p.* et le nombre de CFU était déterminé 60 h p.i. dans les poumons (*panel gauche*) et les rates (*panel droit*) (n = 7-10, 2 expériences). (b) La fréquence des neutrophiles pulmonaires des souris infectées par *S.p.* était évaluée par FACS 12 h p.i. chez les souris contrôles et les souris traitées par l'IL-7 (n = 4-5, 3 expériences). (c) Les souris contrôles et les souris traitées par l'IL-7 étaient infectées par *S.p.* (5×10^5 CFU) et leur survie était suivie tous les jours.

Discussion

Malgré l'existence de vaccins et d'antibiotiques permettant de lutter et de protéger les populations contre certaines infections bactériennes respiratoires, *S. pneumoniae* reste encore aujourd'hui une cause majeure de morbidité et de mortalité dans le monde notamment chez les enfants et les personnes âgées (Levine et al., 2006; OMS, 2013). Une des explications de l'efficacité partielle de la vaccination anti-pneumococcique réside dans l'émergence de nouveaux sérotypes de *S. pneumoniae* non contenus dans les vaccins en circulation (Bewick et al., 2012; Griffin et al., 2013). Le système immunitaire joue un rôle très important dans le contrôle des infections à pneumocoque notamment les acteurs moléculaires et cellulaires précoces de l'immunité innée (Koppe et al., 2012). Pour cette raison, une étude précise des mécanismes immunitaires impliqués dans la réponse de l'hôte contre ce pathogène semble nécessaire. En effet, une meilleure connaissance de la réponse anti-infectieuse contre le pneumocoque pourrait à terme conduire à la définition de nouvelles cibles thérapeutiques pour lutter contre ce pathogène.

Parmi les acteurs de la réponse immunitaire innée, les lymphocytes T $\gamma\delta$ représentent des candidats intéressants connus pour participer à la résolution de l'infection pneumococcique (Kirby et al., 2007). Cependant, leur fonction antibactérienne précise ainsi que les mécanismes mis en jeu dans leur activation dans ce contexte restent encore mal connus.

L'une des caractéristiques des lymphocytes T $\gamma\delta$ (notamment ceux retrouvés au niveau des muqueuses) est leur grande capacité à produire une cytokine clé dans la régulation des réponses immunitaires au niveau des muqueuses, l'IL-17 (Iwakura et al., 2011). Au cours des réponses antibactériennes, l'IL-17 participe notamment au recrutement des polynucléaires neutrophiles au site infectieux via l'induction de facteurs chimio-attractants produits par l'épithélium respiratoire (Kolls et al., 2010; Laan et al., 1999). En effet, les neutrophiles grâce à leur propriétés naturelles d'élimination des pathogènes extracellulaires (ex. phagocytose, production de protéines lytiques et NETosis) comme le pneumocoque jouent un rôle crucial dans le confinement et la clairance de cette bactérie (Standish et al., 2009).

De façon inopinée, nous avons récemment démontré l'existence d'une sous-population de lymphocytes T $\gamma\delta$ pulmonaires présentant une expression en surface atypique de la molécule CD3 (Paget et al., 2015). De plus, en adéquation avec leur phénotype, ces cellules présentaient une capacité incroyable à produire de l'IL-17 en réponse à différents stimuli suggérant une fonction

spécialisée de ces dernières dans la production de cette cytokine (Paget et al., 2015). Bien que retrouvées dans la plupart des tissus testés à l'exception du tractus digestif, nous avons démontré une localisation préférentielle de ces cellules dans les poumons et la peau suggérant un rôle particulier de cette population dans le développement des réponses immunitaires au niveau des interfaces hôte/milieu extérieur.

Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que les lymphocytes T $\gamma\delta$ « CD3^{bright} » pourraient jouer un rôle prépondérant dans le développement et/ou la régulation de la réponse immunitaire de l'hôte dans un modèle d'infection pulmonaire invasive à *S. pneumoniae*. Dans ce contexte, le but de mon projet de thèse fut d'étudier l'implication des lymphocytes T $\gamma\delta$ producteurs d'IL-17 ($\gamma\delta$ T17) et notamment la population CD3^{bright}, ainsi que les mécanismes sous-tendant leur activation en réponse au pneumocoque.

Pourquoi les lymphocytes T $\gamma\delta$ sont-ils la source majeure d'IL-17A dans les premiers instants de l'infection pneumococcique ?

Grâce à l'utilisation de souris génétiquement modifiées et d'approches de cytométrie en flux, nous avons pu démontrer que parmi les différentes cellules immunitaires connues pour produire de l'IL-17, les lymphocytes T $\gamma\delta$ représentent la population majeure productrice d'IL-17 à la suite d'une infection à pneumocoque.

Afin de comprendre les causes de cette production préférentielle d'IL-17A par les $\gamma\delta$ T17, nous avons étudié leur modalité d'activation. Ainsi nous avons pu démontrer en accord avec la littérature (Sutton et al., 2009), que l'IL-1 β et l'IL-23 produites rapidement en réponse à l'infection étaient nécessaires et suffisantes pour activer les $\gamma\delta$ T17. Toutefois nous pouvons nous poser la question de savoir pourquoi certaines populations de lymphocytes innés, tels que les cellules NKT, connus pour produire de l'IL-17A en réponse aux mêmes facteurs (Doisne et al., 2011) ne produisent qu'une quantité négligeable de cette cytokine en comparaison aux $\gamma\delta$ T17.

La première hypothèse est que les $\gamma\delta$ T17 présentent un état de pré-activation supérieur aux cellules NKT comme nous avons pu le juger par une expression basale plus importante du marqueur d'activation CD69. De plus, nous avons pu observer un plus fort niveau d'expression en surface des récepteurs à l'IL-1 et l'IL-23 par les $\gamma\delta$ T17 en comparaison aux cellules NKT. En effet, ce phénotype permet probablement une détection plus efficace des cytokines par ces cellules. De plus,

la concentration d'IL-1 et d'IL-23 dans l'environnement pulmonaire étant probablement limitante, cela se traduit par une compétition entre populations cellulaires pour ces cytokines activatrices. En ce qui concerne les $\gamma\delta$ T17, nous avons pu également observer une différence dans la capacité intrinsèque des sous-populations à produire de l'IL-17. En effet, nous montrons qu'au sein des $\gamma\delta$ T17, la population CD3^{bright} est responsable à elle-seule de près des 2/3 de la production d'IL-17A. Certaines sous-populations de lymphocytes T $\gamma\delta$ sont connues pour produire de grandes quantités d'IL-17A comparativement aux autres résultants d'un programme de différenciation préétablie lors de leur développement thymique (Haas et al., 2012). Toutefois, il nous a paru surprenant d'observer que la population V γ 4⁺ connue pour produire de grandes quantités d'IL-17A dans différents modèles (O'Brien et al., 2009) et présentant une expression similaire de récepteurs à l'IL-1 β et l'IL-23 produit significativement moins d'IL-17A en comparaison à la population CD3^{bright}. Nous avons ainsi émis l'hypothèse que les différentes populations de $\gamma\delta$ T17 pourraient avoir une localisation différentielle dans le tissu pulmonaire. Ainsi via une approche de cytométrie (Barletta et al., 2012), nous avons montré que les lymphocytes T $\gamma\delta$ CD3^{bright} se localisaient préférentiellement dans la zone interstitielle du poumon (90%) alors que les autres populations de lymphocytes T $\gamma\delta$ incluant la sous-population V γ 4⁺ étaient davantage retrouvées marginalisées dans la vasculature pulmonaire. De la même manière et en accord avec nos résultats biologiques, les cellules NKT étaient aussi majoritairement contenues dans la vasculature. Ainsi il est possible que la capacité des lymphocytes T $\gamma\delta$ CD3^{bright} à produire rapidement de l'IL-17A soit dictée par une localisation préférentielle de celles-ci dans le parenchyme pulmonaire, une zone en contact plus étroit avec les éventuels pathogènes présents dans les voies respiratoires et les alvéoles pulmonaires.

Les lymphocytes T $\gamma\delta$ CD3^{bright} V γ 6V δ 1 sont résidents dans le parenchyme pulmonaire : Une population spécialisée dans les défenses antibactériennes ?

Comme indiqué précédemment, un lien étroit existe entre la spécialité fonctionnelle des lymphocytes T $\gamma\delta$ (ex. production de cytokines spécifiques) et la nature du TCR exprimé par ces dernières (O'Brien et al., 2009). Nous avons récemment suggéré par des analyses génomiques que les lymphocytes T $\gamma\delta$ CD3^{bright} pulmonaires exprimaient un TCR invariant composé d'une chaîne V γ 6 appariée à une chaîne V δ 1 (Paget et al., 2015), une observation en accord avec la nature « Th17-like » de cette population (Haas et al., 2012). Toutefois nous avons voulu confirmer ces

données au niveau protéique. Pour cela, nous avons obtenu un anticorps (clone 17D1 : Dr R. Tigelaar, Université de Yale, USA) initialement développé pour cibler le TCR invariant V γ 5V δ 1 des « Dendritic Epidermal T Cells » (Mallick-Wood et al., 1998). Toutefois, sous certaines conditions (lorsque la chaîne V δ du TCR est en premier lieu stabilisée), cet anticorps cross-réagit avec le TCR V γ 6V δ 1 (Roark et al., 2004). Nous avons tiré profit de cette particularité pour tester notre hypothèse sur les lymphocytes T $\gamma\delta$ CD3^{bright}. Ainsi nous avons confirmé nos résultats basés sur des analyses génomiques pour démontrer que les lymphocytes T $\gamma\delta$ CD3^{bright} exprimaient uniformément le TCR invariant V γ 6V δ 1.

Comme vu précédemment, les lymphocytes T V γ 6V δ 1⁺ sont localisés dans le compartiment interstitiel pulmonaire et constituent ainsi l'une des premières lignes de défenses contre les pathogènes respiratoires comme le pneumocoque. Toutefois, il serait intéressant d'étudier la localisation précise de ces dernières dans le parenchyme pulmonaire. L'unique marqueur spécifique connu à ce jour étant le TCR V γ 6V δ 1, l'utilisation d'approches histologiques semble pour le moment impossible. En effet, le clone 17D1 ne semble pas donner un marquage optimal pour ce genre d'approche (Wands et al., 2005). La mise en évidence de nouveaux marqueurs spécifiques pour cette population semble donc un pré-requis pour répondre à cette question.

On peut toutefois citer que les lymphocytes T V γ 6V δ 1⁺ de la muqueuse vaginale sont localisés dans l'épithélium (Itohara et al., 1990). Il serait intéressant de savoir si leurs homologues pulmonaires ont une distribution similaire.

Leur localisation préférentielle dans les muqueuses pulmonaires et vaginales suggère également un environnement favorable à leur homéostasie. De façon intéressante, nous avons déjà démontré que le microbiote jouait un rôle important dans la maintenance de la population V γ 6V δ 1. En effet, le conditionnement des souris dans un environnement « Germ-free » réduit très fortement la fréquence et le nombre absolu (~ 75%) de V γ 6V δ 1 dans le poumon en comparaison avec des animaux maintenu dans un environnement classique « SPF » (Paget et al., 2015). De plus, mes travaux de thèse montrent une diminution quasi-similaire de la fréquence des lymphocytes T V γ 6V δ 1⁺pulmonaires chez les souris *Il23p19*^{-/-} suggérant que l'IL-23 pourrait avoir lui aussi un rôle dans la maintenance de cette population en périphérie. Dans ce contexte, il est tentant de spéculer que ces deux observations pourraient être liées.

En effet, les muqueuses pulmonaires et vaginales sont colonisées par une flore très riche en bactéries lactiques. L'acide lactique étant connu pour influencer positivement la production d'IL-

23 (Witkin et al., 2011; Yabu et al., 2011), il est envisageable qu'au travers de la production de lactate, les bactéries commensales des muqueuses vaginales et pulmonaires favorisent la production d'IL-23 en « steady-state » et donc la maintenance des lymphocytes T $\gamma\delta$ V γ 6V δ 1 dans ces compartiments. L'absence de V γ 6V δ 1 dans les différentes parties du tractus digestif (intestin grêle et colon) reste à ce jour un mystère. Toutefois il est possible que la plus grande diversité d'espèces bactériennes dans ce compartiment induise des signaux environnementaux non propices au « homing » des lymphocytes T V γ 6V δ 1.

L'utilisation de souris déficientes pour le récepteur au lactate (GPR81) pourrait dans le futur nous permettre d'évaluer cette hypothèse. Une hypothèse d'autant plus intéressante qu'elle s'insère pleinement dans l'intérêt croissant des immunologistes sur le rôle du métabolisme glucidique (notamment la balance fermentation/respiration) dans les processus de régulation de la réponse immune.

Que traduit la forte expression de CD3 à la surface des lymphocytes T V γ 6V δ 1 ?

Une autre caractéristique atypique des lymphocytes T V γ 6V δ 1 est le fort niveau de signaux CD3 retrouvé à leur surface. L'explication la plus simple pourrait résider dans une différence d'accessibilité de l'anticorps pour l'épitope par rapport aux autres sous-populations. Toutefois, l'utilisation des clones 17A2 et 2C11, deux clones reconnaissant respectivement la sous-unité CD3 ϵ et le complexe dimérique CD3 $\gamma\epsilon$ permet une séparation similaire des lymphocytes T V γ 6V δ 1 (Paget et al., 2015).

Une autre hypothèse séduisante est que ce TCR pourrait avoir une composition et/ou une stœchiométrie particulière. En effet certains TCR ont déjà été démontrés comme présentant une structure alternative dans laquelle certaines sous-unités du complexe CD3 (CD3 ζ et CD3 η) sont substituées par un homodimère de la sous-unité γ du récepteur de haute affinité pour les IgE (Fc ϵ RI γ) (Koyasu et al., 1992). Toutefois, nous avons écarté cette hypothèse via l'analyse du compartiment V γ 6V δ 1 chez des souris Fc ϵ RI γ ^{-/-} (Paget et al., 2015). Par ailleurs, la façon empirique par laquelle le clone 17D1 cross-réagit avec le TCR V γ 6V δ 1 va dans le sens d'un complexe CD3/TCR alternatif. En effet, au cours de l'étude initiale ayant démontré la cross-réactivité du clone 17D1 sur le TCR V γ 6V δ 1 (Roark et al., 2004), les auteurs émettent l'hypothèse que le complexe TCR/CD3 de cette population pourrait présenter une structure unique différente des autres lymphocytes T $\gamma\delta$. Dans ce contexte, l'étude de la composition et de la stœchiométrie

du TCR V γ 6V δ 1 par des approches biochimiques (2D SDS-PAGE analysis et Blue native PAGE) serait intéressante à réaliser. Toutefois le faible nombre absolu de ces cellules représente un frein important dans la mise en place de ce genre d'approche. L'utilisation d'un hybridome T V γ 6V δ 1 pourrait être une alternative intéressante afin d'évaluer cette question. Cet outil vient d'ailleurs d'être généré par le laboratoire de nos collaborateurs canadiens (A/Prof. T. Mallevaey, Université de Toronto) et sera ainsi testé dans nos travaux futurs.

Que reconnaît le TCR V γ 6V δ 1 ?

Le répertoire antigénique des lymphocytes T $\gamma\delta$ murins et plus particulièrement des lymphocytes T V γ 6V δ 1 est à l'heure actuelle inconnu. Sur la base de l'invariance du TCR, nous pouvons postuler que ce répertoire est probablement relativement restreint. Le développement de nouveaux outils biologiques est donc indispensable afin de pouvoir détecter et rechercher *in vitro* et *in vivo* les ligands putatifs du TCR V γ 6V δ 1. Sur une base collaborative, nous développons à l'heure actuelle un TCR soluble V γ 6V δ 1 afin d'obtenir des multimères de forte affinité pour ses ligands et utilisables via différentes approches comme la cytométrie en flux ou la thermophorèse/résonance plasmonique de surface. L'utilisation de l'hybridome exprimant le TCR V γ 6V δ 1 décrit ci-dessus nous sera également précieuse dans ces études.

Les polynucléaires neutrophiles : Une source inattendue d'IL-1 β

Longtemps considérée comme une cellule "mono-tâche" spécialisée dans l'élimination des pathogènes (phagocytose, dégranulation de protéines antibactériennes et NETosis), plusieurs études récentes ont introduit le concept que les neutrophiles étaient en fait des cellules complexes douées de fonctions diverses et variées. Par exemple, les neutrophiles semblent être équipés pour produire divers médiateurs inflammatoires tels que des cytokines et des chimiokines (Mantovani et al., 2011). Via cette caractéristique il est possible que sous certaines conditions les neutrophiles puissent jouer des rôles accessoires immuno-régulateurs, loin de leur rôle traditionnel de cellules « tueuses ».

Dans notre étude, nous avons démontré qu'au cours de l'infection par *S. pneumoniae*, les polynucléaires neutrophiles représentaient la source cellulaire majeure d'IL-1 β , une cytokine généralement issue d'autres populations immunes en contexte infectieux comme les macrophages. Au cours de notre analyse, nous avons toutefois montré que d'autres populations myéloïdes étaient

capables de produire du proIL-1 β dans des proportions similaires aux neutrophiles. De plus, la déplétion en neutrophiles n'abroge pas complètement la production d'IL-1 β bioactive dans le poumon suggérant que d'autres sources cellulaires ont un rôle non négligeable dans ce phénomène. Ainsi, pourquoi les neutrophiles semblent-ils la source majoritaire d'IL-1 β dans notre modèle infectieux? Etant donné que nos résultats suggèrent un mécanisme conservé de production d'IL-1 β par les différentes populations cellulaires, l'hypothèse la plus simple est que les neutrophiles produisent de grandes quantités d'IL-1 β dû à leur plus grande représentation dans le poumon. En accord avec nos observations, le laboratoire d'Eric Pearlman a très récemment démontré que les neutrophiles étaient également une source majeure d'IL-1 β dans un modèle de kératite à *S. pneumoniae* (Karmakar et al., 2015).

Une autre observation intéressante est que, via cette capacité à produire de l'IL-1 β , les neutrophiles participent indirectement à leur propre recrutement vers le site d'infection. Une observation en accord avec une autre étude récente montrant le rôle de cette cytokine dans la régulation de la neutrophilie en réponse à un autre sérotype de *S. pneumoniae* (Jose et al., 2015). Il serait intéressant à l'avenir d'étudier si cette fonction accessoire des neutrophiles est restreinte à certaines populations particulières retrouvées dans certains tissus ou bien si le neutrophile est une cellule « plastique » dont les fonctions sont gouvernées par des signaux environnementaux. Au regard de nos résultats, on peut émettre l'hypothèse que leur fonction accessoire soit dominante aux temps précoces de l'infection (pas de contact direct avec les pathogènes) pour laisser réapparaître par la suite leur fonction « traditionnelle » de cellules spécialisées dans l'élimination des pathogènes une fois la colonisation de la bactérie établie.

Les neutrophiles pulmonaires : une population aux fonctions pléiotropiques ou subdivisée en populations fonctionnellement spécialisées ?

Il devient de plus en plus évident, au regard de la littérature actuelle, que les neutrophiles sont des cellules complexes douées d'un grand nombre de fonctions. Ainsi, l'existence de différentes sous-populations de neutrophiles possédant des fonctions spécialisées a récemment été décrite dans l'inflammation et le cancer (Arnardottir et al., 2012 ; Sagiv et al., 2015). Par ailleurs, peu de données sont, à ce jour, disponibles sur le sujet au cours des infections respiratoires pourtant l'un des réservoirs principaux de neutrophiles. Toutefois, une étude réalisée par Bou Ghanem et ses collègues a montré que les fonctions des neutrophiles dans le contexte d'une infection intra-

trachéale par *S. pneumoniae* sérotype IV varient dans le temps (Bou Ghanem et al., 2015). En effet, si les neutrophiles sont déplétés avant l'infection, ceci induit un effet délétère sur la réponse anti-infectieuse se caractérisant par une diminution de la survie et une augmentation de la charge bactérienne. Par contre, une déplétion 18h après l'infection entraîne des effets bénéfiques. Encore une fois, il reste à définir si cette observation s'explique par l'existence de plusieurs populations de neutrophiles aux fonctions différentes, ou bien due à la plasticité fonctionnelle de ces cellules dans le déroulement de l'infection.

Nos travaux préliminaires suggèrent toutefois l'existence de sous-populations neutrophiliques pulmonaires spécialisées chez des souris naïves. A l'avenir, il serait intéressant de déterminer la signature transcriptomique de ces « subsets » et leur relevance physiologique dans différents modèles expérimentaux d'infections respiratoires. La création de modèles animaux de délétion conditionnelle à partir de souris MRP8-cre (expression spécifique dans les granulocytes) pourrait être utile.

Les neutrophiles : une population spécialisée dans la formation des inflammasomes ?

L'expression de différents composants des inflammasomes a déjà été décrite à l'état basal dans la plupart des populations de la lignée myéloïde comme les monocytes ou encore les cellules dendritiques (Guarda et al., 2011). Jusqu'à très récemment, la capacité des neutrophiles à former des inflammasomes fonctionnels n'avait pas été étudiée.

Toutefois, Chen et ses collègues ont montré que les neutrophiles présentent un inflammasome NLRC4 actif suite à une infection péritonéale aigüe par *Salmonella typhimurium* et constituent ainsi la source cellulaire majeure d'IL-1 β *in vivo* (Chen et al., 2014).

D'autres études suggèrent également l'existence d'un inflammasome NLRP3 fonctionnel au sein de ces cellules. Pour preuve de concept, Mankan et ses collègues ont montré artificiellement *in vitro* que des neutrophiles dérivés de moelle osseuse expriment un inflammasome NLRP3 actif en réponse au LPS et à la nigéricine (Mankan et al., 2012). De plus, une autre étude a démontré que la production d'IL-1 β *in vitro* par des neutrophiles dérivés de moelle osseuse de souris *Asc^{-/-}* diminue suite à une stimulation par *Staphylococcus aureus* (Cho et al., 2012). Via l'utilisation d'inhibiteurs de NLRP3 et de caspase-1, les auteurs ont observé une diminution de la production d'IL-1 β suggérant l'implication de l'inflammasome NLRP3 dans cet effet. Plus récemment, Karmakar et ses collègues ont pu vérifier ce même phénotype *in vitro* suite à une activation par

une souche de *Streptococcus pneumoniae* (sérotypé 4) inactivée par la chaleur (Karmakar et al., 2015).

Si ces études suggèrent la présence d'un inflammasome NLRP3 fonctionnel au sein des neutrophiles, la preuve *in vivo* de cette activité reste encore à démontrer. Grâce à l'utilisation de souris génétiquement et de souches bactériennes mutantes, nos travaux démontrent la fonctionnalité de l'inflammasome NLRP3 au sein des neutrophiles pulmonaires et la relevance de ce dernier sur le développement de la réponse antibactérienne dans notre modèle d'infection respiratoire à *S. pneumoniae*. Toutefois afin de valider définitivement notre hypothèse, le développement d'un modèle animal de délétion conditionnel de l'inflammasome NLRP3 au sein des neutrophiles est nécessaire. En collaboration avec le laboratoire du Prof. Lamkanfi (Université de Gand, Belgique), nous développons actuellement ce modèle grâce au croisement d'une souris MRP8-cre (expression du gène sélective par les granulocytes) avec une souris *Casp-1*(f/f). Ces souris seront bientôt disponibles et valorisés dans notre modèle infectieux afin de corroborer ou non nos résultats. Il serait également intéressant d'évaluer l'importance de cet inflammasome NLRP3 porté par les neutrophiles dans d'autres modèles de réponses immunes telles que l'inflammation ou le cancer.

Dans notre modèle, les neutrophiles semblent être la source majoritaire d'IL-1 β devant des cellules normalement « spécialisées » dans la formation d'inflammasome tel que les macrophages ou les DCs. Si comme noté précédemment, l'explication la plus simple et la plus logique sur ce phénomène réside dans leur nombre plus important au site infectieux, il serait toutefois intéressant de comparer leur capacité intrinsèque à produire de l'IL-1 β de façon NLRP3-dépendante *in vitro* en comparaison avec d'autres populations myéloïdes (macrophages et DCs); Une question certes très fondamentale mais qui permettrait à la communauté « inflammasome » de pouvoir considérer ou non les neutrophiles comme des cellules d'intérêt dans ce domaine de recherche.

Il est également à noter que nos résultats non publiés suggèrent que les éosinophiles pulmonaires semblent capables de former un inflammasome NLRP3 fonctionnel. Si la relevance de cette observation semble peu probable dans un modèle d'infection bactérienne, il serait intéressant d'étudier finement leur contribution dans des modèles d'hypersensibilité (asthme, dermatite) ou d'infections parasitaires.

Au-delà de leur capacité à induire la synthèse des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-18 ou IL-33, l'activité des inflammasomes peut aboutir au développement d'un programme de mort

cellulaire, dépendant de caspase-1, appelé « pyroptose » (Lamkanfi et al., 2012). Les études *in vitro* semblent indiquer que l'activation des inflammasomes au sein des neutrophiles ne conduit pas à une pyroptose de ces dernières (Chen et al., 2014; Karmakar et al., 2015). Au regard de la fragilité de ces cellules en culture, cette observation est relativement surprenante. Conceptuellement, la possible résistance des neutrophiles à la pyroptose pourrait s'avérer bénéfique pour l'hôte en permettant à ces dernières de maintenir leur capacité à produire des cytokines pro-inflammatoires au site infectieux sans compromettre leur activité antibactérienne directe subséquente et indépendante des inflammasomes (phagocytose). Si nos résultats *in vitro* semblent aller dans le sens des travaux précédents (< 5% de mort cellulaire en culture), nous ne pouvons pas exclure la possibilité que la production d'IL-1 β par les neutrophiles soit due à une faible fraction de la population entrant en pyroptose. L'évaluation de marqueurs plus spécifique de la pyroptose et l'utilisation de techniques d'imagerie pourrait nous permettre d'étudier plus finement ce phénomène.

L'activation de l'inflammasome NLRP3 des neutrophiles nécessite une « collaboration » entre le pathogène et l'hôte.

D'un point de vue mécanistique, l'activation de l'inflammasome NLRP3 au sein des neutrophiles est dépendante du TNF- α produit par les macrophages alvéolaires (AMs) (signal 1) et de la pneumolysine bactérienne pour l'activation et la formation de l'inflammasome NLRP3 (signal 2).

- Signal 1 :

Nos observations diffèrent ainsi de l'étude réalisée par l'équipe d'Eric Pearlman dans un modèle de kératite à pneumocoque notamment concernant l'étape de priming (Karmakar et al., 2015). En effet, dans leur démonstration essentiellement *in vitro*, les auteurs utilisent des neutrophiles dérivés de moelle osseuse et des bactéries inactivées par la chaleur. Ainsi, dû à l'absence de contraintes physique d'un modèle *in vitro*, Karmakar et ses collègues proposent que l'étape de priming de l'inflammasome NLRP3 dépende de la reconnaissance directe de PAMPs bactériens par le neutrophile. Toutefois, ce modèle ne traduit pas la complexité spatiale et temporelle d'un organe tel que le poumon. Dans notre modèle, nous montrons que le priming rapide observé au sein des neutrophiles apparaît même que les bactéries sont encore contenues dans les alvéoles au contact des AMs mais pas des neutrophiles. En l'absence de co-localisation entre la bactérie et le neutrophile, il est peu probable qu'une reconnaissance directe via les PRRs neutrophiliques puisse

être mise en cause. Nous proposons donc qu'un intermédiaire existe entre le neutrophile et la bactérie. Ainsi nous avons pu démontrer l'importance du TNF- α produit par les AMs dans le priming des neutrophiles. Les causes de cette production cytokinique n'ont pas été évaluées dans notre étude mais au regard de leur localisation conjointe dans les alvéoles, il est fort probable que la synthèse de TNF- α par les AMs repose sur la reconnaissance directe de composants pneumococciques. Cependant à des temps plus tardifs, nous ne pouvons pas exclure qu'une fois que (i) la bactérie aura franchi la barrière alvéolo-capillaire ou (ii) que les neutrophiles auront migré dans les espaces aériens, le mécanisme de priming soit dépendant d'une reconnaissance directe de *S. pneumoniae* par les neutrophiles.

Dans notre modèle, l'activation des neutrophiles se fait par une signalisation dépendante du récepteur TNFR1. Ainsi nos travaux montrent pour la première fois la fonctionnalité de TNFR1 à la surface des neutrophiles. L'abrogation totale de priming chez les souris *Tnfrsf1a*^{-/-} suggère que le signal est complètement dépendant de ce récepteur et donc indépendant de TNFR2. Toutefois seule l'utilisation d'une souris déficiente pour ce récepteur nous permettra de valider cela. Au regard de la littérature actuelle, ces observations font sens car la signalisation de TNFR1 aboutit à l'activation du facteur de transcription NF- κ B (Wertz et al., 2010), une étape essentielle au priming de l'inflammasome (Gross et al., 2011).

- *Signal 2 :*

En ce qui concerne l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans les neutrophiles, nos travaux montrent grâce à l'utilisation de souches mutantes et d'approches *in vitro* l'importance de la pneumolysine de pneumocoque dans ce phénomène. Cette observation est en accord avec les travaux initiaux du groupe d'Aras Kadioglu (Université de Liverpool, UK) montrant l'importance de ce facteur de virulence dans l'activation générale de l'inflammasome NLRP3 au cours de l'infection pneumococcique (McNeela et al., 2010). L'étude *in vitro* de Karmakar montre également le rôle de cette toxine dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans les neutrophiles (Karmakar et al., 2015). Le rôle de cette famille de toxines formant des pores au niveau des membranes cellulaires est reconnu comme un mécanisme courant d'activation de l'inflammasome NLRP3 au cours des infections (Munoz-Plannilo et al., 2013). La formation de ces pores entraîne alors une modification de la concentration en potassium cytosolique aboutissant à l'activation de NLRP3.

Plus récemment, l'équipe d'Eric Pearlman a proposé une nouvelle voie d'activation de NLRP3 au sein des neutrophiles via l'engagement du récepteur P2X₇ (Karmakar et al., 2016). En effet, leur étude suggère *in vitro* que l'ATP présent dans l'environnement pourrait engager ce récepteur purinergique pour induire le priming des neutrophiles. Cependant, il faut noter que, *in vivo*, l'obtention de concentration d'ATP de l'ordre du mM ne peut être observée qu'en cas de très forte inflammation et ainsi ne pourrait participer à l'activation de l'inflammasome NLRP3 qu'à des temps tardifs, une fois l'infection bien établie.

Notre étude met ainsi en évidence un mécanisme tripartite dans lequel la bactérie, les AMs et les neutrophiles interagissent activement pour produire de grandes quantités d'IL-1 β indispensables au développement d'une réponse immunitaire de l'hôte protectrice.

Un inflammasome NLRP3 fonctionnel dans les neutrophiles humains

Tout comme les cellules myéloïdes murines, les macrophages humains primaires stimulés avec du LPS sont capables d'augmenter leur expression protéique de NLRP3, et une fois activés avec de l'ATP, ces cellules produisent de l'IL-1 β de façon dépendante de l'inflammasome (Netea et al., 2009). De plus, via l'utilisation de la lignée monocytaire THP-1, l'oligomérisation d'ASC ainsi qu'un clivage de la pro-caspase-1 en caspase-1 ont été mis en évidence (Nurmi et al., 2013).

De même, une étude réalisée par Fernandez et ses collègues a montré que les DCs isolées de sang périphérique humain présentent un inflammasome NLRP3 fonctionnel. Une production d'IL-1 β a été observée suite à un priming TLR-dépendant et une stimulation par la nigéricine ou l'ATP. L'utilisation d'un inhibiteur spécifique confirme bien que le phénotype observé est dépendant de l'inflammasome NLRP3 (Fernandez et al., 2015).

Les données concernant les neutrophiles sont quant à elles plus rares. Toutefois, les neutrophiles humains expriment les différents composants de l'inflammasome NLRP3 dont ASC et caspase-1. Ainsi il semble que les neutrophiles humains soient équipés pour produire des cytokines pro-inflammatoires NLRP3-dépendantes telles que l'IL-1 β (Bakele et al., 2014). La culture de neutrophiles en présence de LPS et d'ATP confirme cela (Bakele et al., 2014). En plus, une étude effectuée par Perez-Figueroa et ses collègues a montré que l'infection des neutrophiles humains par *Helicobacter pylori* entraîne une production d'IL-1 β concomitante avec l'expression de composants de l'inflammasome NLRP3 tels que les protéines ASC et NLRP3 et une augmentation de l'activité de la caspase-1 (Perez-Figueroa et al., 2016). Enfin, l'incubation de neutrophiles

humains de sang périphérique avec une souche « heat-killed » de *S. pneumoniae* sérotype 4 induit une production d'IL-1 β associée avec les caractéristiques de la formation d'un inflammasome NLRP3 (Karmakar et al., 2015). De façon intéressante, l'utilisation d'une bactérie mutée pour la pneumolysine induit une diminution de la production d'IL-1 β en comparaison avec la souche parentale.

Similairement à nos résultats murins, nous avons pu démontrer que les neutrophiles humains pouvaient produire de l'IL-1 β en réponse au TNF- α et la pneumolysine. Grâce à l'utilisation du nouvellement décrit inhibiteur spécifique MCC950 (Coll et al., 2015), nous avons pu démontrer que cette production d'IL-1 β est totalement dépendante de l'inflammasome NLRP3.

Cependant, la technique de purification utilisée pour isoler les neutrophiles humains est critique pour la bonne interprétation des résultats. En effet, l'isolation de neutrophiles par gradient de densité induit généralement une contamination par des monocytes représentant la source majeure d'IL-1 β (Sabroe et al., 2004). Selon Bakele et ses collègues, l'utilisation de neutrophiles humains purifiés par sélection négative devrait être privilégiée et permettrait d'obtenir une pureté maximale (Bakele et al., 2014). Toutefois, même si cette dernière technique semble améliorer le rendement obtenu, nous avons eu recours dans notre étude à une séparation par gradient de densité. Les fréquences de monocytes obtenus furent négligeables, voire quasi-nulles (1.7% environ), et la pureté neutrophilique toujours supérieure à 80%, ce qui suggère que la technique de séparation traditionnelle reste efficace et utilisable.

Manipuler la biologie de l'IL-7 : une nouvelle approche thérapeutique dans la régulation des pathologies respiratoires ?

A ce jour, 15 essais cliniques utilisant de l'IL-7 recombinante humaine ont été développés et/ou réalisés. En tant que facteur important dans le développement des lymphocytes T et B, certains essais avaient testé l'effet de cette cytokine dans des cas de transplantation de cellules souches hématopoïétiques, de lymphopénie, de cancer du rein et d'infections virales chroniques telles que le VIH et les virus de l'hépatite B et C (Mackall et al., 2011). Toutefois, aucune étude clinique basée sur l'administration d'IL-7 n'a pour le moment été développée pour les infections bactériennes. Il est important de noter qu'aux doses testées, ce traitement est plutôt bien toléré par les patients. Les effets secondaires associés les plus communément observés comprennent de la fièvre, des malaises, une augmentation transitoire des enzymes hépatiques, des érythèmes et une

douleur au point d'injection. Ainsi ces données suggèrent la faisabilité d'approches thérapeutiques en clinique basées sur l'utilisation de l'IL-7.

Par ailleurs les données sur des modèles précliniques sont plus abondantes. Au cours de l'infection par *Mycobacterium tuberculosis*, le traitement thérapeutique de souris par l'IL-7 aboutit à une amélioration de leur survie, sans effets toutefois sur la formation/composition des granulomes ou sur la charge bactérienne (Maeurer et al., 2000). Dans un autre modèle d'infection intestinale à *Citrobacter rodentium*, Zhang et ses collègues ont pu montrer que l'IL-7 produit par les cellules épithéliales intestinales était critique dans la protection contre ce pathogène. L'utilisation d'un anti-IL-7R α entraîne une augmentation de la charge bactérienne associée à une aggravation des dommages intestinaux et une diminution de la survie des souris (Zhang et al., 2015). Une étude effectuée par Kasten et ses collègues a montré, dans un modèle de sepsis, que l'administration d'IL-7 aux souris aboutissait à une augmentation du taux d'IL-17 principalement due à un recrutement de lymphocytes T $\gamma\delta$. L'administration d'IL-7 chez des souris *Tcrd*^{-/-} a montré une diminution de la production d'IL-17 au niveau des lavages péritonéaux. De plus, l'IL-7 aboutit à une diminution de la bactériémie et une augmentation du recrutement des neutrophiles. Toutefois, le traitement n'avait aucun effet sur la fonction de ces derniers (Kasten et al., 2010).

Etant donné le rôle de l'IL-7 dans la maintenance et l'activation des populations de lymphocytes T $\gamma\delta$ et NKT productrices d'IL-17 (Michel et al., 2012; Webster et al., 2014), nous avons émis l'hypothèse qu'un traitement prophylactique local avec de l'IL-7 puisse avoir un effet bénéfique sur la réponse immunitaire anti-pneumococcique. Notre étude montre que ce traitement chez des souris naïves induit une augmentation du pool de cellules innées présentant un phénotype de cellules productrices d'IL-17 ($\gamma\delta$ T17 et NKT). Nous avons également montré que ce traitement avait un rôle similaire sur les ILC3 pulmonaires corrélé avec une production d'IL-22 plus importante. Toutefois, des études complémentaires seront nécessaires afin de potentiellement exploiter ce phénotype. De plus la restimulation de leucocytes pulmonaires de souris traitées avec l'IL-7 résulte en une production massive d'IL-17 en comparaison aux leucocytes de souris contrôles. De façon intéressante, nos observations semblent restreintes au poumon réduisant les risques d'effets secondaires potentiellement induits par cette cytokine. Dans le contexte d'infection par le pneumocoque, ce traitement conduit à une production plus importante d'IL-17A par les $\gamma\delta$ T17 mais pas par les cellules NKT. De façon similaire à nos observations faites au cours de l'infection

naturelle à *S. pneumoniae*, il est possible que la compétition entre ces deux populations pour les cytokines activatrices (ex. IL-1 et IL-23) soit responsable de ce phénotype

En corrélation avec cette augmentation de la production d'IL-17A, nous observons une augmentation du recrutement des neutrophiles associée à une diminution significative de la charge bactérienne chez les souris traitées par l'IL-7. D'une façon globale, ce traitement semble avoir un effet prophylactique bénéfique pour les souris en cas d'infection bactérienne par *S. pneumoniae*. Des investigations supplémentaires seront nécessaires afin de mieux comprendre les modalités d'action de l'IL-7 mais aussi de mettre en évidence son efficacité dans d'autres modèles d'infections bactériennes respiratoires.

L'IL-17 a un rôle pivot dans le développement des réponses immunitaires au niveau du poumon. Dans ce contexte, nous pouvons imaginer que dans des modèles dans lesquels cette cytokine joue un rôle délétère comme l'inflammation (asthme, fibrose pulmonaire ou broncho-pneumopathie chronique obstructive), l'utilisation d'anticorps neutralisants dirigés contre l'IL-7 puisse être exploitée.

Conclusion

En conclusion, mes travaux de thèse ont permis pour la première fois la mise en évidence de la fonctionnalité et la relevance biologique de l'inflammasome NLRP3 dans les neutrophiles pulmonaires *in vivo* dans notre modèle d'infection respiratoire par *S. pneumoniae*.

De façon inattendue, les neutrophiles semblent avoir un rôle accessoire original à des temps précoces de l'infection via leur capacité à produire de l'IL-1 β . Cette synthèse protéique est possible grâce à la combinaison de signaux à la fois dérivés de l'hôte (TNF- α des AMs) et de la bactérie (toxine). D'un point de vue « translationnel », nous avons été capables de récapituler ce mécanisme avec des neutrophiles humains isolés de sang périphérique.

De façon intégrée à la réponse immune, cette production d'IL-1 β par les neutrophiles participe à l'activation des populations de lymphocytes T $\gamma\delta$ producteurs d'IL-17 ; une cytokine essentielle dans le contrôle de l'infection bactérienne via sa capacité à induire rapidement le recrutement d'une deuxième vague de neutrophiles participant directement à l'élimination et la clairance bactérienne.

Sur la base de ces travaux fondamentaux, nous avons émis l'hypothèse qu'une augmentation du pool de cellules innées sécrétrices d'IL-17A pourrait avoir un impact positif sur le contrôle d'une infection respiratoire à pneumocoque. Ainsi via l'administration chronique et locale d'IL-7, nous avons été capables d'augmenter la fréquence de cellules productrices d'IL-17 résultant en un effet bénéfique dans la clairance du pathogène associé à une augmentation de l'activité de l'axe populations lymphocytaires innées produisant de l'IL-17/neutrophiles. A ce stade, même s'ils sont encourageants, il reste à mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires associés à cet effet dans l'éventualité de proposer une nouvelle approche thérapeutique dans la modulation des réponses immunitaires pulmonaires basée sur la manipulation de la biologie de l'IL-7.

Références

1. Abeyta M, Hardy GG, Yother J. Genetic alteration of capsule type but not PspA type affects accessibility of surface-bound complement and surface antigens of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*. 2003;71(1):218-25.
2. Aganna E, Martinon F, Hawkins PN, Ross JB, Swan DC, Booth DR, et al. Association of mutations in the NALP3/CIAS1/PYPAF1 gene with a broad phenotype including recurrent fever, cold sensitivity, sensorineural deafness, and AA amyloidosis. *Arthritis Rheum*. 2002;46(9):2445-52.
3. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006;124(4):783-801.
4. Albiger B et al. Myeloid differentiation factor 88-dependent signalling controls bacterial growth during colonization and systemic pneumococcal disease in mice. *Cellular microbiology*. 2005;7(11):1603-15.
5. Albiger B, Dahlberg S, Sandgren A, Wartha F, Beiter K, Katsuragi H, et al. Toll-like receptor 9 acts at an early stage in host defence against pneumococcal infection. *Cell Microbiol*. 2007;9(3):633-44.
6. Allen IC, Scull MA, Moore CB, Holl EK, McElvania-TeKippe E, Taxman DJ, et al. The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA. *Immunity*. 2009;30(4):556-65.
7. Alpdogan O, Eng JM, Muriglian SJ, Willis LM, Hubbard VM, Tjoe KH, et al. Interleukin-15 enhances immune reconstitution after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*. 2005;105(2):865-73.
8. Arnardottir HH, Freysdottir J, Hardardottir I. Two circulating neutrophil populations in acute inflammation in mice. *Inflamm Res*. 2012;61(9):931-9.
9. Arora P, Baena A, Yu KO, Saini NK, Kharkwal SS, Goldberg MF, et al. A single subset of dendritic cells controls the cytokine bias of natural killer T cell responses to diverse glycolipid antigens. *Immunity*. 2014;40(1):105-16.
10. Arredouani M, Yang Z, Ning Y, Qin G, Soininen R, Tryggvason K, et al. The scavenger receptor MARCO is required for lung defense against pneumococcal pneumonia and inhaled particles. *J Exp Med*. 2004;200(2):267-72.
11. Arredouani MS, Yang Z, Imrich A, Ning Y, Qin G, Kobzik L. The macrophage scavenger receptor SR-AI/II and lung defense against pneumococci and particles. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2006;35(4):474-8.
12. Atkins MB, Lotze MT, Dutcher JP, Fisher RI, Weiss G, Margolin K, et al. High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. *J Clin Oncol*. 1999;17(7):2105-16.
13. Bai L, Deng S, Reboulet R, Mathew R, Teyton L, Savage PB, et al. Natural killer T (NKT)-B-cell interactions promote prolonged antibody responses and long-term memory to pneumococcal capsular polysaccharides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(40):16097-102.
14. Bai L, Picard D, Anderson B, Chaudhary V, Luoma A, Jabri B, et al. The majority of CD1d-sulfatide-specific T cells in human blood use a semiinvariant Vdelta1 TCR. *Eur J Immunol*. 2012;42(9):2505-10.
15. Bakele M, Joos M, Burdi S, Allgaier N, Poschel S, Fehrenbacher B, et al. Localization and functionality of the inflammasome in neutrophils. *J Biol Chem*. 2014;289(8):5320-9.
16. Barbee SD, Woodward MJ, Turchinovich G, Mention JJ, Lewis JM, Boyden LM, et al. Skint-1 is a highly specific, unique selecting component for epidermal T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(8):3330-5.

17. Barletta KE, Cagnina RE, Wallace KL, Ramos SI, Mehrad B, Linden J. Leukocyte compartments in the mouse lung: distinguishing between marginated, interstitial, and alveolar cells in response to injury. *J Immunol Methods*. 2012;375(1-2):100-10.
18. Barthelemy A, Ivanov S, Fontaine J, Soulard D, Bouabe H, Paget C, et al. Influenza A virus-induced release of interleukin-10 inhibits the anti-microbial activities of invariant natural killer T cells during invasive pneumococcal superinfection. *Mucosal Immunology*. 2016.
19. Bauernfeind F, Bartok E, Rieger A, Franchi L, Nunez G, Hornung V. Cutting edge: reactive oxygen species inhibitors block priming, but not activation, of the NLRP3 inflammasome. *J Immunol*. 2011;187(2):613-7.
20. Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, Alnemri ES, MacDonald K, Speert D, et al. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol*. 2009;183(2):787-91.
21. Beiter K, Wartha F, Albiger B, Normark S, Zychlinsky A, Henriques-Normark B. An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps. *Curr Biol*. 2006;16(4):401-7.
22. Belmant C, Espinosa E, Halary F, Tang Y, Peyrat MA, Sicard H, et al. A chemical basis for selective recognition of nonpeptide antigens by human delta T cells. *FASEB J*. 2000;14(12):1669-70.
23. Bendelac A, Bonneville M, Kearney JF. Autoreactivity by design: innate B and T lymphocytes. *Nat Rev Immunol*. 2001;1(3):177-86.
24. Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:297-336.
25. Bennouna J, Bompas E, Neidhardt EM, Rolland F, Philip I, Galea C, et al. Phase-I study of Innacell gammadelta, an autologous cell-therapy product highly enriched in gamma9delta2 T lymphocytes, in combination with IL-2, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2008;57(11):1599-609.
26. Beres SB, Sylva GL, Barbian KD, Lei B, Hoff JS, Mammarella ND, et al. Genome sequence of a serotype M3 strain of group A *Streptococcus*: phage-encoded toxins, the high-virulence phenotype, and clone emergence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(15):10078-83.
27. Bergstresser PR, Sullivan S, Streilein JW, Tigelaar RE. Origin and function of Thy-1+ dendritic epidermal cells in mice. *J Invest Dermatol*. 1985;85(1 Suppl):85s-90s.
28. Bergtold A, Desai DD, Gavhane A, Clynes R. Cell surface recycling of internalized antigen permits dendritic cell priming of B cells. *Immunity*. 2005;23(5):503-14.
29. Berry AM, Yother J, Briles DE, Hansman D, Paton JC. Reduced virulence of a defined pneumolysin-negative mutant of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*. 1989;57(7):2037-42.
30. Bewick T, Sheppard C, Greenwood S, Slack M, Trotter C, George R, et al. Serotype prevalence in adults hospitalised with pneumococcal non-invasive community-acquired pneumonia. *Thorax*. 2012;67(6):540-5.
31. Bewley MA, Marriott HM, Tulone C, Francis SE, Mitchell TJ, Read RC, et al. A cardinal role for cathepsin d in co-ordinating the host-mediated apoptosis of macrophages and killing of pneumococci. *PLoS Pathog*. 2011;7(1):e1001262.
32. Bogaert D, De Groot R, Hermans PW. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis*. 2004;4(3):144-54.

33. Bonifati C, Trento E, Cordiali-Fei P, Carducci M, Mussi A, D'Auria L, et al. Increased interleukin-7 concentrations in lesional skin and in the sera of patients with plaque-type psoriasis. *Clin Immunol Immunopathol.* 1997;83(1):41-4.
34. Bonneville M, O'Brien RL, Born WK. Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(7):467-78.
35. Bonneville M, Scotet E. Human Vgamma9Vdelta2 T cells: promising new leads for immunotherapy of infections and tumors. *Curr Opin Immunol.* 2006;18(5):539-46.
36. Borst J, Coligan JE, Oettgen H, Pessano S, Malin R, Terhorst C. The delta- and epsilon-chains of the human T3/T-cell receptor complex are distinct polypeptides. *Nature.* 1984;312(5993):455-8.
37. Bou Ghanem EN, Clark S, Roggensack SE, McIver SR, Alcaide P, Haydon PG, et al. Extracellular Adenosine Protects against *Streptococcus pneumoniae* Lung Infection by Regulating Pulmonary Neutrophil Recruitment. *PLoS Pathog.* 2015;11(8):e1005126.
38. Boyden ED, Dietrich WF. Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin. *Nat Genet.* 2006;38(2):240-4.
39. Boyden LM, Lewis JM, Barbee SD, Bas A, Girardi M, Hayday AC, et al. Skint1, the prototype of a newly identified immunoglobulin superfamily gene cluster, positively selects epidermal gammadelta T cells. *Nat Genet.* 2008;40(5):656-62.
40. Boyman O, Kovar M, Rubinstein MP, Surh CD, Sprent J. Selective stimulation of T cell subsets with antibody-cytokine immune complexes. *Science.* 2006;311(5769):1924-7.
41. Boyman O, Ramsey C, Kim DM, Sprent J, Surh CD. IL-7/anti-IL-7 mAb complexes restore T cell development and induce homeostatic T Cell expansion without lymphopenia. *J Immunol.* 2008;180(11):7265-75.
42. Brandes M, Willmann K, Bioley G, Levy N, Eberl M, Luo M, et al. Cross-presenting human gammadelta T cells induce robust CD8+ alphabeta T cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(7):2307-12.
43. Brenner MB, McLean J, Dialynas DP, Strominger JL, Smith JA, Owen FL, et al. Identification of a putative second T-cell receptor. *Nature.* 1986;322(6075):145-9.
44. Brigl M, Tatituri RV, Watts GF, Bhowruth V, Leadbetter EA, Barton N, et al. Innate and cytokine-driven signals, rather than microbial antigens, dominate in natural killer T cell activation during microbial infection. *J Exp Med.* 2011;208(6):1163-77.
45. Briles DE et al. Pneumococcal diversity: considerations for new vaccine strategies with emphasis on pneumococcal surface protein A (PspA). *Clinical microbiology reviews.* 1998;11(4):645-57.
46. Briles DE, Crain MJ, Gray BM, Forman C, Yother J. Strong association between capsular type and virulence for mice among human isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 1992;60(1):111-6.
47. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004;303(5663):1532-5.
48. Brown L, Wolf JM, Prados-Rosales R, Casadevall A. Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nature reviews.* 2015;13(10):620-30.
49. Broz P, Dixit VM. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(7):407-20.

50. Broz P, Newton K, Lamkanfi M, Mariathasan S, Dixit VM, Monack DM. Redundant roles for inflammasome receptors NLRP3 and NLRC4 in host defense against Salmonella. *J Exp Med*. 2010a;207(8):1745-55.
51. Broz P, von Moltke J, Jones JW, Vance RE, Monack DM. Differential requirement for Caspase-1 autoproteolysis in pathogen-induced cell death and cytokine processing. *Cell Host Microbe*. 2010b;8(6):471-83.
52. Brueggemann AB, Griffiths DT, Meats E, Peto T, Crook DW, Spratt BG. Clonal relationships between invasive and carriage *Streptococcus pneumoniae* and serotype- and clone-specific differences in invasive disease potential. *J Infect Dis*. 2003;187(9):1424-32.
53. Brydges SD, Broderick L, McGeough MD, Pena CA, Mueller JL, Hoffman HM. Divergence of IL-1, IL-18, and cell death in NLRP3 inflammasomopathies. *J Clin Invest*. 2013;123(11):4695-705.
54. Caccamo N, La Mendola C, Orlando V, Meraviglia S, Todaro M, Stassi G, et al. Differentiation, phenotype, and function of interleukin-17-producing human Vgamma9delta2 T cells. *Blood*. 2011;118(1):129-38.
55. Carding SR, Egan PJ. Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(5):336-45.
56. Carnaud C, Lee D, Donnars O, Park SH, Beavis A, Koezuka Y, et al. Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. *J Immunol*. 1999;163(9):4647-50.
57. Carroll MC. The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nat Immunol*. 2004;5(10):981-6.
58. Case CL, Shin S, Roy CR. Asc and Ipaf Inflammasomes direct distinct pathways for caspase-1 activation in response to *Legionella pneumophila*. *Infect Immun*. 2009;77(5):1981-91.
59. Cassel SL, Eisenbarth SC, Iyer SS, Sadler JJ, Colegio OR, Tephly LA, et al. The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(26):9035-40.
60. Catros V, Toutirais O, Bouet F, Cabillic F, Desille M, Fournie JJ. [Tgammadelta lymphocytes in oncology: unconventional killer lymphocytes]. *Med Sci (Paris)*. 2010;26(2):185-91.
61. Cerundolo V, Silk JD, Masri SH, Salio M. Harnessing invariant NKT cells in vaccination strategies. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(1):28-38.
62. Chaix J, Tessmer MS, Hoebe K, Fuseri N, Ryffel B, Dalod M, et al. Cutting edge: Priming of NK cells by IL-18. *J Immunol*. 2008;181(3):1627-31.
63. Chamailard M, Hashimoto M, Horie Y, Masumoto J, Qiu S, Saab L, et al. An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat Immunol*. 2003;4(7):702-7.
64. Chen KW, Gross CJ, Sotomayor FV, Stacey KJ, Tschopp J, Sweet MJ, et al. The neutrophil NLRC4 inflammasome selectively promotes IL-1beta maturation without pyroptosis during acute Salmonella challenge. *Cell Rep*. 2014;8(2):570-82.
65. Cheng L, Cui Y, Shao H, Han G, Zhu L, Huang Y, et al. Mouse gammadelta T cells are capable of expressing MHC class II molecules, and of functioning as antigen-presenting cells. *J Neuroimmunol*. 2008;203(1):3-11.
66. Chiba A, Tajima R, Tomi C, Miyazaki Y, Yamamura T, Miyake S. Mucosal-associated invariant T cells promote inflammation and exacerbate disease in murine models of arthritis. *Arthritis Rheum*. 2012;64(1):153-61.

67. Chien YH, Zeng X, Prinz I. The natural and the inducible: interleukin (IL)-17-producing gammadelta T cells. *Trends Immunol.* 2013;34(4):151-4.
68. Cho JS, Guo Y, Ramos RI, Hebroni F, Plaisier SB, Xuan C, et al. Neutrophil-derived IL-1beta is sufficient for abscess formation in immunity against *Staphylococcus aureus* in mice. *PLoS Pathog.* 2012;8(11):e1003047.
69. Chua WJ, Truscott SM, Eickhoff CS, Blazevic A, Hoft DF, Hansen TH. Polyclonal mucosa-associated invariant T cells have unique innate functions in bacterial infection. *Infect Immun.* 2012;80(9):3256-67.
70. Chung Y, Chang WS, Kim S, Kang CY. NKT cell ligand alpha-galactosylceramide blocks the induction of oral tolerance by triggering dendritic cell maturation. *Eur J Immunol.* 2004;34(9):2471-9.
71. Cilloniz C, Ewig S, Polverino E, Munoz-Almagro C, Marco F, Gabarrus A, et al. Pulmonary complications of pneumococcal community-acquired pneumonia: incidence, predictors, and outcomes. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(11):1134-42.
72. Ciofani M, Zuniga-Pflucker JC. Determining gammadelta versus alpha beta T cell development. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(9):657-63.
73. Cohen RM, Kleinstein SH, Louzoun Y. Somatic hypermutation targeting is influenced by location within the immunoglobulin V region. *Mol Immunol.* 2011;48(12-13):1477-83.
74. Coll RC, Robertson AA, Chae JJ, Higgins SC, Munoz-Planillo R, Inserra MC, et al. A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nat Med.* 2015;21(3):248-55.
75. Colonna M. Interleukin-22-producing natural killer cells and lymphoid tissue inducer-like cells in mucosal immunity. *Immunity.* 2009;31(1):15-23.
76. Crowley MP, Fahrner AM, Baumgarth N, Hampl J, Gutgemann I, Teyton L, et al. A population of murine gammadelta T cells that recognize an inducible MHC class Ib molecule. *Science.* 2000;287(5451):314-6.
77. Currie AJ, Davidson DJ, Reid GS, Bharya S, MacDonald KL, Devon RS, et al. Primary immunodeficiency to pneumococcal infection due to a defect in Toll-like receptor signaling. *J Pediatr.* 2004;144(4):512-8.
78. Davidson R, Cavalcanti R, Brunton JL, Bast DJ, de Azavedo JC, Kibsey P, et al. Resistance to levofloxacin and failure of treatment of pneumococcal pneumonia. *N Engl J Med.* 2002;346(10):747-50.
79. Davis KM, Nakamura S, Weiser JN. Nod2 sensing of lysozyme-digested peptidoglycan promotes macrophage recruitment and clearance of *S. pneumoniae* colonization in mice. *J Clin Invest.* 2011;121(9):3666-76.
80. Davodeau F, Peyrat MA, Hallet MM, Gaschet J, Houde I, Vivien R, et al. Close correlation between Daudi and mycobacterial antigen recognition by human gamma delta T cells and expression of V9JPC1 gamma/V2DJC delta-encoded T cell receptors. *J Immunol.* 1993;151(3):1214-23.
81. De Rosa SC, Andrus JP, Perfetto SP, Mantovani JJ, Herzenberg LA, Herzenberg LA, et al. Ontogeny of gamma delta T cells in humans. *J Immunol.* 2004;172(3):1637-45.
82. De Velasco EA, Merkus D, Anderton S, Verheul AF, Lizzio EF, Van der Zee R, et al. Synthetic peptides representing T-cell epitopes act as carriers in pneumococcal polysaccharide conjugate vaccines. *Infect Immun.* 1995;63(3):961-8.

83. DeBarros A, Chaves-Ferreira M, d'Orey F, Ribot JC, Silva-Santos B. CD70-CD27 interactions provide survival and proliferative signals that regulate T cell receptor-driven activation of human gammadelta peripheral blood lymphocytes. *Eur J Immunol.* 2011;41(1):195-201.
84. Deng S, Bai L, Reboulet R, Matthew R, Engler DA, Teyton L, et al. A peptide-free, liposome-based oligosaccharide vaccine, adjuvanted with a natural killer T cell antigen, generates robust antibody responses in vivo. *Chem Sci.* 2014;5(4):1437-41.
85. Dieude M, Striegl H, Tyznik AJ, Wang J, Behar SM, Piccirillo CA, et al. Cardiolipin binds to CD1d and stimulates CD1d-restricted gammadelta T cells in the normal murine repertoire. *J Immunol.* 2011;186(8):4771-81.
86. Dockrell DH, Lee M, Lynch DH, Read RC. Immune-mediated phagocytosis and killing of *Streptococcus pneumoniae* are associated with direct and bystander macrophage apoptosis. *J Infect Dis.* 2001;184(6):713-22.
87. Dockrell DH, Marriott HM, Prince LR, Ridger VC, Ince PG, Hellewell PG, et al. Alveolar macrophage apoptosis contributes to pneumococcal clearance in a resolving model of pulmonary infection. *J Immunol.* 2003;171(10):5380-8.
88. Dockrell DH, Whyte MK, Mitchell TJ. Pneumococcal pneumonia: mechanisms of infection and resolution. *Chest.* 2012;142(2):482-91.
89. Doisne JM, Soulard V, Becourt C, Amniai L, Henrot P, Havenar-Daughton C, et al. Cutting edge: crucial role of IL-1 and IL-23 in the innate IL-17 response of peripheral lymph node NK1.1-invariant NKT cells to bacteria. *J Immunol.* 2011;186(2):662-6.
90. Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nature reviews.* 2004;4(1):11-22.
91. Dudal S, Turriere C, Bessoles S, Fontes P, Sanchez F, Liautard J, et al. Release of LL-37 by activated human Vgamma9Vdelta2 T cells: a microbicidal weapon against *Brucella suis*. *J Immunol.* 2006;177(8):5533-9.
92. Duncan JA, Gao X, Huang MT, O'Connor BP, Thomas CE, Willingham SB, et al. *Neisseria gonorrhoeae* activates the proteinase cathepsin B to mediate the signaling activities of the NLRP3 and ASC-containing inflammasome. *J Immunol.* 2009;182(10):6460-9.
93. Dunn PL, North RJ. Early gamma interferon production by natural killer cells is important in defense against murine listeriosis. *Infect Immun.* 1991;59(9):2892-900.
94. Elhaik-Goldman S, Kafka D, Yossef R, Hadad U, Elkabets M, Vallon-Eberhard A, et al. The natural cytotoxicity receptor 1 contribution to early clearance of *Streptococcus pneumoniae* and to natural killer-macrophage cross talk. *PLoS One.* 2011;6(8):e23472.
95. Ewald SE, Chavarria-Smith J, Boothroyd JC. NLRP1 is an inflammasome sensor for *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun.* 2014;82(1):460-8.
96. Fang R, Tsuchiya K, Kawamura I, Shen Y, Hara H, Sakai S, et al. Critical roles of ASC inflammasomes in caspase-1 activation and host innate resistance to *Streptococcus pneumoniae* infection. *J Immunol.* 2011;187(9):4890-9.
97. Fernandez MV, Miller E, Krammer F, Gopal R, Greenbaum BD, Bhardwaj N. Ion efflux and influenza infection trigger NLRP3 inflammasome signaling in human dendritic cells. *J Leukoc Biol.* 2016;99(5):723-34.
98. Fernebro J, Andersson I, Sublett J, Morfeldt E, Novak R, Tuomanen E, et al. Capsular expression in *Streptococcus pneumoniae* negatively affects spontaneous and antibiotic-induced lysis and contributes to antibiotic tolerance. *J Infect Dis.* 2004;189(2):328-38.

99. Ferreira DM, Jambo KC, Gordon SB. Experimental human pneumococcal carriage models for vaccine research. *Trends Microbiol.* 2011;19(9):464-70.
100. Ferretti JJ, McShan WM, Ajdic D, Savic DJ, Savic G, Lyon K, et al. Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(8):4658-63.
101. Ferrick DA, Schrenzel MD, Mulvania T, Hsieh B, Ferlin WG, Lepper H. Differential production of interferon-gamma and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by gamma delta T cells in vivo. *Nature.* 1995;373(6511):255-7.
102. Finkelman FD, Madden KB, Morris SC, Holmes JM, Boiani N, Katona IM, et al. Anti-cytokine antibodies as carrier proteins. Prolongation of in vivo effects of exogenous cytokines by injection of cytokine-anti-cytokine antibody complexes. *J Immunol.* 1993;151(3):1235-44.
103. Franchi L, Amer A, Body-Malapel M, Kanneganti TD, Ozoren N, Jagirdar R, et al. Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages. *Nat Immunol.* 2006;7(6):576-82.
104. Franchi L, Eigenbrod T, Nunez G. Cutting edge: TNF-alpha mediates sensitization to ATP and silica via the NLRP3 inflammasome in the absence of microbial stimulation. *J Immunol.* 2009;183(2):792-6.
105. Franchi L, Munoz-Planillo R, Nunez G. Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes. *Nat Immunol.* 2012;13(4):325-32.
106. Fry TJ, Connick E, Falloon J, Lederman MM, Liewehr DJ, Spritzler J, et al. A potential role for interleukin-7 in T-cell homeostasis. *Blood.* 2001;97(10):2983-90.
107. Fry TJ, Mackall CL. Interleukin-7: from bench to clinic. *Blood.* 2002;99(11):3892-904.
108. Fujii S, Shimizu K, Smith C, Bonifaz L, Steinman RM. Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide rapidly induces the full maturation of dendritic cells in vivo and thereby acts as an adjuvant for combined CD4 and CD8 T cell immunity to a coadministered protein. *J Exp Med.* 2003;198(2):267-79.
109. Fukuyama Y, King JD, Kataoka K, Kobayashi R, Gilbert RS, Oishi K, et al. Secretory-IgA antibodies play an important role in the immunity to *Streptococcus pneumoniae*. *J Immunol.* 2010;185(3):1755-62.
110. Galli G, Pittoni P, Tonti E, Malzone C, Uematsu Y, Tortoli M, et al. Invariant NKT cells sustain specific B cell responses and memory. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(10):3984-9.
111. Gao Y, Yang W, Pan M, Scully E, Girardi M, Augenlicht LH, et al. Gamma delta T cells provide an early source of interferon gamma in tumor immunity. *J Exp Med.* 2003;198(3):433-42.
112. Garvy BA, Harmsen AG. The importance of neutrophils in resistance to pneumococcal pneumonia in adult and neonatal mice. *Inflammation.* 1996;20(5):499-512.
113. Gavrillin MA, Abdelaziz DH, Mostafa M, Abdulrahman BA, Grandhi J, Akhter A, et al. Activation of the pyrin inflammasome by intracellular *Burkholderia cenocepacia*. *J Immunol.* 2012;188(7):3469-77.
114. Gentile A, Bardach A, Ciapponi A, Garcia-Marti S, Aruj P, Glujovsky D, et al. Epidemiology of community-acquired pneumonia in children of Latin America and the Caribbean: a systematic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis.* 2012;16(1):e5-15.
115. Gibbons DL, Haque SF, Silberzahn T, Hamilton K, Langford C, Ellis P, et al. Neonates harbour highly active gammadelta T cells with selective impairments in preterm infants. *Eur J Immunol.* 2009;39(7):1794-806.

116. Girardin SE, Boneca IG, Carneiro LA, Antignac A, Jehanno M, Viala J, et al. Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science*. 2003a;300(5625):1584-7.
117. Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, et al. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem*. 2003b;278(11):8869-72.
118. Gober HJ, Kistowska M, Angman L, Jeno P, Mori L, De Libero G. Human T cell receptor gamma delta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *J Exp Med*. 2003;197(2):163-8.
119. Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, Smyth MJ, Van Kaer L. NKT cells: what's in a name? *Nat Rev Immunol*. 2004;4(3):231-7.
120. Gold MC, Cerri S, Smyk-Pearson S, Cansler ME, Vogt TM, Delepine J, et al. Human mucosal associated invariant T cells detect bacterially infected cells. *PLoS Biol*. 2010;8(6):e1000407.
121. Gordy LE, Bezbradica JS, Flyak AI, Spencer CT, Dunkle A, Sun J, et al. IL-15 regulates homeostasis and terminal maturation of NKT cells. *J Immunol*. 2011;187(12):6335-45.
122. Gray BM, Converse GM, 3rd, Dillon HC, Jr. Epidemiologic studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: acquisition, carriage, and infection during the first 24 months of life. *J Infect Dis*. 1980;142(6):923-33.
123. Griffin MR, Grijalva CG. Distribution of pneumococcal serotypes in adult pneumococcal pneumonia cases: filling the evidence gap to inform vaccination policies. *J Infect Dis*. 2013;208(11):1734-6.
124. Gross O, Poeck H, Bscheider M, Dostert C, Hanneschlager N, Endres S, et al. Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. *Nature*. 2009;459(7245):433-6.
125. Gross O, Thomas CJ, Guarda G, Tschopp J. The inflammasome: an integrated view. *Immunol Rev*. 2011;243(1):136-51.
126. Guarda G, Zenger M, Yazdi AS, Schroder K, Ferrero I, Menu P, et al. Differential expression of NLRP3 among hematopoietic cells. *J Immunol*. 2011;186(4):2529-34.
127. Guey B, Bodnar M, Manie SN, Tardivel A, Petrilli V. Caspase-1 autoproteolysis is differentially required for NLRP1b and NLRP3 inflammasome function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(48):17254-9.
128. Guo H, Callaway JB, Ting JP. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat Med*. 2015;21(7):677-87.
129. Haas J, Korporal M, Schwarz A, Balint B, Wildemann B. The interleukin-7 receptor alpha chain contributes to altered homeostasis of regulatory T cells in multiple sclerosis. *Eur J Immunol*. 2011;41(3):845-53.
130. Haas JD, Ravens S, Duber S, Sandrock I, Oberdorfer L, Kashani E, et al. Development of interleukin-17-producing gamma delta T cells is restricted to a functional embryonic wave. *Immunity*. 2012;37(1):48-59.
131. Halle A, Hornung V, Petzold GC, Stewart CR, Monks BG, Reinheckel T, et al. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat Immunol*. 2008;9(8):857-65.

132. Hamada S, Umemura M, Shiono T, Tanaka K, Yahagi A, Begum MD, et al. IL-17A produced by gammadelta T cells plays a critical role in innate immunity against listeria monocytogenes infection in the liver. *J Immunol.* 2008;181(5):3456-63.
133. Harder J, Franchi L, Munoz-Planillo R, Park JH, Reimer T, Nunez G. Activation of the Nlrp3 inflammasome by *Streptococcus pyogenes* requires streptolysin O and NF-kappa B activation but proceeds independently of TLR signaling and P2X7 receptor. *J Immunol.* 2009;183(9):5823-9.
134. Harly C et al. Key implication of CD277/butyrophilin-3 (BTN3A) in cellular stress sensing by a major human gammadelta T-cell subset. *Blood.* 2012;120(11):2269-79.
135. Harly C, Peyrat MA, Netzer S, Dechanet-Merville J, Bonneville M, Scotet E. Up-regulation of cytolytic functions of human Vdelta2-gamma T lymphocytes through engagement of ILT2 expressed by tumor target cells. *Blood.* 2011;117(10):2864-73.
136. Hausdorff WP, Feikin DR, Klugman KP. Epidemiological differences among pneumococcal serotypes. *Lancet Infect Dis.* 2005;5(2):83-93.
137. Havran WL, Allison JP. Origin of Thy-1+ dendritic epidermal cells of adult mice from fetal thymic precursors. *Nature.* 1990;344(6261):68-70.
138. Hayday A, Gibbons D. Brokering the peace: the origin of intestinal T cells. *Mucosal Immunol.* 2008;1(3):172-4.
139. Hayday AC. [gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:975-1026.
140. Hayday AC. Gammadelta T cells and the lymphoid stress-surveillance response. *Immunity.* 2009;31(2):184-96.
141. Hayes SM, Love PE. Distinct structure and signaling potential of the gamma delta TCR complex. *Immunity.* 2002;16(6):827-38.
142. Hayes SM, Love PE. Stoichiometry of the murine gammadelta T cell receptor. *J Exp Med.* 2006;203(1):47-52.
143. He YW, Malek TR. Interleukin-7 receptor alpha is essential for the development of gamma delta + T cells, but not natural killer cells. *J Exp Med.* 1996;184(1):289-93.
144. Hise AG, Tomalka J, Ganesan S, Patel K, Hall BA, Brown GD, et al. An essential role for the NLRP3 inflammasome in host defense against the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Cell Host Microbe.* 2009;5(5):487-97.
145. Hoegen T, Tremel N, Klein M, Angele B, Wagner H, Kirschning C, et al. The NLRP3 inflammasome contributes to brain injury in pneumococcal meningitis and is activated through ATP-dependent lysosomal cathepsin B release. *J Immunol.* 2011;187(10):5440-51.
146. Hoffman HM, Throne ML, Amar NJ, Sebai M, Kivitz AJ, Kavanaugh A, et al. Efficacy and safety of riloncept (interleukin-1 Trap) in patients with cryopyrin-associated periodic syndromes: results from two sequential placebo-controlled studies. *Arthritis Rheum.* 2008;58(8):2443-52.
147. Hsu HE, Shutt KA, Moore MR, Beall BW, Bennett NM, Craig AS, et al. Effect of pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal meningitis. *N Engl J Med.* 2009;360(3):244-56.
148. Huber S, Sartini D, Exley M. Role of CD1d in coxsackievirus B3-induced myocarditis. *J Immunol.* 2003;170(6):3147-53.
149. Ichinohe T, Lee HK, Ogura Y, Flavell R, Iwasaki A. Inflammasome recognition of influenza virus is essential for adaptive immune responses. *J Exp Med.* 2009;206(1):79-87.

150. Ito K, Van Kaer L, Bonneville M, Hsu S, Murphy DB, Tonegawa S. Recognition of the product of a novel MHC TL region gene (27b) by a mouse gamma delta T cell receptor. *Cell*. 1990;62(3):549-61.
151. Itohara S, Farr AG, Lafaille JJ, Bonneville M, Takagaki Y, Haas W, et al. Homing of a gamma delta thymocyte subset with homogeneous T-cell receptors to mucosal epithelia. *Nature*. 1990;343(6260):754-7.
152. Ivanov S, Fontaine J, Paget C, Macho Fernandez E, Van Maele L, Renneson J, et al. Key role for respiratory CD103(+) dendritic cells, IFN-gamma, and IL-17 in protection against *Streptococcus pneumoniae* infection in response to alpha-galactosylceramide. *J Infect Dis*. 2012;206(5):723-34.
153. Ivanov, II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, et al. The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell*. 2006;126(6):1121-33.
154. Iwakura Y, Ishigame H, Saijo S, Nakae S. Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity*. 2011;34(2):149-62.
155. Jensen KD, Chien YH. Thymic maturation determines gammadelta T cell function, but not their antigen specificities. *Curr Opin Immunol*. 2009;21(2):140-5.
156. Jin T, Perry A, Jiang J, Smith P, Curry JA, Unterholzner L, et al. Structures of the HIN domain:DNA complexes reveal ligand binding and activation mechanisms of the AIM2 inflammasome and IFI16 receptor. *Immunity*. 2012;36(4):561-71.
157. Johnson HL, Deloria-Knoll M, Levine OS, Stoszek SK, Freimanis Hance L, Reithinger R, et al. Systematic evaluation of serotypes causing invasive pneumococcal disease among children under five: the pneumococcal global serotype project. *PLoS Med*. 2010;7(10).
158. Joly S, Ma N, Sadler JJ, Soll DR, Cassel SL, Sutterwala FS. Cutting edge: *Candida albicans* hyphae formation triggers activation of the Nlrp3 inflammasome. *J Immunol*. 2009;183(6):3578-81.
159. Jose RJ, Williams AE, Mercer PF, Sulikowski MG, Brown JS, Chambers RC. Regulation of neutrophilic inflammation by proteinase-activated receptor 1 during bacterial pulmonary infection. *J Immunol*. 2015;194(12):6024-34.
160. Juliana C, Fernandes-Alnemri T, Kang S, Farias A, Qin F, Alnemri ES. Non-transcriptional priming and deubiquitination regulate NLRP3 inflammasome activation. *J Biol Chem*. 2012;287(43):36617-22.
161. Kadioglu A, Coward W, Colston MJ, Hewitt CR, Andrew PW. CD4-T-lymphocyte interactions with pneumolysin and pneumococci suggest a crucial protective role in the host response to pneumococcal infection. *Infect Immun*. 2004;72(5):2689-97.
162. Kadioglu A, Gingles NA, Grattan K, Kerr A, Mitchell TJ, Andrew PW. Host cellular immune response to pneumococcal lung infection in mice. *Infect Immun*. 2000;68(2):492-501.
163. Kadioglu A, Taylor S, Iannelli F, Pozzi G, Mitchell TJ, Andrew PW. Upper and lower respiratory tract infection by *Streptococcus pneumoniae* is affected by pneumolysin deficiency and differences in capsule type. *Infect Immun*. 2002;70(6):2886-90.
164. Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, Andrew PW. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Microbiol*. 2008;6(4):288-301.
165. Kalyan S, Kabelitz D. Defining the nature of human gammadelta T cells: a biographical sketch of the highly empathetic. *Cell Mol Immunol*. 2013;10(1):21-9.

166. Karmakar M, Katsnelson M, Malak HA, Greene NG, Howell SJ, Hise AG, et al. Neutrophil IL-1beta processing induced by pneumolysin is mediated by the NLRP3/ASC inflammasome and caspase-1 activation and is dependent on K⁺ efflux. *J Immunol*. 2015;194(4):1763-75.
167. Karmakar M, Katsnelson MA, Dubyak GR, Pearlman E. Neutrophil P2X7 receptors mediate NLRP3 inflammasome-dependent IL-1beta secretion in response to ATP. *Nat Commun*. 2016;7:10555.
168. Karmakar M, Sun Y, Hise AG, Rietsch A, Pearlman E. Cutting edge: IL-1beta processing during *Pseudomonas aeruginosa* infection is mediated by neutrophil serine proteases and is independent of NLRC4 and caspase-1. *J Immunol*. 2012;189(9):4231-5.
169. Kasten KR, Prakash PS, Unsinger J, Goetzman HS, England LG, Cave CM, et al. Interleukin-7 (IL-7) treatment accelerates neutrophil recruitment through gamma delta T-cell IL-17 production in a murine model of sepsis. *Infect Immun*. 2010;78(11):4714-22.
170. Kawakami K, Yamamoto N, Kinjo Y, Miyagi K, Nakasone C, Uezu K, et al. Critical role of V α 14⁺ natural killer T cells in the innate phase of host protection against *Streptococcus pneumoniae* infection. *Eur J Immunol*. 2003;33(12):3322-30.
171. Kerr AR, Kirkham LA, Kadioglu A, Andrew PW, Garside P, Thompson H, et al. Identification of a detrimental role for NK cells in pneumococcal pneumonia and sepsis in immunocompromised hosts. *Microbes Infect*. 2005;7(5-6):845-52.
172. Kietzman CC, Gao G, Mann B, Myers L, Tuomanen EI. Dynamic capsule restructuring by the main pneumococcal autolysin LytA in response to the epithelium. *Nat Commun*. 2016;7:10859.
173. Kim S, Bauernfeind F, Ablasser A, Hartmann G, Fitzgerald KA, Latz E, et al. *Listeria monocytogenes* is sensed by the NLRP3 and AIM2 inflammasome. *Eur J Immunol*. 2010;40(6):1545-51.
174. Kinjo Y, Illarionov P, Vela JL, Pei B, Girardi E, Li X, et al. Invariant natural killer T cells recognize glycolipids from pathogenic Gram-positive bacteria. *Nat Immunol*. 2011;12(10):966-74.
175. Kirby AC, Newton DJ, Carding SR, Kaye PM. Evidence for the involvement of lung-specific gammadelta T cell subsets in local responses to *Streptococcus pneumoniae* infection. *Eur J Immunol*. 2007;37(12):3404-13.
176. Kjer SE, Tian H, Pirofski LA. CD8⁺ cells enhance resistance to pulmonary serotype 3 *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *J Immunol*. 2011;186(1):432-42.
177. Kjer-Nielsen L, Patel O, Corbett AJ, Le Nours J, Meehan B, Liu L, et al. MR1 presents microbial vitamin B metabolites to MAIT cells. *Nature*. 2012;491(7426):717-23.
178. Knapp S, Leemans JC, Florquin S, Branger J, Maris NA, Pater J, et al. Alveolar macrophages have a protective antiinflammatory role during murine pneumococcal pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167(2):171-9.
179. Kobayashi H, Tanaka Y, Shimmura H, Minato N, Tanabe K. Complete remission of lung metastasis following adoptive immunotherapy using activated autologous gammadelta T-cells in a patient with renal cell carcinoma. *Anticancer Res*. 2010;30(2):575-9.
180. Kobrynski LJ, Sousa AO, Nahmias AJ, Lee FK. Cutting edge: antibody production to pneumococcal polysaccharides requires CD1 molecules and CD8⁺ T cells. *J Immunol*. 2005;174(4):1787-90.
181. Koedel U, Winkler F, Angele B, Fontana A, Flavell RA, Pfister HW. Role of Caspase-1 in experimental pneumococcal meningitis: Evidence from pharmacologic Caspase inhibition and Caspase-1-deficient mice. *Ann Neurol*. 2002;51(3):319-29.

182. Kolls JK, Khader SA. The role of Th17 cytokines in primary mucosal immunity. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010;21(6):443-8.
183. Koppe U, Suttorp N, Opitz B. Recognition of *Streptococcus pneumoniae* by the innate immune system. *Cell Microbiol.* 2012;14(4):460-6.
184. Koyasu S, D'Adamio L, Arulanandam AR, Abraham S, Clayton LK, Reinherz EL. T cell receptor complexes containing Fc epsilon RI gamma homodimers in lieu of CD3 zeta and CD3 eta components: a novel isoform expressed on large granular lymphocytes. *J Exp Med.* 1992;175(1):203-9.
185. Krieg C, Letourneau S, Pantaleo G, Boyman O. Improved IL-2 immunotherapy by selective stimulation of IL-2 receptors on lymphocytes and endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(26):11906-11.
186. Kronenberg A, Zucs P, Droz S, Muhlemann K. Distribution and invasiveness of *Streptococcus pneumoniae* serotypes in Switzerland, a country with low antibiotic selection pressure, from 2001 to 2004. *J Clin Microbiol.* 2006;44(6):2032-8.
187. Krutzik SR, Modlin RL. The role of Toll-like receptors in combating mycobacteria. *Semin Immunol.* 2004;16(1):35-41.
188. Ku CL, von Bernuth H, Picard C, Zhang SY, Chang HH, Yang K, et al. Selective predisposition to bacterial infections in IRAK-4-deficient children: IRAK-4-dependent TLRs are otherwise redundant in protective immunity. *J Exp Med.* 2007;204(10):2407-22.
189. Kupz A, Guarda G, Gebhardt T, Sander LE, Short KR, Diavatopoulos DA, et al. NLRC4 inflammasomes in dendritic cells regulate noncognate effector function by memory CD8(+) T cells. *Nat Immunol.* 2012;13(2):162-9.
190. Laan M, Cui ZH, Hoshino H, Lotvall J, Sjostrand M, Gruenert DC, et al. Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways. *J Immunol.* 1999;162(4):2347-52.
191. Lachmann HJ, Kone-Paut I, Kuemmerle-Deschner JB, Leslie KS, Hachulla E, Quartier P, et al. Use of canakinumab in the cryopyrin-associated periodic syndrome. *N Engl J Med.* 2009;360(23):2416-25.
192. Lambrecht BN. Alveolar macrophage in the driver's seat. *Immunity.* 2006;24(4):366-8.
193. Lamkanfi M, Dixit VM. Inflammasomes and their roles in health and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2012;28:137-61.
194. Lamkanfi M, Dixit VM. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell.* 2014;157(5):1013-22.
195. Lanie JA, Ng WL, Kazmierczak KM, Andrzejewski TM, Davidsen TM, Wayne KJ, et al. Genome sequence of Avery's virulent serotype 2 strain D39 of *Streptococcus pneumoniae* and comparison with that of unencapsulated laboratory strain R6. *J Bacteriol.* 2007;189(1):38-51.
196. Lauw FN, Branger J, Florquin S, Speelman P, van Deventer SJ, Akira S, et al. IL-18 improves the early antimicrobial host response to pneumococcal pneumonia. *J Immunol.* 2002;168(1):372-8.
197. Le Bourhis L, Dusseaux M, Bohineust A, Bessoles S, Martin E, Premel V, et al. MAIT cells detect and efficiently lyse bacterially-infected epithelial cells. *PLoS Pathog.* 2013;9(10):e1003681.
198. Le Bourhis L, Guerri L, Dusseaux M, Martin E, Soudais C, Lantz O. Mucosal-associated invariant T cells: unconventional development and function. *Trends Immunol.* 2011;32(5):212-8.
199. Le Bourhis L, Martin E, Peguillet I, Guihot A, Froux N, Core M, et al. Antimicrobial activity of mucosal-associated invariant T cells. *Nat Immunol.* 2010;11(8):701-8.

200. Lebrero-Fernandez C, Bergstrom JH, Pelaseyed T, Bas-Forsberg A. Murine Butyrophilin-Like 1 and Btl6 Form Heteromeric Complexes in Small Intestinal Epithelial Cells and Promote Proliferation of Local T Lymphocytes. *Front Immunol.* 2016;7:1.
201. Lee SY, Stadanlick J, Kappes DJ, Wiest DL. Towards a molecular understanding of the differential signals regulating alphabeta/gammadelta T lineage choice. *Semin Immunol.* 2010;22(4):237-46.
202. Letiembre M, Echchannaoui H, Ferracin F, Rivest S, Landmann R. Toll-like receptor-2 deficiency is associated with enhanced brain TNF gene expression during pneumococcal meningitis. *J Neuroimmunol.* 2005;168(1-2):21-33.
203. Letourneau S, van Leeuwen EM, Krieg C, Martin C, Pantaleo G, Sprent J, et al. IL-2/anti-IL-2 antibody complexes show strong biological activity by avoiding interaction with IL-2 receptor alpha subunit CD25. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(5):2171-6.
204. Levine OS, O'Brien KL, Knoll M, Adegbola RA, Black S, Cherian T, et al. Pneumococcal vaccination in developing countries. *Lancet.* 2006;367(9526):1880-2.
205. Levy Y, Lacabaratz C, Weiss L, Viard JP, Goujard C, Lelievre JD, et al. Enhanced T cell recovery in HIV-1-infected adults through IL-7 treatment. *J Clin Invest.* 2009;119(4):997-1007.
206. Li H, Pauza CD. Rapamycin increases the yield and effector function of human gammadelta T cells stimulated in vitro. *Cancer Immunol Immunother.* 2011;60(3):361-70.
207. Liu X, Chauhan VS, Young AB, Marriott I. NOD2 mediates inflammatory responses of primary murine glia to *Streptococcus pneumoniae*. *Glia.* 2010a;58(7):839-47.
208. Liu X, Leung S, Wang C, Tan Z, Wang J, Guo TB, et al. Crucial role of interleukin-7 in T helper type 17 survival and expansion in autoimmune disease. *Nat Med.* 2010b;16(2):191-7.
209. Lohr J, Knoechel B, Wang JJ, Villarino AV, Abbas AK. Role of IL-17 and regulatory T lymphocytes in a systemic autoimmune disease. *J Exp Med.* 2006;203(13):2785-91.
210. Lonks JR, Garau J, Gomez L, Xercavins M, Ochoa de Echaguen A, Gareen IF, et al. Failure of macrolide antibiotic treatment in patients with bacteremia due to erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Infect Dis.* 2002;35(5):556-64.
211. Luoma AM, Castro CD, Mayassi T, Bembinster LA, Bai L, Picard D, et al. Crystal structure of Vdelta1 T cell receptor in complex with CD1d-sulfatide shows MHC-like recognition of a self-lipid by human gammadelta T cells. *Immunity.* 2013;39(6):1032-42.
212. Lynch JP, 3rd, Zhanel GG. *Streptococcus pneumoniae*: epidemiology, risk factors, and strategies for prevention. *Semin Respir Crit Care Med.* 2009;30(2):189-209.
213. Mackall CL, Fry TJ, Gress RE. Harnessing the biology of IL-7 for therapeutic application. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(5):330-42.
214. MacLennan IC, Toellner KM, Cunningham AF, Serre K, Sze DM, Zuniga E, et al. Extrafollicular antibody responses. *Immunol Rev.* 2003;194:8-18.
215. Maeurer MJ, Trinder P, Hommel G, Walter W, Freitag K, Atkins D, et al. Interleukin-7 or interleukin-15 enhances survival of *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. *Infect Immun.* 2000;68(5):2962-70.
216. Maki K, Sunaga S, Komagata Y, Kodaira Y, Mabuchi A, Karasuyama H, et al. Interleukin 7 receptor-deficient mice lack gammadelta T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(14):7172-7.
217. Malley R, Henneke P, Morse SC, Cieslewicz MJ, Lipsitch M, Thompson CM, et al. Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(4):1966-71.

218. Malley R, Trzcinski K, Srivastava A, Thompson CM, Anderson PW, Lipsitch M. CD4+ T cells mediate antibody-independent acquired immunity to pneumococcal colonization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(13):4848-53.
219. Mallick-Wood CA, Lewis JM, Richie LI, Owen MJ, Tigelaar RE, Hayday AC. Conservation of T cell receptor conformation in epidermal gammadelta cells with disrupted primary Vgamma gene usage. *Science*. 1998;279(5357):1729-33.
220. Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma. *Nat Immunol*. 2008;9(6):641-9.
221. Mankan AK, Dau T, Jenne D, Hornung V. The NLRP3/ASC/Caspase-1 axis regulates IL-1beta processing in neutrophils. *Eur J Immunol*. 2012;42(3):710-5.
222. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(8):519-31.
223. Marriott HM, Gascoyne KA, Gowda R, Geary I, Nicklin MJ, Iannelli F, et al. Interleukin-1beta regulates CXCL8 release and influences disease outcome in response to *Streptococcus pneumoniae*, defining intercellular cooperation between pulmonary epithelial cells and macrophages. *Infect Immun*. 2012;80(3):1140-9.
224. Marriott HM, Hellewell PG, Whyte MK, Dockrell DH. Contrasting roles for reactive oxygen species and nitric oxide in the innate response to pulmonary infection with *Streptococcus pneumoniae*. *Vaccine*. 2007;25(13):2485-90.
225. Martin CE, van Leeuwen EM, Im SJ, Roopenian DC, Sung YC, Surh CD. IL-7/anti-IL-7 mAb complexes augment cytokine potency in mice through association with IgG-Fc and by competition with IL-7R. *Blood*. 2013;121(22):4484-92.
226. Martin E, Treiner E, Duban L, Guerri L, Laude H, Toly C, et al. Stepwise development of MAIT cells in mouse and human. *PLoS Biol*. 2009;7(3):e54.
227. McNeela EA, Burke A, Neill DR, Baxter C, Fernandes VE, Ferreira D, et al. Pneumolysin activates the NLRP3 inflammasome and promotes proinflammatory cytokines independently of TLR4. *PLoS Pathog*. 2010;6(11):e1001191.
228. Melchionda F, Fry TJ, Milliron MJ, McKirdy MA, Tagaya Y, Mackall CL. Adjuvant IL-7 or IL-15 overcomes immunodominance and improves survival of the CD8+ memory cell pool. *J Clin Invest*. 2005;115(5):1177-87.
229. Melin M, Trzcinski K, Antonio M, Meri S, Adegbola R, Kaijalainen T, et al. Serotype-related variation in susceptibility to complement deposition and opsonophagocytosis among clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*. 2010;78(12):5252-61.
230. Meraviglia S, Eberl M, Vermijlen D, Todaro M, Buccheri S, Cicero G, et al. In vivo manipulation of Vgamma9Vdelta2 T cells with zoledronate and low-dose interleukin-2 for immunotherapy of advanced breast cancer patients. *Clin Exp Immunol*. 2010;161(2):290-7.
231. Miao EA, Alpuche-Aranda CM, Dors M, Clark AE, Bader MW, Miller SI, et al. Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf. *Nat Immunol*. 2006;7(6):569-75.
232. Miao EA, Ernst RK, Dors M, Mao DP, Aderem A. *Pseudomonas aeruginosa* activates caspase 1 through Ipaf. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(7):2562-7.

233. Michel ML, Keller AC, Paget C, Fujio M, Trottein F, Savage PB, et al. Identification of an IL-17-producing NK1.1(neg) iNKT cell population involved in airway neutrophilia. *J Exp Med*. 2007;204(5):995-1001.
234. Michel ML, Pang DJ, Haque SF, Potocnik AJ, Pennington DJ, Hayday AC. Interleukin 7 (IL-7) selectively promotes mouse and human IL-17-producing gammadelta cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(43):17549-54.
235. Mitchell AJ, Yau B, McQuillan JA, Ball HJ, Too LK, Abtin A, et al. Inflammasome-dependent IFN-gamma drives pathogenesis in *Streptococcus pneumoniae* meningitis. *J Immunol*. 2012;189(10):4970-80.
236. Mitchell AM, Mitchell TJ. *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors and variation. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16(5):411-8.
237. Miyasaka T, Akahori Y, Toyama M, Miyamura N, Ishii K, Saijo S, et al. Dectin-2-dependent NKT cell activation and serotype-specific antibody production in mice immunized with pneumococcal polysaccharide vaccine. *PLoS One*. 2013;8(10):e78611.
238. Miyasaka T, Aoyagi T, Uchiyama B, Oishi K, Nakayama T, Kinjo Y, et al. A possible relationship of natural killer T cells with humoral immune response to 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine in clinical settings. *Vaccine*. 2012;30(22):3304-10.
239. Mizgerd JP. Acute lower respiratory tract infection. *N Engl J Med*. 2008;358(7):716-27.
240. Moens E, Brouwer M, Dimova T, Goldman M, Willems F, Vermijlen D. IL-23R and TCR signaling drives the generation of neonatal Vgamma9Vdelta2 T cells expressing high levels of cytotoxic mediators and producing IFN-gamma and IL-17. *J Leukoc Biol*. 2011;89(5):743-52.
241. Monteiro JM, Harvey C, Trinchieri G. Role of interleukin-12 in primary influenza virus infection. *J Virol*. 1998;72(6):4825-31.
242. Morens DM, Taubenberger JK, Fauci AS. Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness. *J Infect Dis*. 2008;198(7):962-70.
243. Morgan PJ, Hyman SC, Rowe AJ, Mitchell TJ, Andrew PW, Saibil HR. Subunit organisation and symmetry of pore-forming, oligomeric pneumolysin. *FEBS Lett*. 1995;371(1):77-80.
244. Morita CT, Lee HK, Wang H, Li H, Mariuzza RA, Tanaka Y. Structural features of nonpeptide prenyl pyrophosphates that determine their antigenicity for human gamma delta T cells. *J Immunol*. 2001;167(1):36-41.
245. Morrissey PJ, Conlon P, Braddy S, Williams DE, Namen AE, Mochizuki DY. Administration of IL-7 to mice with cyclophosphamide-induced lymphopenia accelerates lymphocyte repopulation. *J Immunol*. 1991;146(5):1547-52.
246. Munoz-Planillo R, Franchi L, Miller LS, Nunez G. A critical role for hemolysins and bacterial lipoproteins in *Staphylococcus aureus*-induced activation of the Nlrp3 inflammasome. *J Immunol*. 2009;183(6):3942-48.
247. Munoz-Planillo R, Kuffa P, Martinez-Colon G, Smith BL, Rajendiran TM, Nunez G. K(+) efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. *Immunity*. 2013;38(6):1142-53.
248. Musher DM. Infections caused by *Streptococcus pneumoniae*: clinical spectrum, pathogenesis, immunity, and treatment. *Clin Infect Dis*. 1992;14(4):801-7.

249. Naheed A, Saha SK, Breiman RF, Khatun F, Brooks WA, El Arifeen S, et al. Multihospital surveillance of pneumonia burden among children aged <5 years hospitalized for pneumonia in Bangladesh. *Clin Infect Dis*. 2009;48 Suppl 2:S82-9.
250. Nakamatsu M, Yamamoto N, Hatta M, Nakasone C, Kinjo T, Miyagi K, et al. Role of interferon-gamma in Valpha14+ natural killer T cell-mediated host defense against *Streptococcus pneumoniae* infection in murine lungs. *Microbes Infect*. 2007;9(3):364-74.
251. Nakamura S, Davis KM, Weiser JN. Synergistic stimulation of type I interferons during influenza virus coinfection promotes *Streptococcus pneumoniae* colonization in mice. *J Clin Invest*. 2011;121(9):3657-65.
252. Nanjappa SG, Walent JH, Morre M, Suresh M. Effects of IL-7 on memory CD8 T cell homeostasis are influenced by the timing of therapy in mice. *J Clin Invest*. 2008;118(3):1027-39.
253. Napolitano LA, Grant RM, Deeks SG, Schmidt D, De Rosa SC, Herzenberg LA, et al. Increased production of IL-7 accompanies HIV-1-mediated T-cell depletion: implications for T-cell homeostasis. *Nat Med*. 2001;7(1):73-9.
254. Narita K, Hu DL, Mori F, Wakabayashi K, Iwakura Y, Nakane A. Role of interleukin-17A in cell-mediated protection against *Staphylococcus aureus* infection in mice immunized with the fibrinogen-binding domain of clumping factor A. *Infect Immun*. 2010;78(10):4234-42.
255. Ness-Schwickerath KJ, Morita CT. Regulation and function of IL-17A- and IL-22-producing gammadelta T cells. *Cell Mol Life Sci*. 2011;68(14):2371-90.
256. Netea MG, Nold-Petry CA, Nold MF, Joosten LA, Opitz B, van der Meer JH, et al. Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1beta in monocytes and macrophages. *Blood*. 2009;113(10):2324-35.
257. Newman ZL, Crown D, Leppla SH, Moayeri M. Anthrax lethal toxin activates the inflammasome in sensitive rat macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;398(4):785-9.
258. Nieuwenhuis EE, Matsumoto T, Exley M, Schleipman RA, Glickman J, Bailey DT, et al. CD1d-dependent macrophage-mediated clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from lung. *Nat Med*. 2002;8(6):588-93.
259. Nurmi K, Virkanen J, Rajamaki K, Niemi K, Kovanen PT, Eklund KK. Ethanol inhibits activation of NLRP3 and AIM2 inflammasomes in human macrophages--a novel anti-inflammatory action of alcohol. *PLoS One*. 2013;8(11):e78537.
260. O'Brien RL, Roark CL, Born WK. IL-17-producing gammadelta T cells. *Eur J Immunol*. 2009;39(3):662-6.
261. Opitz B, Puschel A, Schmeck B, Hocke AC, Rosseau S, Hammerschmidt S, et al. Nucleotide-binding oligomerization domain proteins are innate immune receptors for internalized *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem*. 2004;279(35):36426-32.
262. Paget C, Chow MT, Duret H, Mattarollo SR, Smyth MJ. Role of gammadelta T cells in alpha-galactosylceramide-mediated immunity. *J Immunol*. 2012;188(8):3928-39.
263. Paget C, Chow MT, Gherardin NA, Beavis PA, Uldrich AP, Duret H, et al. CD3bright signals on gammadelta T cells identify IL-17A-producing Vgamma6Vdelta1+ T cells. *Immunol Cell Biol*. 2015;93(2):198-212.
264. Palakodeti A, Sandstrom A, Sundaresan L, Harly C, Nedellec S, Olive D, et al. The molecular basis for modulation of human Vgamma9Vdelta2 T cell responses by CD277/butyrophilin-3 (BTN3A)-specific antibodies. *J Biol Chem*. 2012;287(39):32780-90.

265. Pallares R, Capdevila O, Linares J, Grau I, Onaga H, Tubau F, et al. The effect of cephalosporin resistance on mortality in adult patients with nonmeningeal systemic pneumococcal infections. *Am J Med.* 2002;113(2):120-6.
266. Patel A, Patel J, Ikwuagwu J. A case of progressive multifocal leukoencephalopathy and idiopathic CD4+ lymphocytopenia. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(12):2697-8.
267. Pauza CD, Riedel DJ, Gilliam BL, Redfield RR. Targeting gammadelta T cells for immunotherapy of HIV disease. *Future Virol.* 2011;6(1):73-84.
268. Pellegrini M, Calzascia T, Toe JG, Preston SP, Lin AE, Elford AR, et al. IL-7 engages multiple mechanisms to overcome chronic viral infection and limit organ pathology. *Cell.* 2011;144(4):601-13.
269. Pereira MS, Marques GG, Dellama JE, Zamboni DS. The Nlrc4 Inflammasome Contributes to Restriction of Pulmonary Infection by Flagellated *Legionella* spp. that Trigger Pyroptosis. *Front Microbiol.* 2011;2:33.
270. Perez-Figueroa E, Torres J, Sanchez-Zauco N, Contreras-Ramos A, Alvarez-Arellano L, Maldonado-Bernal C. Activation of NLRP3 inflammasome in human neutrophils by *Helicobacter pylori* infection. *Innate Immun.* 2016;22(2):103-12.
271. Phelan JD, Orekov T, Finkelman FD. Cutting edge: mechanism of enhancement of in vivo cytokine effects by anti-cytokine monoclonal antibodies. *J Immunol.* 2008;180(1):44-8.
272. Phillipson M, Kubes P. The neutrophil in vascular inflammation. *Nat Med.* 2011;17(11):1381-90.
273. Picard C, Puel A, Bonnet M, Ku CL, Bustamante J, Yang K, et al. Pyogenic bacterial infections in humans with IRAK-4 deficiency. *Science.* 2003;299(5615):2076-9.
274. Qin G, Mao H, Zheng J, Sia SF, Liu Y, Chan PL, et al. Phosphoantigen-expanded human gammadelta T cells display potent cytotoxicity against monocyte-derived macrophages infected with human and avian influenza viruses. *J Infect Dis.* 2009;200(6):858-65.
275. Rabolli V, Badissi AA, Devosse R, Uwambayinema F, Yakoub Y, Palmari-Pallag M, et al. The alarmin IL-1alpha is a master cytokine in acute lung inflammation induced by silica micro- and nanoparticles. *Part Fibre Toxicol.* 2014;11:69.
276. Ramsburg E, Tigelaar R, Craft J, Hayday A. Age-dependent requirement for gammadelta T cells in the primary but not secondary protective immune response against an intestinal parasite. *J Exp Med.* 2003;198(9):1403-14.
277. Rathinam VA, Jiang Z, Waggoner SN, Sharma S, Cole LE, Waggoner L, et al. The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. *Nat Immunol.* 2010;11(5):395-402.
278. Rayner CF, Jackson AD, Rutman A, Dewar A, Mitchell TJ, Andrew PW, et al. Interaction of pneumolysin-sufficient and -deficient isogenic variants of *Streptococcus pneumoniae* with human respiratory mucosa. *Infect Immun.* 1995;63(2):442-7.
279. Rhodes DA, Chen HC, Price AJ, Keeble AH, Davey MS, James LC, et al. Activation of human gammadelta T cells by cytosolic interactions of BTN3A1 with soluble phosphoantigens and the cytoskeletal adaptor periplakin. *J Immunol.* 2015;194(5):2390-8.
280. Riano F, Karunakaran MM, Starick L, Li J, Scholz CJ, Kunzmann V, et al. Vgamma9Vdelta2 TCR-activation by phosphorylated antigens requires butyrophilin 3 A1 (BTN3A1) and additional genes on human chromosome 6. *Eur J Immunol.* 2014;44(9):2571-6.

281. Ribot JC, deBarros A, Pang DJ, Neves JF, Peperzak V, Roberts SJ, et al. CD27 is a thymic determinant of the balance between interferon-gamma- and interleukin 17-producing gammadelta T cell subsets. *Nat Immunol.* 2009;10(4):427-36.
282. Rigante D, Vitale A, Lucherini OM, Cantarini L. The hereditary autoinflammatory disorders uncovered. *Autoimmun Rev.* 2014;13(9):892-900.
283. Ritchie ND, Mitchell TJ, Evans TJ. What is different about serotype 1 pneumococci? *Future Microbiol.* 2012;7(1):33-46.
284. Roark CL, Aydintug MK, Lewis J, Yin X, Lahn M, Hahn YS, et al. Subset-specific, uniform activation among V gamma 6/V delta 1+ gamma delta T cells elicited by inflammation. *J Leukoc Biol.* 2004;75(1):68-75.
285. Rochman Y, Spolski R, Leonard WJ. New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(7):480-90.
286. Roopenian DC, Akilesh S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(9):715-25.
287. Rosenberg SA, Yang JC, White DE, Steinberg SM. Durability of complete responses in patients with metastatic cancer treated with high-dose interleukin-2: identification of the antigens mediating response. *Ann Surg.* 1998;228(3):307-19.
288. Rozenbaum MH, Boersma C, Postma MJ, Hak E. Observed differences in invasive pneumococcal disease epidemiology after routine infant vaccination. *Expert Rev Vaccines.* 2011;10(2):187-99.
289. Rubins JB, Paddock AH, Charboneau D, Berry AM, Paton JC, Janoff EN. Pneumolysin in pneumococcal adherence and colonization. *Microb Pathog.* 1998;25(6):337-42.
290. Saavedra PH, Demon D, Van Gorp H, Lamkanfi M. Protective and detrimental roles of inflammasomes in disease. *Semin Immunopathol.* 2015;37(4):313-22.
291. Sabroe I, Prince LR, Dower SK, Walmsley SR, Chilvers ER, Whyte MK. What can we learn from highly purified neutrophils? *Biochem Soc Trans.* 2004;32(Pt3):468-9.
292. Sagiv JY, Michaeli J, Assi S, Mishalian I, Kisos H, Levy L, et al. Phenotypic diversity and plasticity in circulating neutrophil subpopulations in cancer. *Cell Rep.* 2015;10(4):562-73.
293. Sakata T, Iwagami S, Tsuruta Y, Teraoka H, Tatsumi Y, Kita Y, et al. Constitutive expression of interleukin-7 mRNA and production of IL-7 by a cloned murine thymic stromal cell line. *J Leukoc Biol.* 1990;48(3):205-12.
294. Sandstrom A, Peigne CM, Leger A, Crooks JE, Konczak F, Gesnel MC, et al. The intracellular B30.2 domain of butyrophilin 3A1 binds phosphoantigens to mediate activation of human Vgamma9Vdelta2 T cells. *Immunity.* 2014;40(4):490-500.
295. Satoh-Takayama N, Lesjean-Pottier S, Vieira P, Sawa S, Eberl G, Vosshenrich CA, et al. IL-7 and IL-15 independently program the differentiation of intestinal CD3-NKp46+ cell subsets from Id2-dependent precursors. *J Exp Med.* 2010;207(2):273-80.
296. Sauer JD, Witte CE, Zemansky J, Hanson B, Lauer P, Portnoy DA. *Listeria monocytogenes* triggers AIM2-mediated pyroptosis upon infrequent bacteriolysis in the macrophage cytosol. *Cell Host Microbe.* 2010;7(5):412-9.
297. Schild H, Mavaddat N, Litzemberger C, Ehrich EW, Davis MM, Bluestone JA, et al. The nature of major histocompatibility complex recognition by gamma delta T cells. *Cell.* 1994;76(1):29-37.
298. Schmeck B, Huber S, Moog K, Zahlten J, Hocke AC, Opitz B, et al. Pneumococci induced TLR- and Rac1-dependent NF-kappaB-recruitment to the IL-8 promoter in lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006;290(4):L730-L7.

299. Schreiber A, Pham CT, Hu Y, Schneider W, Luft FC, Kettritz R. Neutrophil serine proteases promote IL-1beta generation and injury in necrotizing crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23(3):470-82.
300. Schroder K, Muruve DA, Tschopp J. Innate immunity: cytoplasmic DNA sensing by the AIM2 inflammasome. *Curr Biol*. 2009;19(6):R262-5.
301. Schroder K, Sagulenko V, Zamoshnikova A, Richards AA, Cridland JA, Irvine KM, et al. Acute lipopolysaccharide priming boosts inflammasome activation independently of inflammasome sensor induction. *Immunobiology*. 2012;217(12):1325-9.
302. Schroder NW, Morath S, Alexander C, Hamann L, Hartung T, Zahringer U, et al. Lipoteichoic acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. *J Biol Chem*. 2003;278(18):15587-94.
303. Sereti I, Dunham RM, Spritzler J, Aga E, Proschan MA, Medvik K, et al. IL-7 administration drives T cell-cycle entry and expansion in HIV-1 infection. *Blood*. 2009;113(25):6304-14.
304. Shin S, El-Diwany R, Schaffert S, Adams EJ, Garcia KC, Pereira P, et al. Antigen recognition determinants of gamma delta T cell receptors. *Science*. 2005;308(5719):252-5.
305. Shoma S, Tsuchiya K, Kawamura I, Nomura T, Hara H, Uchiyama R, et al. Critical involvement of pneumolysin in production of interleukin-1alpha and caspase-1-dependent cytokines in infection with *Streptococcus pneumoniae* in vitro: a novel function of pneumolysin in caspase-1 activation. *Infect Immun*. 2008;76(4):1547-57.
306. Sibille Y, Reynolds HY. Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. *Am Rev Respir Dis*. 1990;141(2):471-501.
307. Siednienko J, Miggin SM. Expression analysis of the Toll-like receptors in human peripheral blood mononuclear cells. *Methods Mol Biol*. 2009;517:3-14.
308. Singh N, Hong S, Scherer DC, Serizawa I, Burdin N, Kronenberg M, et al. Cutting edge: activation of NK T cells by CD1d and alpha-galactosylceramide directs conventional T cells to the acquisition of a Th2 phenotype. *J Immunol*. 1999;163(5):2373-7.
309. Spits H, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G, et al. Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(2):145-9.
310. Sportes C, Babb RR, Krumlauf MC, Hakim FT, Steinberg SM, Chow CK, et al. Phase I study of recombinant human interleukin-7 administration in subjects with refractory malignancy. *Clin Cancer Res*. 2010;16(2):727-35.
311. Sportes C, Hakim FT, Memon SA, Zhang H, Chua KS, Brown MR, et al. Administration of rhIL-7 in humans increases in vivo TCR repertoire diversity by preferential expansion of naive T cell subsets. *J Exp Med*. 2008;205(7):1701-14.
312. Srivastava A, Henneke P, Visintin A, Morse SC, Martin V, Watkins C, et al. The apoptotic response to pneumolysin is Toll-like receptor 4 dependent and protects against pneumococcal disease. *Infect Immun*. 2005;73(10):6479-87.
313. Standish AJ, Weiser JN. Human neutrophils kill *Streptococcus pneumoniae* via serine proteases. *J Immunol*. 2009;183(4):2602-9.
314. Stark MA, Huo Y, Burcin TL, Morris MA, Olson TS, Ley K. Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity*. 2005;22(3):285-94.
315. Steinfort C, Wilson R, Mitchell T, Feldman C, Rutman A, Todd H, et al. Effect of *Streptococcus pneumoniae* on human respiratory epithelium in vitro. *Infect Immun*. 1989;57(7):2006-13.

316. Stober D, Jomantaite I, Schirmbeck R, Reimann J. NKT cells provide help for dendritic cell-dependent priming of MHC class I-restricted CD8⁺ T cells in vivo. *J Immunol.* 2003;170(5):2540-8.
317. Sutton C, Brereton C, Keogh B, Mills KH, Lavelle EC. A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of experimental medicine.* 2006;203(7):1685-91.
318. Sutton CE, Lalor SJ, Sweeney CM, Brereton CF, Lavelle EC, Mills KH. Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity.* 2009;31(2):331-41.
319. Tanaka Y, Era T, Nishikawa S, Kawamata S. Forced expression of Nanog in hematopoietic stem cells results in a gammadeltaT-cell disorder. *Blood.* 2007;110(1):107-15.
320. Tang XZ, Jo J, Tan AT, Sandalova E, Chia A, Tan KC, et al. IL-7 licenses activation of human liver intrasinusoidal mucosal-associated invariant T cells. *J Immunol.* 2013;190(7):3142-52.
321. Terra JK, Cote CK, France B, Jenkins AL, Bozue JA, Welkos SL, et al. Cutting edge: resistance to *Bacillus anthracis* infection mediated by a lethal toxin sensitive allele of Nalp1b/Nlrp1b. *J Immunol.* 2010;184(1):17-20.
322. Thomas PG, Dash P, Aldridge JR, Jr., Ellebedy AH, Reynolds C, Funk AJ, et al. The intracellular sensor NLRP3 mediates key innate and healing responses to influenza A virus via the regulation of caspase-1. *Immunity.* 2009;30(4):566-75.
323. Tigelaar RE, Lewis JM. Immunobiology of mouse dendritic epidermal T cells: a decade later, some answers, but still more questions. *J Invest Dermatol.* 1995;105(1 Suppl):43S-9S.
324. Tilloy F, Treiner E, Park SH, Garcia C, Lemonnier F, de la Salle H, et al. An invariant T cell receptor alpha chain defines a novel TAP-independent major histocompatibility complex class Ib-restricted alpha/beta T cell subpopulation in mammals. *J Exp Med.* 1999;189(12):1907-21.
325. Timens W, Boes A, Rozeboom-Uiterwijk T, Poppema S. Immaturity of the human splenic marginal zone in infancy. Possible contribution to the deficient infant immune response. *J Immunol.* 1989;143(10):3200-6.
326. Toma C, Higa N, Koizumi Y, Nakasone N, Ogura Y, McCoy AJ, et al. Pathogenic *Vibrio* activate NLRP3 inflammasome via cytotoxins and TLR/nucleotide-binding oligomerization domain-mediated NF-kappa B signaling. *J Immunol.* 2010;184(9):5287-97.
327. Treiner E, Duban L, Bahram S, Radosavljevic M, Wanner V, Tilloy F, et al. Selection of evolutionarily conserved mucosal-associated invariant T cells by MR1. *Nature.* 2003;422(6928):164-9.
328. Turchinovich G, Hayday AC. Skint-1 identifies a common molecular mechanism for the development of interferon-gamma-secreting versus interleukin-17-secreting gammadelta T cells. *Immunity.* 2011;35(1):59-68.
329. Turner P, Hinds J, Turner C, Jankhot A, Gould K, Bentley SD, et al. Improved detection of nasopharyngeal cocolonization by multiple pneumococcal serotypes by use of latex agglutination or molecular serotyping by microarray. *J Clin Microbiol.* 2011;49(5):1784-9.
330. Uldrich AP, Le Nours J, Pellicci DG, Gherardin NA, McPherson KG, Lim RT, et al. CD1d-lipid antigen recognition by the gammadelta TCR. *Nat Immunol.* 2013;14(11):1137-45.
331. Unsinger J, McGlynn M, Kasten KR, Hoekzema AS, Watanabe E, Muenzer JT, et al. IL-7 promotes T cell viability, trafficking, and functionality and improves survival in sepsis. *J Immunol.* 2010;184(7):3768-79.

332. Van Maele L, Carnoy C, Cayet D, Ivanov S, Porte R, Deruy E, et al. Activation of Type 3 innate lymphoid cells and interleukin 22 secretion in the lungs during *Streptococcus pneumoniae* infection. *J Infect Dis*. 2014;210(3):493-503.
333. Van Opdenbosch N, Gurung P, Vande Walle L, Fossoul A, Kanneganti TD, Lamkanfi M. Activation of the NLRP1b inflammasome independently of ASC-mediated caspase-1 autoproteolysis and speck formation. *Nat Commun*. 2014;5:3209.
334. van Roon JA, Verweij MC, Wijk MW, Jacobs KM, Bijlsma JW, Lafeber FP. Increased intraarticular interleukin-7 in rheumatoid arthritis patients stimulates cell contact-dependent activation of CD4(+) T cells and macrophages. *Arthritis Rheum*. 2005;52(6):1700-10.
335. van Rossum AM, Lysenko ES, Weiser JN. Host and bacterial factors contributing to the clearance of colonization by *Streptococcus pneumoniae* in a murine model. *Infect Immun*. 2005;73(11):7718-26.
336. Vantourout P, Hayday A. Six-of-the-best: unique contributions of gammadelta T cells to immunology. *Nature reviews*. 2013;13(2):88-100.
337. Vavassori S, Kumar A, Wan GS, Ramanjaneyulu GS, Cavallari M, El Daker S, et al. Butyrophilin 3A1 binds phosphorylated antigens and stimulates human gammadelta T cells. *Nat Immunol*. 2013;14(9):908-16.
338. von Freeden-Jeffrey U, Vieira P, Lucian LA, McNeil T, Burdach SE, Murray R. Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J Exp Med*. 1995;181(4):1519-26.
339. Wands JM, Roark CL, Aydintug MK, Jin N, Hahn YS, Cook L, et al. Distribution and leukocyte contacts of gammadelta T cells in the lung. *J Leukoc Biol*. 2005;78(5):1086-96.
340. Warren SE, Mao DP, Rodriguez AE, Miao EA, Aderem A. Multiple Nod-like receptors activate caspase 1 during *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol*. 2008;180(11):7558-64.
341. Wartha F, Beiter K, Albiger B, Fernebro J, Zychlinsky A, Normark S, et al. Capsule and D-alanylated lipoteichoic acids protect *Streptococcus pneumoniae* against neutrophil extracellular traps. *Cell Microbiol*. 2007;9(5):1162-71.
342. Webster KE, Kim HO, Kyparissoudis K, Corpuz TM, Pinget GV, Uldrich AP, et al. IL-17-producing NKT cells depend exclusively on IL-7 for homeostasis and survival. *Mucosal Immunol*. 2014;7(5):1058-67.
343. Weinberger DM, Malley R, Lipsitch M. Serotype replacement in disease after pneumococcal vaccination. *Lancet*. 2011;378(9807):1962-73.
344. Wertz IE, Dixit VM. Regulation of death receptor signaling by the ubiquitin system. *Cell Death Differ*. 2010;17(1):14-24.
345. Wiles MV, Ruiz P, Imhof BA. Interleukin-7 expression during mouse thymus development. *Eur J Immunol*. 1992;22(4):1037-42.
346. Williams AE, Chambers RC. The mercurial nature of neutrophils: still an enigma in ARDS? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2014;306(3):L217-30.
347. Witkin SS, Alvi S, Bongiovanni AM, Linhares IM, Ledger WJ. Lactic acid stimulates interleukin-23 production by peripheral blood mononuclear cells exposed to bacterial lipopolysaccharide. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2011;61(2):153-8.
348. Witznath M, Pache F, Lorenz D, Koppe U, Gutbier B, Tabeling C, et al. The NLRP3 inflammasome is differentially activated by pneumolysin variants and contributes to host defense in pneumococcal pneumonia. *J Immunol*. 2011;187(1):434-40.

349. Wright AK, Ferreira DM, Gritzfeld JF, Wright AD, Armitage K, Jambo KC, et al. Human nasal challenge with *Streptococcus pneumoniae* is immunising in the absence of carriage. *PLoS Pathog.* 2012;8(4):e1002622.
350. Wu J, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. Involvement of the AIM2, NLRC4, and NLRP3 inflammasomes in caspase-1 activation by *Listeria monocytogenes*. *J Clin Immunol.* 2010;30(5):693-702.
351. Xu H, Yang J, Gao W, Li L, Li P, Zhang L, et al. Innate immune sensing of bacterial modifications of Rho GTPases by the PIR1 inflammasome. *Nature.* 2014;513(7517):237-41.
352. Yabu M, Shime H, Hara H, Saito T, Matsumoto M, Seya T, et al. IL-23-dependent and -independent enhancement pathways of IL-17A production by lactic acid. *Int Immunol.* 2011;23(1):29-41.
353. Yang Y, Zhou X, Kouadir M, Shi F, Ding T, Liu C, et al. the AIM2 inflammasome is involved in macrophage activation during infection with virulent *Mycobacterium bovis* strain. *J Infect Dis.* 2013;208(11):1849-58.
354. Yildirim I, Hanage WP, Lipsitch M, Shea KM, Stevenson A, Finkelstein J, et al. Serotype specific invasive capacity and persistent reduction in invasive pneumococcal disease. *Vaccine.* 2010;29(2):283-8.
355. Yoshida K, Kondo R, Wang Q, Doerschuk CM. Neutrophil cytoskeletal rearrangements during capillary sequestration in bacterial pneumonia in rats. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;174(6):689-98.
356. Zeng X, Wei YL, Huang J, Newell EW, Yu H, Kidd BA, et al. $\gamma\delta$ T cells recognize a microbial encoded B cell antigen to initiate a rapid antigen-specific interleukin-17 response. *Immunity.* 2012;37(3):524-34.
357. Zhang W, Du JY, Yu Q, Jin JO. Interleukin-7 produced by intestinal epithelial cells in response to *Citrobacter rodentium* infection plays a major role in innate immunity against this pathogen. *Infect Immun.* 2015;83(8):3213-23.
358. Zhao Y, Yang J, Shi J, Gong YN, Lu Q, Xu H, et al. The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus. *Nature.* 2011;477(7366):596-600.
359. Zhong Y, Kinio A, Saleh M. Functions of NOD-Like Receptors in Human Diseases. *Front Immunol.* 2013;4:333.
360. Zhou R, Tardivel A, Thorens B, Choi I, Tschopp J. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat Immunol.* 2010;11(2):136-40.
361. Zwijnenburg PJ, van der Poll T, Florquin S, Roord JJ, Van Furth AM. IL-1 receptor type 1 gene-deficient mice demonstrate an impaired host defense against pneumococcal meningitis. *J Immunol.* 2003;170(9):4724-30.

Annexe

Neutrophilic NLRP3 inflammasome-dependent IL-1 β secretion regulates the $\gamma\delta$ T17 cell response in respiratory bacterial infections

Maya Hassane^{1,2}, Dieter Demon^{3,4}, Daphnée Soulard¹, Josette Fontaine¹, Lance E. Keller⁵, Emmanuel C. Patin¹, Rémi Porte¹, Immo Prinz⁶, Bernhard Ryffel⁷, Aras Kadioglu⁸, Jan-Willem Veening⁵, Jean-Claude Sirard¹, Christelle Faveeuw¹, Mohamed Lamkanfi^{3,4}, François Trottein¹ and Christophe Paget^{1*}

¹Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 - UMR 8204 - CIIL - Center for Infection and Immunity of Lille, F-59000 Lille, France.

²Laboratoire Microbiologie Santé et Environnement, Ecole doctorale en Sciences et Technologies/ Faculté de Santé Publique, Université Libanaise, Tripoli, Liban.

³Inflammation Research Center, VIB, B-9052 Zwijnaarde, Belgium.

⁴Department of Internal Medicine, Ghent University, B-9000 Ghent, Belgium

⁵Molecular Genetics Group, Groningen Biomolecular Sciences and Biotechnology Institute, Centre for Synthetic Biology, University of Groningen, Groningen, The Netherlands.

⁶Institute of Immunology, Hannover Medical School, 30625 Hannover, Germany.

⁷CNRS, UMR7355, Experimental and Molecular Immunology and Neurogenetics, University, Orléans, France and IDM, University of Cape Town, RSA.

⁸Department of Clinical Infection, Institute of Infection and Global Health, University of Liverpool, Liverpool, UK.

*Correspondence should be addressed to Christophe Paget (Mailing address: Institut Pasteur de Lille, CIIL, Team “Lung Infection and Innate Immunity”, 1 rue du Prof. Calmette, Lille Cedex, 59019, France; Email: christophe.paget@inserm.fr; Tel: +33 3 2087 7339).

Running title: NLRP3 activity in neutrophils activates $\gamma\delta$ T17 cells

Keywords: NLRP3 inflammasome, neutrophils, IL-17A, TNF- α , IL-1 β , $\gamma\delta$ T cells, respiratory infection.

Abbreviations used: AM, alveolar macrophage; IL, interleukin-; NLRP3, NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3; Ply, pneumolysin; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; TCR, T cell receptor; WT, wild-type.

Abstract

Traditionally regarded as simple foot soldiers of the innate immune response limited to the eradication of pathogens, neutrophils recently emerged as more complex cells endowed with a set of immunoregulatory functions. Using a model of invasive pneumococcal disease, we highlighted an unexpected key role for neutrophils as accessory cells in innate IL-17A production by lung resident V γ 6V δ 1⁺ T cells via NLRP3 inflammasome-dependent IL-1 β secretion. *In vivo* activation of the NLRP3 inflammasome in neutrophils required both host-derived and bacterial-derived signals. Elaborately, this activation mechanism it relies on (i) alveolar macrophage-secreted TNF- α for priming and (ii) subsequent exposure to bacterial pneumolysin for activation. Interestingly, this mechanism can be translated to human neutrophils. Our work revealed the cellular and molecular dynamic events leading to $\gamma\delta$ T17 cell activation, and highlighted for the first time the existence of a fully functional NLRP3 inflammasome in lung neutrophils. This immune axis thus regulates the development of a protective host response to respiratory bacterial infections.

Introduction

The Gram-positive bacterium *Streptococcus pneumoniae* (pneumococcus) is often present in the mucosa lining of the nasopharynx. In healthy individuals, colonization by the pneumococcus is usually associated with mild symptoms or may even be asymptomatic. However, under certain circumstances (e.g. in immunocompromised hosts and/or with virulent strains), colonization can result in life-threatening diseases (such as community-acquired pneumonia, meningitis and sepsis)^{1,2}. Pneumococcal-related mortality is currently increasing, and recent estimates suggest that the pneumococcus is responsible at least a million deaths worldwide each year³. Invasive pneumococcal disease accounts for most of these cases, of which 35% are caused by serotypes 1, 5 and 14⁴. Although several vaccines have been developed to control this infection, pneumococcal disease has by no means been eradicated. Innate immune responses are critically involved in the host's early attempts to contain or eliminate bacterial pathogens, and also provide support for a subsequent adaptive immune response (if required).

The cytokine interleukin-17A (IL-17A) is a particularly important pro-inflammatory innate factor that regulates immune responses at mucosal barriers⁵. IL-17A has a key role in the host's anti-microbial defenses in particular through the indirect recruitment of neutrophils via induction of chemokines⁶. In this context, most of the data on Th17-related cytokines in protective acquired host responses to pneumococcal infection have been collected using colonizing strains^{7,8}. However, IL-17 contribution to the outcome of an acute infection (leading to invasive disease) has not been characterized.

Gamma-delta ($\gamma\delta$) T cells reportedly produce large amounts of IL-17A^{9,10} early on in a variety of immune responses^{11,12}. Mouse IL-17-producing $\gamma\delta$ T ($\gamma\delta$ T17) cells are characterized by the lack of surface expression of CD27 - a thymic regulator that determines the cytokine profile (IFN- γ - vs IL-17A-production) of $\gamma\delta$ T cells in the periphery¹³. We recently reported that a substantial proportion

of $\gamma\delta$ T cells in the lung (20-30% under resting conditions) express high CD3 levels and preferentially produce IL-17A in response to various stimuli¹⁴. In the lung, we unexpectedly found this phenotype to be restricted to the innate-like V γ 6V δ 1⁺ T cell subset.

Neutrophils and alveolar macrophages (AMs) have long been recognized as terminal innate effector cells during acute infection. They facilitate extracellular pathogen clearance by mediating phagocytosis and the release of lytic enzymes, antimicrobial peptides and reactive oxygen species^{15,16}. Moreover, recent evidence indicates that the production of a wide array of inflammatory mediators (such as cytokines and/or chemokines) enable these cells to have potential accessory functions¹⁷⁻¹⁹. For example, neutrophils express various pattern recognition receptors including inflammasome components²⁰. Thus, it was recently demonstrated that *ex vivo* cultured neutrophils produce the pro-inflammatory cytokine IL-1 β through the nucleotide-binding oligomerization domain receptor, pyrin-containing 3 (NLRP3) inflammasome²¹⁻²³. The physiological relevance of this activity remains to be determined.

Recently, we and others have shown that tumor necrosis factor- α (TNF- α) can be instrumental in the transcriptional priming of NLRP3 inflammasome activity *in vivo* and *in vitro* by up-regulating protein levels of proIL-1 β in various myeloid cell populations (including neutrophils)^{24,25}. TNF- α is an early, ubiquitous cytokine that is massively produced during infections and exerts important biological functions by regulating a wide range of genes in target cells. By binding to two structurally distinct receptors (namely TNF-R1 (CD120a) and TNF-R2 (CD120b))²⁶, TNF- α contributes to pleiotropic activities during inflammation such as cell survival/death and the induction of the production of other cytokines²⁷.

In the present study of lung infection by an invasive strain of *S. pneumoniae* serotype 1, we demonstrate that the IL-17A produced by $\gamma\delta$ T cells (and especially the resident V γ 6V δ 1⁺ subset) mediates the neutrophilia that is critical for bacterial containment and clearance. Most importantly,

we discovered an unexpected but critical accessory role for NLRP3-dependent, neutrophil-derived IL-1 β in $\gamma\delta$ T17 cell activation. The neutrophils' accessory function required AM-mediated TNF- α and the bacterial-derived toxin pneumolysin (Ply) to promote NLRP3 activity. Taken as a whole, our data highlight the spatial and sequential organization of innate immune cell activation. This constitutes an important new pathway in the early development of the host's innate immune response to bacterial infection of the respiratory tract.

Results

Pulmonary V γ 6V δ 1⁺ T cells are important in anti-pneumococcal innate defense through IL-17A-mediated neutrophilia.

We first investigated the role of innate IL-17A in host resistance to invasive pneumococcal infection. A lack of IL-17A resulted in a significantly lower survival rate, enhanced bacterial growth in the lungs and systemic dissemination, and less accumulation of neutrophils in the infected lungs (**Fig. 1a-c**). Since neutrophils have been shown to exert potent, direct, anti-pneumococcal activities²⁸, we confirmed (using an anti-Ly6G antibody) that neutrophil depletion critically impaired mouse survival (**Supplementary Fig. 1a**). Flow cytometry analysis revealed that only innate lymphocytes (i.e. innate lymphoid cells, type I natural killer T (NKT) cells and $\gamma\delta$ T cells) produced significant levels of IL-17A (**Fig. 1d** and **Supplementary Fig. 1b**). However, $\gamma\delta$ T cells were by far the main producers of this cytokine (**Fig. 1d**). Based on V γ usage, we determined that V γ 6V δ 1⁺ T cells constituted the prime source of IL-17A (**Fig. 1e**). Importantly, the FACS results confirmed our recent genomic findings¹⁴ whereby lung CD3^{bright} $\gamma\delta$ T cells uniformly expressed the invariant V γ 6V δ 1 TCR (**Fig. 1e**). In addition to V γ 6V δ 1⁺ T cells' intrinsic specialized functions, we next postulated that the cells' location of $\gamma\delta$ T subsets within the lung compartment could also account for their variable ability to respond to infection. A FACS-based approach²⁹ indicated that non-V γ 6V δ 1⁺ (CD3^{dim}) T cells preferentially populated the vascular compartment (**Fig. 1f** and **Supplementary Fig. 1c**) whereas V γ 6V δ 1⁺ T cells were almost exclusively represented in the interstitial area (i.e. in proximity to respiratory tract pathogens) (**Fig. 1f**). It is noteworthy that $\gamma\delta$ T compartmentalization was hardly affected upon infection (**Supplementary Fig. 1c**).

These findings prompted us to investigate the impact of a $\gamma\delta$ T cell deficiency on the host's response to a pneumococcal infection. When compared with wild-type (WT) mice, *S. pneumoniae*-infected *Tcrd*^{-/-} mice died sooner and displayed a greater bacterial burden and lower levels of neutrophilia (**Fig. 1g-h**). In summary, $\gamma\delta$ T cells in general (and resident V γ 6V δ 1⁺ T cells in particular) are major sources of IL-17A during the early stages of *S. pneumoniae* infection and might contribute to bacterial containment by mediating neutrophil recruitment.

IL-23 and IL-1R signaling are required for IL-17A production by $\gamma\delta$ T cells during *S. pneumoniae* infection.

IL-17 production by innate $\gamma\delta$ T cells can occur in response to activating cytokines (such as IL-23 and IL-1 β), even in the absence of concomitant TCR ligation³⁰. Interestingly, IL-23 and IL-1 β are produced early in the course of pneumococcal infection^{31,32}. In experiments with *Il23a*^{-/-} and *Il1r1*^{-/-} mice, we evaluated IL-23 and IL-1 β 's contribution to IL-17A production by lung $\gamma\delta$ T cells. As expected, disruption of IL-23 or IL-1R signaling dramatically impaired the capacity of $\gamma\delta$ T cells to produce IL-17A following pneumococcal infection (**Fig. 2a**). This impairment was accompanied by a severe relative reduction in neutrophil recruitment to the lung (**Fig. 2b**). It is noteworthy that the frequency of CD3^{bright} V γ 6V δ 1⁺ T cells was lower in *Il23a*^{-/-} mice than in WT and *Il1r1*^{-/-} mice (**Supplementary Fig. 2**). Taken as a whole, these results demonstrate that both IL-23 and IL-1 β are required for IL-17A production by $\gamma\delta$ T cells and subsequent neutrophilia during *S. pneumoniae* infection.

Neutrophils are a prime source of IL-1 β following pneumococcal infection of the lungs.

Given the importance of IL-1 β in $\gamma\delta$ T17 cell activation, we next attempted to determine the cellular sources of this cytokine following pneumococcal challenge. IL-1 β is first expressed as biologically

inactive proIL-1 β form. Given that IL-1 β is predominantly derived from the myeloid lineage, we used flow cytometry to analyze the lung myeloid cells' ability to express proIL-1 β in response to pneumococcal infection. Although *S. pneumoniae* infection led to proIL-1 β up-regulation in all tested cell populations as early as 6 h post-infection (p.i.) (**Fig. 3a** and **Supplementary Fig. 3a**), we found that neutrophils were the primary source of this procytokine (**Fig. 3a** and **Supplementary Fig. 3b**). To determine whether or not neutrophils could produce bioactive IL-1 β in response to *S. pneumoniae*, we cultured purified lung neutrophils from naive and infected mice. Interestingly, we found that lung neutrophils could produce bioactive IL-1 β (**Fig. 3b**) but neither IL-12p40 nor IL-23p19 (not shown) in response to infection (**Fig. 3b**). It is noteworthy, that we only detected low levels of IL-1 β in the supernatants of neutrophil-depleted cell cultures (**Fig. 3b**). Furthermore, neutrophil depletion was associated with significantly lower levels of IL-1 β in the lung tissue of infected mice (**Fig. 3c**). Thus, our results highlight neutrophils as an important source of IL-1 β in the early response to pneumococcal lung infection.

The accumulation of proIL-1 β in Neutrophil priming requires alveolar macrophage-produced TNF- α .

To investigate the general mechanisms involved in IL-1 β maturation and secretion by lung neutrophils, we first addressed the mechanisms underlying the priming step leading to proIL-1 β upregulation. Synthesis of proIL-1 β requires NF- κ B- and AP-1-dependent gene transcription in response to bacterial components and cytokines^{33,34}. We and others have demonstrated that TNF- α is sufficient to up-regulate proIL-1 β protein levels in myeloid cells *in vitro* and *in vivo*^{24,25}. TNF- α is produced soon after pneumococcal challenge and is predominantly detected in the airways (**Fig. 4a** and **Supplementary Fig. 4a**). In line with the sole presence of AMs in the airways at 6 h p.i. (**Supplementary Fig. 4b**), intracellular staining revealed that AMs (but not other myeloid cells)

were able to produce TNF- α (**Fig. 4b**). Moreover, the specific depletion of AMs (**Supplementary Fig. 4c**) abrogated early-stage TNF- α production in the lungs of infected mice (**Fig. 4c**). To determine whether or not TNF- α is instrumental in neutrophil priming in our model; we gave the mice an intraperitoneal (i.p.) dose of anti-TNF- α mAb prior to bacterial inoculation. TNF- α neutralization impaired priming was associated with significantly lower proIL-1 β protein levels in neutrophils and other myeloid populations including neutrophils as judged by decreased intracellular levels of proIL-1 β proteins (**Fig. 4d** and **Supplementary Fig. 4d**). Anti-TNF- α treatment was also associated with lower relative and absolute counts of lung $\gamma\delta$ T17 cells (**Fig. 4e**) and with lower levels of neutrophilia (**Fig. 4e**). Furthermore, IL-1 β levels in the lungs were low after AM depletion (**Fig. 4f**).

TNF- α can exert its biological activity through the recruitment of TNF-R1 and TNF-R2 receptors. We showed that neutrophils from TNF-R1-deficient mice failed to be primed did not up-regulate proIL-1 β upon infection (**Fig. 4g**). Consequently, neutrophilia was severely affected in the absence of TNF- α signaling (**Fig. 4g**). Lastly, the *in vitro* incubation of sorted naive lung neutrophils with TNF- α triggered dose-dependent upregulation of proIL-1 β as shown by intracellular staining (**Fig. 4h**). Overall, these data demonstrate that neutrophil priming (proIL-1 β synthesis) is strongly regulated by AM-derived TNF- α during the early stages of pneumococcal infection.

IL-1 β secretion by lung neutrophils is dependent on the NLRP3 inflammasome.

It was originally suggested that the release of IL-1 β by neutrophils was dependent on the cleavage of proIL-1 β into mature IL-1 β by serine proteases (e.g. elastase and proteinase 3)^{35,36}. Recent data also suggest that neutrophils can express functional inflammasomes which may produce bioactive IL-1 β ^{21,22}. In agreement with the latter observations, we found that the levels of IL-1 β in the lung

tissue of *S. pneumoniae*-infected mice were lower in *Casp1/11*-deficient mice than in WT controls - indicating a key role for inflammasome signaling in this model of infection (Fig. 5a). Compared with WT mice, pneumococcal infection in mice lacking NLRP3 inflammasome components (*Nlrp3*^{-/-} or *Asc*^{-/-}) resulted in significantly lower IL-1 β production (Fig. 5a). Moreover *in vivo* treatment with the selective NLRP3 inflammasome inhibitor MCC950³⁷ was associated with significantly lower levels of IL-1 β in the lungs of *S. pneumoniae*-infected mice (Fig. 5b). To assess signs for NLRP3 inflammasome priming in neutrophils, we analyzed mRNA and protein samples from lung neutrophils purified from either naïve or *S. pneumoniae*-infected mice. We observed high levels of NLRP3 protein expression (Fig. 5c) and *Nlrp3* mRNA transcripts in neutrophils from infected mice (Supplementary Fig. 5a). We next measured NLRP3 inflammasome activity in neutrophils purified from naïve or infected mice. Interestingly, treatment with MCC950 abrogated *ex vivo* IL-1 β production by lung neutrophils from challenged mice (Fig. 5d). Furthermore, a Western blot analysis of purified neutrophils from infected mice showed clear evidence of IL-1 β maturation (Fig. 5c).

Along with many other bacterial pore-forming toxins, the *S. pneumoniae* virulence factor pneumolysin (Ply) is thought to be an NLRP3 activator³⁸. When comparing the development of immune responses to a parental strain and a Ply-deficient strain (D39 Δ ply) of pneumococcus (Supplementary Fig. 5b), we detected significantly lower levels of IL-1 β in the lungs of mice infected with the mutant strain (Fig. 5e). Ply complementation restored the levels of IL-1 β (Fig. 5e and Supplementary Fig. 5b). We next used a recombinant Ply to mimic *in vivo* NLRP3 inflammasome activation. As is thought to be the case *in vivo*, the addition of Ply induced IL-1 β production by TNF- α -primed WT neutrophils (but not by unprimed neutrophils) (Fig. 5f). However, lung neutrophils from either *Nlrp3*^{-/-} or *Casp1/11*^{-/-} mice failed to respond to the same

stimuli (**Fig. 5g**). Collectively, these data indicate that IL-1 β production by neutrophils is governed by NLRP3 inflammasome-dependent caspase-1 activity.

TNF- α and Ply are sufficient to elicit NLRP3 inflammasome-dependent IL-1 β secretion by human neutrophils.

To investigate whether TNF- α and Ply also induced IL-1 β secretion by human neutrophils, we prepared total leukocytes from the peripheral blood of healthy donors, primed the cells with TNF- α for 3 h, and then stimulated the cells with Ply for an additional 90 min. In line with the data from the mouse experiments, standalone treatments failed to induce IL-1 β production by human leukocytes but the TNF- α /Ply combination resulted in IL-1 β secretion (**Fig. 6a**). This effect was NLRP3 inflammasome-dependent, since MCC950 treatment fully abrogated IL-1 β secretion (**Fig. 6a**). We next studied the ability of peripheral blood neutrophils from healthy donors (**Supplementary Fig. 6a**) to produce NLRP3 inflammasome-dependent IL-1 β . TNF-R1 was expressed on human neutrophils (**Supplementary Fig. 6b**) and treatment with Ply induced IL-1 β release by TNF- α -primed neutrophils in an NLRP3 inflammasome-dependent manner (**Fig. 6b**). Thus, our data suggest that the NLRP3 inflammasome is active in inducing the production of IL-1 β by human neutrophils via a TNF- α /Ply-dependent mechanism.

Neutrophil-derived IL-1 β is involved in $\gamma\delta$ T17 cell activation following pneumococcal infection.

To establish whether or not neutrophil-derived IL-1 β was linked to critical $\gamma\delta$ T17 cell-dependent immune responses in the containment/elimination of *S. pneumoniae*, we analyzed the $\gamma\delta$ T cells' ability to produce IL-17A after neutrophil depletion. Interestingly, neutrophil depletion reduced IL-17A production (**Fig. 7a**) in early-stage infection. It is noteworthy that neutrophils do not have

a critical role in the containment of bacteria during the earliest phase of infection (**Supplementary Fig. 7a**). Moreover, purified naive lung CD27⁻ $\gamma\delta$ T cells that were cultured in conditioned media from *S. pneumoniae*-infected lung neutrophil cultures produced IL-17A (**Fig. 7b**). As expected, IL-17A secretion was only seen for the CD27⁻ $\gamma\delta$ T cell fraction but not for their CD27⁺ counterparts (**Supplementary Fig. 7b**). *In vitro* neutralization of IL-1 β abrogated IL-17A production by $\gamma\delta$ T cells - indicating that this effect was fully dependent on IL-1 β and did not require cell-cell contact (**Fig. 7b**). Of note, IL-17A production by $\gamma\delta$ T cells was only achieved when recombinant IL-23 was added to the culture medium. Taken as a whole, our results indicate that *S. pneumoniae* induces rapid IL-1 β secretion by neutrophils. This secretion contributes strongly to IL-17A production by lung $\gamma\delta$ T cells.

Discussion

Given that the early immune events following respiratory bacterial infection are critical in the development of an effective host response against the pathogen, we decided to investigate the functions and activation mechanisms of $\gamma\delta$ T17 cells during pneumococcal infection. Our present results show that in addition to the canonical phagocytic functions of AMs and neutrophils, these cells are key components in the initiation and regulation of the innate immune response. Indeed, we highlighted a “three-component system” in which alveolar macrophages (via TNF- α secretion) and neutrophils (via NLRP3 inflammasome-dependent IL-1 β production) are critical players in $\gamma\delta$ T17 cell activation.

We found that CD3^{bright} V γ 6V δ 1⁺ T cells produced the largest amounts of IL-17A during the early stages of pneumococcal infection. Remarkably, these cells express high levels of IL-1 β and IL-23 receptors that we found essential for activation in response to pneumococcus¹⁴. Furthermore, our present results also show that V γ 6V δ 1⁺ T cells are located in the lung’s interstitial compartment and therefore stand on the front line in the host’s defense against microbes. In contrast, other recognized IL-17A producers (such as V γ 4⁺ T cells and type I NK1.1⁺ NKT cells) are mainly found in the vasculature (not shown). Interestingly, vaginal V γ 6V δ 1⁺ T cells are resident in the epithelium³⁹. Our data suggest that their pulmonary counterparts have a similar location. Nevertheless, more specific tools will be required to determine the precise location of V γ 6V δ 1⁺ T cells within the interstitial compartment. Moreover, the decrease in the proportion of V γ 6V δ 1⁺ T cells in the lung of IL-23p19-deficient mice might indicate a requirement for this cytokine in the subset’s maintenance in the periphery. Shibata *et al.* demonstrated that STAT3 was not essential for the development of $\gamma\delta$ T17 cells⁴⁰. Hence, we postulate that IL-23 is important for the maintenance of V γ 6V δ 1⁺ T cells in the periphery. Further investigations will be required to define

the interactions between the various factors (e.g. IL-23, and the microbiota) involved in lung $V\gamma 6V\delta 1^+$ T cell homeostasis¹⁴.

Other innate immune cells from the lymphoid compartment respond to the IL-23/IL-1 β combination by producing IL-17A¹². Thus, it is likely that this AM/neutrophil pathway might be responsible (through IL-1 β secretion) for the activation of lymphocytes such as NKT cells, mucosal-associated invariant T cells and innate lymphoid cells in other respiratory disorders.

From a mechanistic perspective, we demonstrated that NLRP3 inflammasome activation in neutrophils depends on AM-derived TNF- α for priming and bacterial Ply for NLRP3 activation. It is already been shown that Ply is involved in NLRP3 activation in neutrophils *in vitro*²¹. Recently the same group of researchers suggested that during *S. pneumoniae* corneal infection, ATP can also activate the NLRP3 inflammasome in neutrophils via engagement of the P2X₇ receptor⁴¹. In vitro studies have previously shown that ATP can activate NLRP3 in neutrophils^{22,23,42}. However ATP seems to have low activity on neutrophilic NLRP3 inflammasome compared to other common NLRP3 activators^{22,23}. However a number of pioneering studies also reported unresponsiveness to ATP⁴³ and the absence of P2X₇ receptors on resting or activated human neutrophils⁴⁴. Here, by using a Ply-deficient bacteria and recombinant Ply, we demonstrated that this pore-forming toxin has a critical role in NLRP3 activation on lung neutrophils. Understanding ATP's contribution to NLRP3 inflammasome activation in our model of infection will require further investigation. Nevertheless, millimolar levels of ATP are only released during active inflammation and therefore it is likely that ATP is only involved in NLRP3 activation once an infection is well-established and major tissue damages occurred.

It has been suggested that during *S. pneumoniae* infection of the cornea, inflammasome priming is dependent on direct recognition of the pneumococcus' pathogen-associated molecular patterns²¹.

In contrast, we observed that a TNF- α -mediated mechanism seems to dominate over direct

microbial component recognition in neutrophil priming during the early steps of infection. However, authors studied the *in vitro* priming of bone marrow neutrophils with heat-killed bacteria and so the mechanisms are likely to differ in the lung *in vivo*²¹. Although indirect activation of the innate immune system during bacterial infection is rather counterintuitive, pathogens have evolved ways of evading recognition by germline-encoded receptors and thus preventing elimination by the host. For instance, *S. pneumoniae* expresses an extracellular capsule that subverts innate immunity recognition by masking the underlying cell surface structures. In line with our findings, it has been shown that upon *in vitro* macrophage infection with the encapsulated bacteria *Streptococcus pyogenes*, NLRP3 inflammasome priming was independent of Toll-like receptor and the P2X₇ receptor signaling⁴⁵. Moreover, since the anatomy and physical barrier in the lungs preclude a direct contact between bacteria and neutrophils early after infection, the host circumvents this situation by integrating soluble signals (AM-derived TNF- α and bacterial-derived pneumolysin) to mount an efficient neutrophilic NLRP3 inflammasome-dependent protective response. From an evolutionary point of view, the immunological pathway reported here might reflect the perpetual competition between microbes and hosts. Our study revealed a novel mechanism for rapidly priming the NLRP3 inflammasome and initiating a protective response against encapsulated bacterial pathogens prior to their dissemination. The fast-acting mechanism identified here enables the host to stay one step ahead of the pathogen by mounting an effective response in the lung parenchyma at a time when the bacteria are still confined to the alveoli. Nevertheless, it is possible that at later time-points (i.e. when the bacteria have colonized the lung parenchyma) that the engagement of various pattern recognition receptors might be the main route for NLRP3 inflammasome priming.

Although recent data suggest that sterile signals (e.g. TNF- α) induce weaker, more delayed NLRP3 inflammasome priming *in vitro* than microbial products do⁴⁶, our present results demonstrate that

TNF- α can rapidly prime the NLRP3 inflammasome in neutrophils following infection. TNF- α is rapidly produced by AMs, resulting in proIL-1 β accumulation in neutrophils as early as 6 h post-*S. pneumoniae* infection. However, we could not exclude that non-hematopoietic cells can participate in TNF- α production such as epithelial cells. The mechanisms underlying this cytokine production were not investigated here but probably rely on direct (opsonic-independent) recognition of pneumococcus cell-wall components by AMs. Secondly, our data reveal that TNF-R1 is fully functional on a large proportion of mouse lung neutrophils. The inflammasome priming step is tightly regulated by the transcription factor NF- κ B³⁴. Given that TNF-R1 intracellular signaling leads to the mobilization/activation of NF- κ B⁴⁷, our results are fully in line with the latest literature data. Another novel observation was that neutrophils participated indirectly in their own recruitment to the inflamed tissue. This finding agrees with a recent demonstration that IL-1 β regulates airway neutrophilia in response to *S. pneumoniae* serotype 2 (strain D39) infection³¹. Further studies will be required to determine whether the neutrophils' accessory functions are restricted to specialized subsets in particular niches or are a feature of the whole population when induced by a particular inflammatory environment.

From a translational point of view, we found that the mechanisms involved in NLRP3 inflammasome activity in *S. pneumoniae*-infected mice (i.e. TNF- α and Ply) were also active in human neutrophils. Anti-TNF- α mAbs are highly effective in the treatment of patients with severe inflammatory/autoimmune disorders (such as rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis and Crohn's disease). However, these treatments are associated with adverse effects, including elevated susceptibility to infections. Blockade of the pathway highlighted in the present report might be involved in these complications. In line with our hypothesis, volunteers treated with Humira® showed a significantly lower airway neutrophilic influx in response to inhaled endotoxin, when

compared with a control group⁴⁸. In the same vein, a link between TNF- α and IL-17A production by lung $\gamma\delta$ T cells has recently been identified in the context of exposure to pollutants⁴⁹.

In conclusion, we found that neutrophils and AMs are important early-stage components in $\gamma\delta$ T17 cell activation. Neutrophils exert this accessory role through a functional NLRP3 inflammasome. The rapid release of NLRP3-dependent IL-1 β by neutrophils relied on a mechanism involving TNF-R1 engagement by AM-dependent TNF- α (signal 1) and bacterial Ply (signal 2). It remains to be seen whether this pathway is clinically relevant in other immune situations or can be used to the design of more refined immune-intervention strategies in this context.

Methods

Mice

8- to 12-week-old male wild-type C57BL/6J mice were purchased from Janvier (Le Genest-St-Isle, France). C57BL/6J TCR δ -deficient (*Tcrd*^{-/-}) and IL-17A-deficient (*Il17a*^{-/-}) mice were bred in house at the Pasteur institute of Lille. C57BL/6J IL-1R1-deficient (*Il1r1*^{-/-}) and IL-23p19-deficient (*Il23p19*^{-/-}) mice were bred in house at the University of Orléans (INEM, CNRS UMR 7355, Orléans, France). C57BL/6J *Nlrp3*^{-/-}, *Asc*^{-/-}, *Casp1/11*^{-/-} and *Tnfrsf1a*^{-/-} mice were bred in house at Ghent University Campus-VIB. Mice were bred under pathogen-free conditions. All animal work conformed to the French governmental, local (CEEA number 00357.01) and Ghent University animal care and use committee guidelines.

Human samples

Peripheral blood was collected from non-smokers healthy donors. Written informed consent was received from participants prior to inclusion in the study, according ethics committee on human experimentations.

Reagents and Abs

Polyclonal anti-IL-1 β Ab, anti- Ly6G (NIMP-R14) mAb, anti-TNF- α mAb (XT3.11) and their respective isotype controls were purchased from either Bio X Cell (West Lebanon, NH, USA) or R&D systems (Lille, France). Monoclonal antibodies against mouse CD45 (APCCy7- or FITC- or AF700- or PeCy7- or PE-conjugated), CD3 (Pacific Blue- or PerCPCy5.5-conjugated), TCR δ (PerCpCy5.5-conjugated), TCR β (FITC- or APC-conjugated), NK1.1 (PeCy7- or FITC-conjugated), Ly6G (APC-Cy7- or FITC-conjugated), CD11b (PerCPCy5.5- or FITC-conjugated),

Siglec F (Pe-CF594- or BV421-conjugated), CD11c (APC- or FITC-conjugated), MHCII (AF700- or FITC-conjugated), CD4 (PerCPCy5.5-conjugated), CD127 (PeCy7-conjugated), CD90.2 (AF700-conjugated), V γ 1 (APC-conjugated), V γ 4 (PeCy7-conjugated), F4/80 (PeCy7-conjugated), TNF- α (PE-conjugated), IL-17A (PE-conjugated), pro-IL-1 β (PE-conjugated) and appropriated isotype controls were purchased from BioLegend, BD Pharmingen and eBioscience. PBS-57 glycolipid-loaded and unloaded control CD1d tetramers (APC- or PE-conjugated) were from the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Tetramer Facility (Emory University, Atlanta, GA). The mAb for V γ 6V δ 1 TCR detection (clone 17D1) was a kind gift from Pr. R. Tigelaar (Yale University). Propidium iodide (PI) was purchased from BD Pharmingen. Gating strategies used in this study are presented in Table 1. Recombinant mouse and human TNF- α were purchased from eBioscience. Mouse IL-23 and IL-1 β were from Peprotech. MCC950 was purchased from Sigma-Aldrich. Clodronate and control liposomes are from ClodLip BV (Amsterdam, The Netherlands). Recombinant pore-forming and non pore-forming Ply were expressed in *E. coli* and purified as described³⁷. Briefly, toxins were passed three times through an EndoTrap endotoxin removal column (Profos, Regensburg, Germany), after which LPS was undetectable using the PyroGene recombinant factor C assay (Lonza; detection limit 0.01 endotoxin units/ml). Mouse and human ELISA kits are from R&D systems and eBioscience.

Infection with S. pneumoniae

S. pneumoniae serotype 1 clinical isolate E1586 sequence type ST304 has been described elsewhere⁵⁰. In some experiments, parental and *ply::cat* mutant D39 strains were used. Mice were anesthetized and administered i.n. with 50 μ l of PBS containing live bacteria.

Neutrophil and alveolar macrophage depletion

Neutrophils were depleted 24 h prior *S.p.* infection using an anti-Ly6G mAb (100 µg/mouse i.p., clone: NIMP-R14). Alveolar macrophages were depleted using clodronate liposomes. Clodronate liposomes and control liposomes were delivered twice by i.n. route 48 and 24 h prior infection (50 µl/mice).

Measurement of cytokines in the whole lungs

Perfused lungs were collected in liquid nitrogen until processing. An anti-protease solution was prepared by dissolving one tablet of anti-protease (25x) in 2 ml of distilled water. T-Per Tissue protein extraction buffer (1 ml) containing 1x of the anti-protease solution was added onto lungs and homogenized for 1 min. Lung lysates were kept on ice for 20 min then centrifuged at 10 000 rpm for 15 min. The supernatants were collected in sterile eppendorfs and stored at -20° until cytokine analysis.

Preparation of pulmonary immune cells

Mice treated with anti-TNF- α (150 µg/mouse i.p.) or isotype controls were infected or not with *S. pneumoniae*. Lung mononuclear cells (MNCs) were prepared by classical procedures. Briefly, lungs were perfused with PBS 2% FCS, excised and finely minced, followed by enzymatic digestion for 20 min at 37°C in PBS containing 1 mg/ml collagenase type VIII (Sigma-Aldrich) and 1 µg/ml DNase type I (Roche). After wash, lung homogenates were resuspended in a 20% Percoll™ gradient, and centrifuged at 2000 rpm without brake at RT for 15 min. The pellet was washed in PBS 2% FCS and red blood cells were removed using lysis buffer (Sigma-Aldrich).

Labelling of vascular vs interstitial pulmonary lung leukocytes

Anesthetized mice were injected with 2 µg of PeCy7-labelled rat anti-CD45 (clone: 30-F11) mAb via the retro-orbital venous plexus. The mAb was allowed to circulate for 5 min in order to label all leukocytes in the vascular space including blood compartment and circulating and marginated leukocytes marginated to the vasculature wall²⁹. After extensive perfusion (to remove circulating leukocytes), lungs were removed and lung MNCs leukocytes were prepared as previously described. The cell suspension was then labeled with appropriate mAbs for cell subset detection and PE-labelled anti-CD45 (clone I3/2.3) mAb to exogenously stain all pulmonary lung leukocytes including marginated and interstitial pulmonary leukocytes. Marginated leukocytes were defined as double positive for CD45-PeCy7 and CD45-PE and interstitial leukocytes were defined as CD45-PeCy7 negative and CD45-PE positive.

Cell sorting and in vitro/ex vivo assays

Lungs were harvested from naïve or infected mice and cell suspensions were prepared as previously described. Cells were sorted using an ARIA cell sorter (BD Biosciences). To purify $\gamma\delta$ T cells, lung MNCs were labeled with PB-conjugated anti-CD3 antibody, PerCp-Cy5.5-conjugated anti-TCR δ mAb and PeCy7-conjugated anti-CD27 mAb. For neutrophil purification, lung MNCs were labeled with FITC-conjugated anti-Ly6G mAb and PerCp-Cy5.5-conjugated anti-CD11b mAb. After cell surface labeling, cells were sorted using a FACS Aria (BD Biosciences). This protocol yielded >98% cell purity as evaluated by FACS. In some experiments, pulmonary neutrophils were enriched using positive selection (anti-Ly6G) on LS column with a MidiMACS™ Separator (Miltenyi Biotec). Purity after MACS enrichment yielded around 85-90% as evaluated by FACS. For *in vitro* stimulation assays, neutrophils were cultured for 3 h in complete RPMI 5% FCS media containing recombinant mouse TNF- α , and then pneumolysin was added for another 90 min.

Purified CD27⁻ or CD27⁺ $\gamma\delta$ T cells were cultured 20 h in complete media containing recombinant IL-23 (1 ng/ml), and/or recombinant IL-1 β (1 ng/ml), or conditioned media from cultured neutrophils isolated from infected or naive mice. In some cases, anti-IL-1 β (5 μ g/ml) was added to culture.

Intracellular FACS staining and cytopins

Lungs were harvested at different time points and MNCs were prepared as described above. Cells were incubated in RPMI 1640 5% FCS containing Golgi Plug/Golgi Stop (BD Biosciences) for 2 h at 37°C. Then, cells were washed with appropriate dilutions of the different antibodies for 30 min in PBS 2% FCS. Cells were washed, and fixed using IC Fixation Buffer (eBioscience, CliniSciences, Montrouge, France). Fixed cells were then permeabilized in Permeabilization Buffer (eBioscience), according to the manufacturer's instructions. Cells were stained with PE-conjugated mAbs against TNF- α , IL-17A or pro-IL-1 β and analyzed on a LSR Fortessa or a Canto II (BD Biosciences). FACS analyses were performed using the FlowJo software (Treestar, OR USA). A morphology-based differential cell analysis was conducted on cytopin preparations from the broncho-alveolar lavage fluid samples from PBS or *S.p.*-infected mice and subjected to May-Grünwald Giemsa staining.

Western blotting

Pulmonary neutrophil protein lysates were prepared in 1% NP-40-containing lysis buffer. Proteins were denatured by boiling in Laemmli buffer and subjected to SDS-PAGE. Separated proteins were transferred to PVDF membranes and stained using primary antibodies against IL-1 β (GeneTex), NLRP3 (AdipoGen) and HRP-coupled anti-mouse β -actin (Santa Cruz). Subsequently, membranes

were exposed to the corresponding secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch) and developed with ECL (GE Healthcare).

Generation of D39 mutant strains

Genomic DNA from D39 strain for amplification was prepared by suspending 1 ml of pelleted D39 (OD₆₀₀ 0.4) in 100 µl lysis buffer (0.01% sodium dodecyl sulfate, 0.1% sodium deoxycholate, 0.015 M sodium citrate), incubating the mixture at 37°C for 30 min, and then diluting the mixture with 100 µl PBS. Plasmid DNA was extracted from harboring *E. coli* strain with NucleoSpin Plasmid Kit (Macherey-Nagel) following manufacturer's protocols. Pneumolysin deletion mutant was constructed using sequence overlap extension followed by allelic replacement of native pneumolysin gene with chloramphenicol marker. Upstream flanking region was amplified from genomic D39 DNA using primer set LK162 and LK163 (5'-CTAGCCTTGACA ACTAGCCAATC-3'; 5'-**CTCACAAAAATCCGAGCTCCACCG**CTTCTACCTCCTAATAAGTTCCTGG-3').

Chloramphenicol marker amplified from plasmid pKOC with primer set LK164 and LK 165 (5'-**CCAGGAACTTATTAGGAGGTAGAAG**CGGTGGAGCTCGGATTTTTGTGAG-3'; 5'-**CGCAAGCATTCTCCTCTCCGCTAGGGCGCTGGCAAG**-3'). Downstream flanking region was amplified from genomic D39 DNA using primer set LK166 and LK167 (5'-**CTTGCCAGCGCCCTAGCG**GAGAGGAGAATGCTTGCG-3'; 5'-TGCAAATAGAAAGTTTCAGCC-3'). The overlapping regions of fragments are indicated by underlined and bolded sections. All fragments were amplified using DreamTaq polymerase (ThermoFisher Scientific) with 1 min extension and a 55°C annealing temperature for 34 cycles. Fragments joined using this standard PCR reaction except with a 3 min extension using terminal primers LK162 and LK167. Pneumococcal transformation was performed by addition of 100 ng/ml

of synthetic CSP-1 to 1 ml of D39 grown to OD₆₀₀ 0.12 followed by incubation at 37°C for 12 min. Approximately 200 ng of DNA added to 100 µl of activated cells followed by incubation at 30°C for 20 min. Cells diluted 10 times in C+Y media and incubated for 1.5 h at 37°C before plating on Columbia agar supplemented with 4 % defibrinated sheep blood and 4.5 µg/ml chloramphenicol. Positive colonies were screened and verified by sequencing.

Isolation and culture of human cells

To obtain total blood leukocytes, blood samples collected on heparanized tubes were treated with Buffer EL (Qiagen) according to manufacturer's instructions to remove erythrocytes. Neutrophils have been isolated as previously described⁵¹. This procedure routinely yielded >85% cell purity as assessed by FACS and May-Grünwald Giemsa stain (Sigma Aldrich). Cells (4×10^5 /well) were cultured for 3 h in complete RPMI 5% FCS media containing recombinant human TNF- α (100 ng/ml), and then pneumolysin (500 ng/ml) was added for another 90 min. After culture, cell viability was evaluated by PI staining.

Statistical analysis

All statistical analysis was performed using GraphPad Prism software. The statistical significance was evaluated using non-parametric Mann-Whitney *U* or Kruskal-Wallis (followed by a Dunn's post-test) tests to compare the means of biological replicates in each experimental group. Survival rates after *S. pneumoniae* challenge were analyzed using a log-rank test. Results with a *P* value of less than 0.05 were considered significant. ns: not significant; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

Acknowledgments

C.P., J.C.S. and C.F. were supported by INSERM. B.R. and F.T. were supported by CNRS. Work in M.L.'s laboratory is supported by VIB, Ghent University (BOF 01N02313, BOF 01J11113, BOF14/GOA/013), the Fund for Scientific Research-Flanders (grants G030212N and G011315N), and the European Research Council (grant 281600). M.H. was the recipient of a doctoral fellowship from the AZM foundation. E.P. was supported by a post-doctoral fellowship from the French Institute of cancer (INCa). Dr. Isabelle Wolowczuk (CIIL, Institut Pasteur, Lille) is acknowledged for critical reading of this manuscript. We thank Nathalie Messéant and Bruno Couvreur for mouse husbanding. We also thank Aurélie Maillard, Pauline Chenuet and the BICeL flow cytometry core facility for technical assistance.

Competing financial interests

The authors declare no competing financial interests.

References

1. Kadioglu, A., Weiser, J. N., Paton, J. C. & Andrew, P. W. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 288–301 (2008).
2. van der Poll, T. & Opal, S. M. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet Lond. Engl.* **374**, 1543–1556 (2009).
3. O'Brien, K. L. *et al.* Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet Lond. Engl.* **374**, 893–902 (2009).
4. Johnson, H. L. *et al.* Systematic evaluation of serotypes causing invasive pneumococcal disease among children under five: the pneumococcal global serotype project. *PLoS Med.* **7**, (2010).
5. Iwakura, Y., Ishigame, H., Saijo, S. & Nakaie, S. Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity* **34**, 149–162 (2011).
6. Kolls, J. K. & Khader, S. A. The role of Th17 cytokines in primary mucosal immunity. *Cytokine Growth Factor Rev.* **21**, 443–448 (2010).
7. Cao, J. *et al.* Activation of IL-27 signalling promotes development of postinfluenza pneumococcal pneumonia. *EMBO Mol. Med.* **6**, 120–140 (2014).
8. Wilson, R. *et al.* Protection against *Streptococcus pneumoniae* lung infection after nasopharyngeal colonization requires both humoral and cellular immune responses. *Mucosal Immunol.* **8**, 627–639 (2015).
9. Hayday, A. C. Gammadelta T cells and the lymphoid stress-surveillance response. *Immunity* **31**, 184–196 (2009).
10. Prinz, I., Silva-Santos, B. & Pennington, D. J. Functional development of $\gamma\delta$ T cells. *Eur. J. Immunol.* **43**, 1988–1994 (2013).

11. Roark, C. L., Simonian, P. L., Fontenot, A. P., Born, W. K. & O'Brien, R. L. gammadelta T cells: an important source of IL-17. *Curr. Opin. Immunol.* **20**, 353–357 (2008).
12. Sutton, C. E., Mielke, L. A. & Mills, K. H. G. IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells and innate lymphoid cells. *Eur. J. Immunol.* **42**, 2221–2231 (2012).
13. Ribot, J. C. *et al.* CD27 is a thymic determinant of the balance between interferon-gamma- and interleukin 17-producing gammadelta T cell subsets. *Nat. Immunol.* **10**, 427–436 (2009).
14. Paget, C. *et al.* CD3bright signals on $\gamma\delta$ T cells identify IL-17A-producing V γ 6V δ 1+ T cells. *Immunol. Cell Biol.* **93**, 198–212 (2015).
15. Kolaczowska, E. & Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 159–175 (2013).
16. Kopf, M., Schneider, C. & Nobs, S. P. The development and function of lung-resident macrophages and dendritic cells. *Nat. Immunol.* **16**, 36–44 (2015).
17. Mantovani, A., Cassatella, M. A., Costantini, C. & Jaillon, S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 519–531 (2011).
18. Hussell, T. & Bell, T. J. Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 81–93 (2014).
19. Nathan, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 173–182 (2006).
20. Guarda, G. *et al.* Differential expression of NLRP3 among hematopoietic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **186**, 2529–2534 (2011).
21. Karmakar, M. *et al.* Neutrophil IL-1 β processing induced by pneumolysin is mediated by the NLRP3/ASC inflammasome and caspase-1 activation and is dependent on K⁺ efflux. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **194**, 1763–1775 (2015).

22. Mankan, A. K., Dau, T., Jenne, D. & Hornung, V. The NLRP3/ASC/Caspase-1 axis regulates IL-1 β processing in neutrophils. *Eur. J. Immunol.* **42**, 710–715 (2012).
23. Bakele, M. *et al.* Localization and functionality of the inflammasome in neutrophils. *J. Biol. Chem.* **289**, 5320–5329 (2014).
24. Chow, M. T. *et al.* Type I NKT-cell-mediated TNF- α is a positive regulator of NLRP3 inflammasome priming. *Eur. J. Immunol.* **44**, 2111–2120 (2014).
25. Franchi, L., Eigenbrod, T. & Núñez, G. Cutting edge: TNF- α mediates sensitization to ATP and silica via the NLRP3 inflammasome in the absence of microbial stimulation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **183**, 792–796 (2009).
26. Waters, J. P., Pober, J. S. & Bradley, J. R. Tumour necrosis factor in infectious disease. *J. Pathol.* **230**, 132–147 (2013).
27. Croft, M. The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 271–285 (2009).
28. Mizgerd, J. P. Acute lower respiratory tract infection. *N. Engl. J. Med.* **358**, 716–727 (2008).
29. Barletta, K. E. *et al.* Leukocyte compartments in the mouse lung: distinguishing between marginated, interstitial, and alveolar cells in response to injury. *J. Immunol. Methods* **375**, 100–110 (2012).
30. Sutton, C. E. *et al.* Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity* **31**, 331–341 (2009).
31. José, R. J. *et al.* Regulation of neutrophilic inflammation by proteinase-activated receptor 1 during bacterial pulmonary infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **194**, 6024–6034 (2015).

32. Ma, J. *et al.* Morphine disrupts interleukin-23 (IL-23)/IL-17-mediated pulmonary mucosal host defense against *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infect. Immun.* **78**, 830–837 (2010).
33. Lamkanfi, M. & Dixit, V. M. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell* **157**, 1013–1022 (2014).
34. Gross, O., Thomas, C. J., Guarda, G. & Tschopp, J. The inflammasome: an integrated view. *Immunol. Rev.* **243**, 136–151 (2011).
35. Karmakar, M., Sun, Y., Hise, A. G., Rietsch, A. & Pearlman, E. Cutting edge: IL-1 β processing during *Pseudomonas aeruginosa* infection is mediated by neutrophil serine proteases and is independent of NLRC4 and caspase-1. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **189**, 4231–4235 (2012).
36. Schreiber, A. *et al.* Neutrophil serine proteases promote IL-1 β generation and injury in necrotizing crescentic glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **23**, 470–482 (2012).
37. Coll, R. C. *et al.* A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nat. Med.* **21**, 248–255 (2015).
38. McNeela, E. A. *et al.* Pneumolysin activates the NLRP3 inflammasome and promotes proinflammatory cytokines independently of TLR4. *PLoS Pathog.* **6**, e1001191 (2010).
39. Itohara, S. *et al.* Homing of a gamma delta thymocyte subset with homogeneous T-cell receptors to mucosal epithelia. *Nature* **343**, 754–757 (1990).
40. Shibata, K. *et al.* Notch-Hes1 pathway is required for the development of IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells. *Blood* **118**, 586–593 (2011).
41. Karmakar, M., Katsnelson, M. A., Dubyak, G. R. & Pearlman, E. Neutrophil P2X7 receptors mediate NLRP3 inflammasome-dependent IL-1 β secretion in response to ATP. *Nat. Commun.* **7**, 10555 (2016).

42. Chen, K. W. *et al.* The murine neutrophil NLRP3 inflammasome is activated by soluble but not particulate or crystalline agonists. *Eur. J. Immunol.* **46**, 1004–1010 (2016).
43. Martel-Gallegos, G. *et al.* Human neutrophils do not express purinergic P2X7 receptors. *Purinergic Signal.* **6**, 297–306 (2010).
44. Vaughan, K. R. *et al.* Inhibition of neutrophil apoptosis by ATP is mediated by the P2Y11 receptor. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **179**, 8544–8553 (2007).
45. Harder, J. *et al.* Activation of the Nlrp3 inflammasome by *Streptococcus pyogenes* requires streptolysin O and NF-kappa B activation but proceeds independently of TLR signaling and P2X7 receptor. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **183**, 5823–5829 (2009).
46. Bezbradica, J. S., Coll, R. C. & Schroder, K. Sterile signals generate weaker and delayed macrophage NLRP3 inflammasome responses relative to microbial signals. *Cell. Mol. Immunol.* (2016). doi:10.1038/cmi.2016.11
47. Wertz, I. E. & Dixit, V. M. Regulation of death receptor signaling by the ubiquitin system. *Cell Death Differ.* **17**, 14–24 (2010).
48. Michel, O., Dinh, P. H. D., Doyen, V. & Corazza, F. Anti-TNF inhibits the airways neutrophilic inflammation induced by inhaled endotoxin in human. *BMC Pharmacol. Toxicol.* **15**, 60 (2014).
49. Mathews, J. A. *et al.* $\gamma\delta$ T cells are required for pulmonary IL-17A expression after ozone exposure in mice: role of TNF α . *PloS One* **9**, e97707 (2014).
50. Muñoz, N. *et al.* Mucosal administration of flagellin protects mice from *Streptococcus pneumoniae* lung infection. *Infect. Immun.* **78**, 4226–4233 (2010).
51. Oh, H., Siano, B. & Diamond, S. Neutrophil isolation protocol. *J. Vis. Exp. JoVE* (2008). doi:10.3791/745

Figure legends

Figure 1: IL-17A and $\gamma\delta$ T cells are essential for the control of *S. pneumoniae* infection. (a-f)

Age- and sex-matched WT C57BL/6 or IL-17A-deficient mice were infected i.n with *S.p.* (5×10^5 CFU: 1 x LD₅₀) (a) Survival of mice was monitored daily (n = 10). (b) Number of CFU was determined 60 h post infection (p.i.) in the lungs (*left panel*) and in the spleen (*right panel*). Individual counts of one representative experiment out of two (n = 7-10) are shown. (c) Absolute number of pulmonary neutrophils was assessed by FACS (CD11b⁺ Ly6G⁺) 12 h p.i.. The mean \pm SEM of one experiment out of two is shown (n = 4-5). (d) Absolute number and frequency of pulmonary IL-17A-producing lymphocyte subsets were assessed by intracellular FACS staining 12 h p.i.. The mean \pm SEM of two experiments (n = 8) is shown. (e) IL-17A⁺ $\gamma\delta$ T cells from infected mice were screened by FACS for V γ chain usage 12 h p.i.. A pie chart representing means of two experiments is shown (n = 6) (*left panel*). A representative FACS plot of pulmonary $\gamma\delta$ T cells is presented in the *middle panel*. CD3^{bright} vs CD3^{dim} $\gamma\delta$ T cells were labelled in presence or not of the 17D1 mAb (*right panel*). (f) Means \pm SEM of CD45⁺ vs CD45⁻ populations in naive lungs from three experiments (n = 6) are represented in the *upper panel*. A representative FACS plot of $\gamma\delta$ T cell subsets for anti-CD45 (*in vivo*) labelling is shown in the *lower panel*. (g-h) WT and *Tcrd*^{-/-} mice were infected with *S.p.* (5×10^5 CFU). (g) Survival of mice was monitored daily (n = 7-8). (h) Number of CFU was determined 60 h p.i. in the lungs and in the spleen (*upper panel*). Individual counts of two experiments (n = 16-17) are shown. Absolute number of neutrophils in lungs of control or *S.p.*-infected WT or *Tcrd*^{-/-} mice (*lower panel*) was assessed by FACS 12 h p.i. and represented as in panel 1C. The mean \pm SEM of two experiments (n = 7-8) is shown.

Figure 2: $\gamma\delta$ T17 cell activation relies on IL-23 and IL-1R signalling. (a-b) C57BL/6 WT, *Il1r1*^{-/-} or *Il23a*^{-/-} mice were infected with *S.p.* and pulmonary cells were analysed by flow cytometry 12 h p.i. **(a)** Representative FACS plots of IL-17A production by $\gamma\delta$ T cells from two experiments are shown (*upper panel*). Means \pm SEM of pulmonary IL-17A-positive $\gamma\delta$ T cell frequency is shown in the *lower panel*. **(b)** Absolute number of pulmonary neutrophils was analysed. The mean \pm SEM for two experiments (n = 6) is shown.

Figure 3: Neutrophils are a major and early source of IL-1 β in response to pneumococcal infection. (a-b) WT C57BL/6 mice were infected i.n with *S.p.* **(a)** Kinetics of proIL-1 β expression by pulmonary neutrophils was assessed by flow cytometry. Means \pm SEM of frequency of proIL-1 β -positive cells among myeloid population is represented at different kinetics following infection (*upper left panel*). The mean \pm SEM of absolute number of proIL-1 β ⁺ pulmonary myeloid cells is shown in the *upper right panel*. Representative FACS plots of proIL-1 β ⁺ neutrophils are shown in the *lower panel*. Data presented are from two experiments (n = 6). **(b)** 4 x 10⁵ MACS-enriched pulmonary neutrophils from either naive or *S.p.*-infected (12 h p.i.) mice were incubated for 3 h at 37°C in complete media. Levels of IL-1 β levels in culture supernatants from the positive and negative fractions were measured by ELISA. Means \pm SEM of biological replicates from two experiments are represented (n = 6). **(c)** Levels of IL-1 β in whole lungs of controls or neutrophil-depleted mice were assessed 12 h p.i.. The mean \pm SEM of two experiments (n= 4-10) is shown.

Figure 4: proIL-1 β up-regulation in neutrophils is mediated through a TNF- α /TNFR1 pathway. (a-b) TNF- α production was assessed at different kinetics following pneumococcal infection. **(a)** Levels of TNF- α protein in whole lungs were assessed by ELISA. The mean \pm SEM

of three experiments (n = 5-9) is shown. **(b)** Representative FACS plots of intracellular TNF- α ⁺ alveolar macrophages at different kinetics were represented (*left panel*) and means \pm SEM of frequency of TNF- α ⁺ myeloid cell populations over time after *S.p.* infection were shown in the *right panel* (n = 5-9). **(c)** Control or AM-depleted mice were infected i.n. with *S.p.*. Levels of TNF- α in whole lung were quantified 12 h p.i. by ELISA. The mean \pm SEM of TNF- α protein detected from two experiments is shown (n = 6-10). **(d-e)** Ig control- or anti-TNF- α mAb-treated mice were challenged with *S. p.* and euthanized sacrificed 12 h p.i. **(d)** ProIL-1 β expression by neutrophils was determined by intracellular FACS staining. A representative plot is shown in the *left panel*. Means \pm SEM of frequency (*middle panel*) and absolute number (*right panel*) of proIL-1 β ⁺ neutrophils from two experiments are represented (n = 5-6). **(e)** Means \pm SEM of frequency (*left panel*) and absolute number (*middle panel*) of IL-17A⁺ γ δ T cells are shown. Means \pm SEM of absolute number of pulmonary neutrophils are shown in the *right panel*. Data are pooled from two experiments (n = 6). **(f)** Control liposomes or clodronate liposomes-treated mice were infected or not i.n. with *S.p.*. Levels of IL-1 β in whole lung were quantified 12 h p.i. by ELISA. The mean \pm SEM of IL-1 β protein detected from two experiments is shown (n = 6-10). **(g)** WT or *Tnfrsf1a*^{-/-} mice were infected with *S.p.* and euthanized sacrificed 12 h p.i.. ProIL-1 β expression by neutrophils was determined by intracellular FACS staining. Means \pm SEM of frequency of proIL-1 β ⁺ (*left panel*) and total (*right panel*) neutrophils from two experiments were represented (n = 6-14). **(h)** 2 x 10⁵ FACS-sorted pulmonary neutrophils from naive mice were cultured for 3 h at 37° in complete media in presence of recombinant mouse TNF- α at the indicated concentrations. Then cells were analyzed by FACS for proIL-1 β expression. Individual biological replicates and means \pm SEM from two experiments were represented (n = 3-5).

Figure 5: NLRP3 inflammasome contributes to IL-1 β production by neutrophils. (a) IL-1 β levels production were assessed in whole lung from PBS or infected WT, *Nlrp3*^{-/-}, *Asc*^{-/-} and *Casp1/11*^{-/-} mice. The mean \pm SEM for two experiments is shown (n = 6-10). (b) PBS or *S.p.*-infected WT mice have been treated or not with MCC950 (1 mg/mouse i.n., 2 h p.i.) and euthanized sacrificed 12 h p.i.. Lungs were harvested, homogenized and IL-1 β production was quantified in homogenates by ELISA. The mean \pm SEM for two experiments is shown (n = 6-12). (c-d) Pulmonary neutrophils from PBS or *S.p.*-infected (12 h p.i.) mice were purified by FACS sorting. (c) Lysates from neutrophils were blotted for β -actin, IL-1 β and NLRP3 expression. (d) Neutrophils were cultured for 3 h at 37°C in complete media in presence or absence of MCC950 (10 μ M). Levels of IL-1 β in supernatants were analysed by ELISA. The mean \pm SEM of IL-1 β concentrations from two experiments is shown. (e) WT mice were i.n. infected with parental and mutant strains of D39 (4 x 10⁶ CFU/mouse). Mice were euthanized sacrificed 12 h p.i. and IL-1 β was measured in lung homogenates. The mean \pm SEM of IL-1 β concentrations from two experiments is shown (n = 8-9). (f-g) 2 x 10⁵ pulmonary neutrophils from WT, *Nlrp3*^{-/-} and *Casp1/11*^{-/-} naive mice were incubated in complete RPMI media at 37°C with or without recombinant TNF- α (100 ng/ml) for 3 h and pneumolysin was added for an additional 90 min (500 ng/ml). IL-1 β secretion in supernatants was quantified by ELISA. The mean \pm SEM of IL-1 β concentrations from two experiments is shown.

Figure 6: Human neutrophils produce NLRP3 inflammasome-dependent IL-1 β in response to TNF- α and Ply. (a) 4 x 10⁵ leukocytes from peripheral blood of non-smokers healthy donors were seeded in complete medium with recombinant human TNF- α with or without MCC950 (10 μ M) for 3 h and then stimulated with ply (500 ng/ml) for an extra 90 min. Supernatants were collected and tested for IL-1 β . The means \pm SEM of IL-1 β concentrations from 4 donors out of 6

are shown. **(b)** 2.5×10^5 purified neutrophils from peripheral blood of non-smokers healthy donors were cultured in complete medium with recombinant human TNF- α with or without MCC950 (10 μ M) for 3 h and then stimulated with ply (500 ng/ml) for an extra 90 min. Supernatants were collected and tested for IL-1 β . The means \pm SEM of IL-1 β concentrations from 4 donors out of 9 are shown.

Figure 7: IL-17A production by $\gamma\delta$ T17 cells is dependent on neutrophil-derived IL-1 β . **(a)** IL-17A production by pulmonary $\gamma\delta$ T cells was assessed in *S.p.*-infected control or neutrophil-depleted mice 6 h p.i. Representative FACS plots of IL-17A $^+$ $\gamma\delta$ T cells are shown in the *upper panel*. The mean \pm SEM of IL-17A $^+$ $\gamma\delta$ T cell frequency from two experiments (n = 6) is shown in the *lower panel*. **(b)** FACS-sorted pulmonary CD27 $^-$ $\gamma\delta$ T cells were incubated at 37°C for 20 h with complete and conditioned media (1:1 ratio) from non-sensitized neutrophils (NSN) or pneumococcus-sensitized neutrophils (PSN). In some conditions, anti-IL-1 β mAb (5 μ g/ml), rIL-1 β (1 ng/ml) and rIL-23 (1 ng/ml) were added to the culture. Conditioned media are supernatants of cultured purified pulmonary neutrophils from pooled naive (NSN) or *S.p.*-infected (PSN) mice. Neutrophils from infected mice have been purified 12h p.i.. IL-17A levels in the supernatants were analysed by ELISA. The mean \pm SEM of IL-17A concentrations from three experiments (n =3-5) is shown.

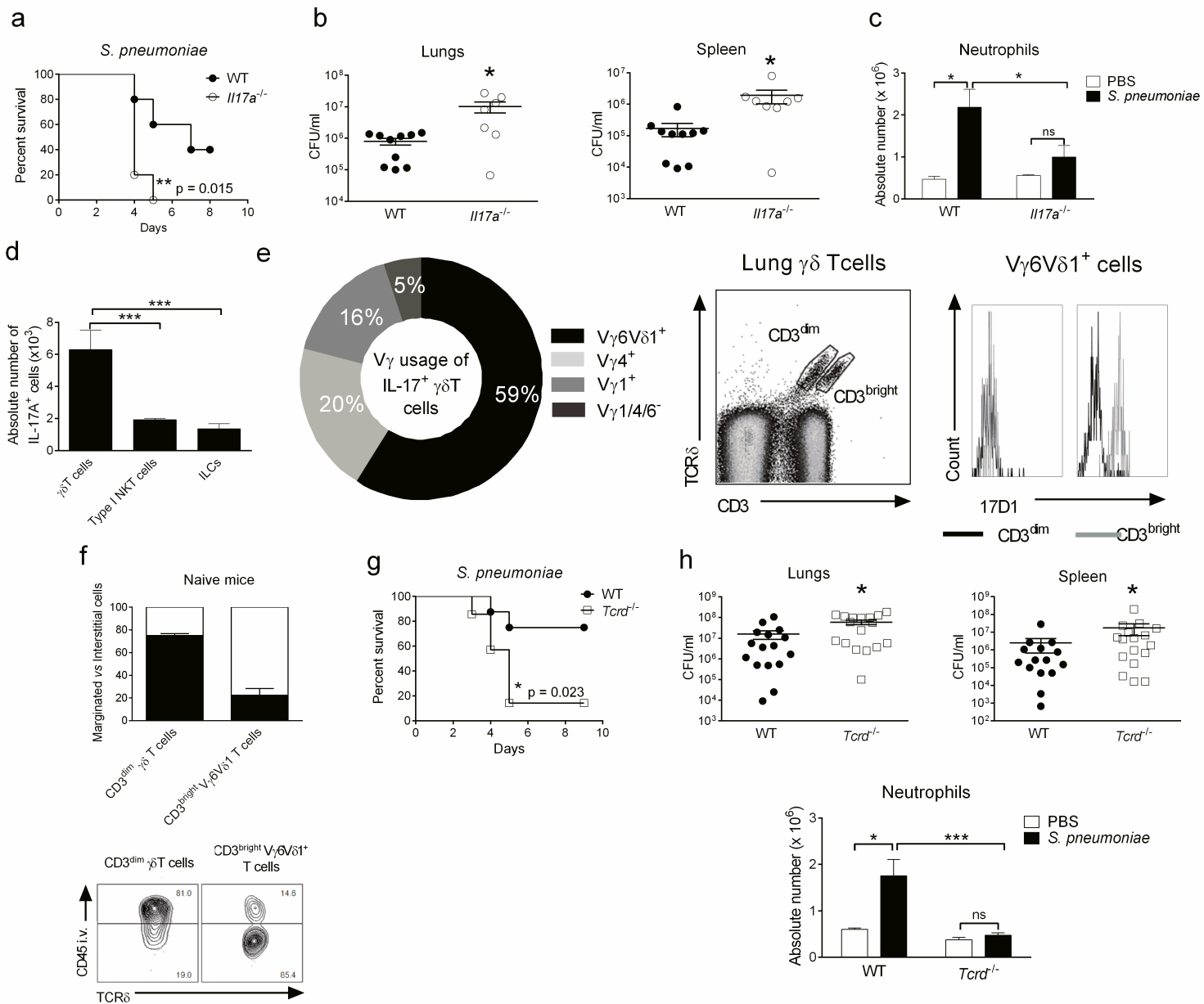
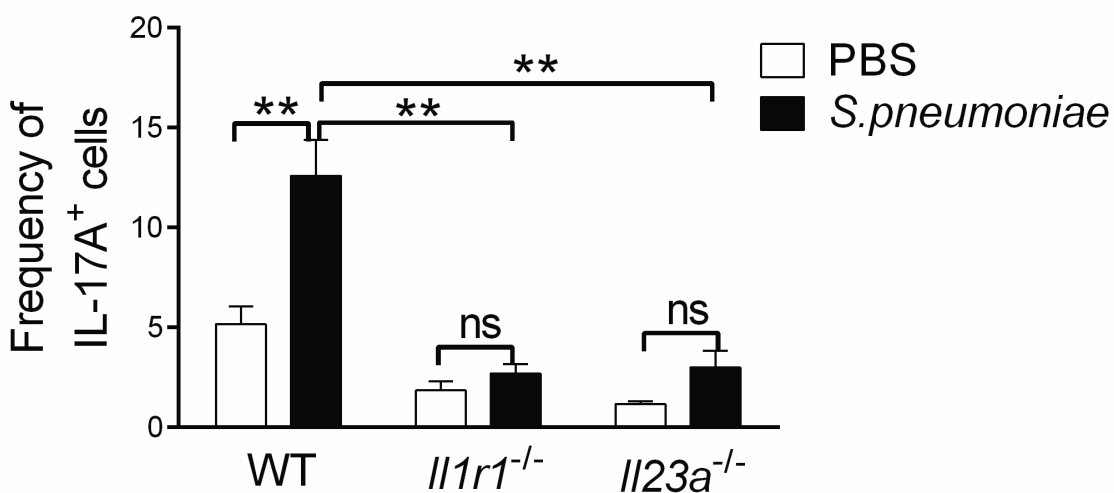
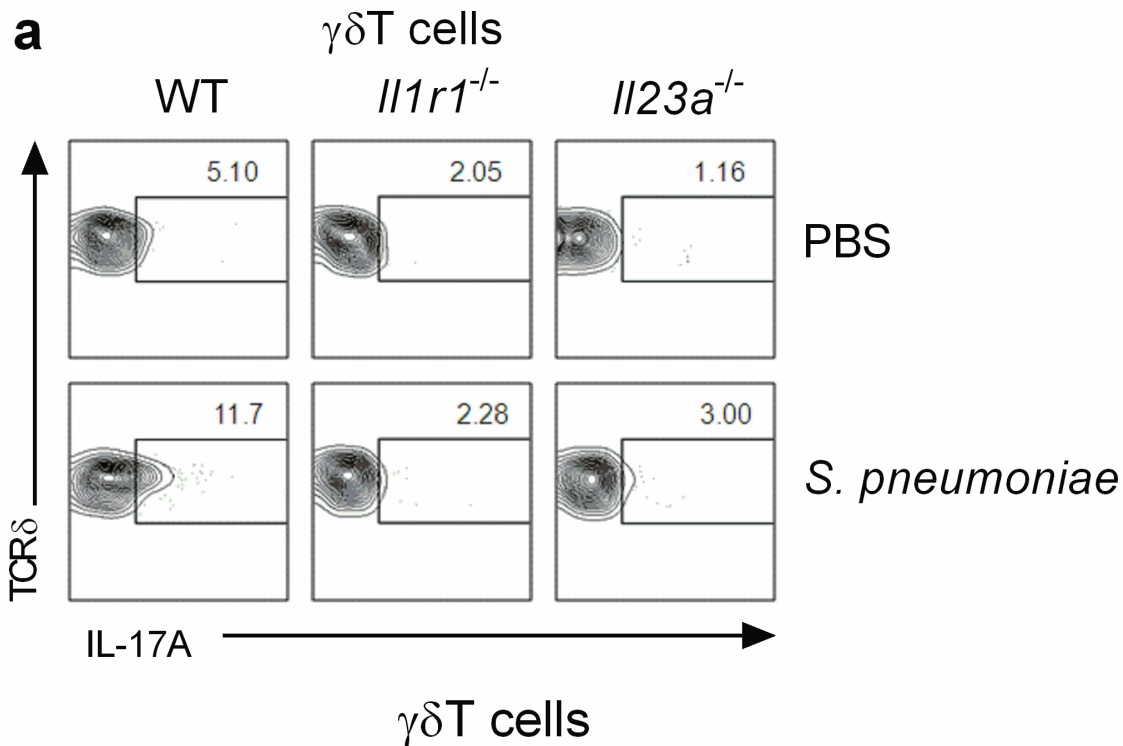


Figure 1



b

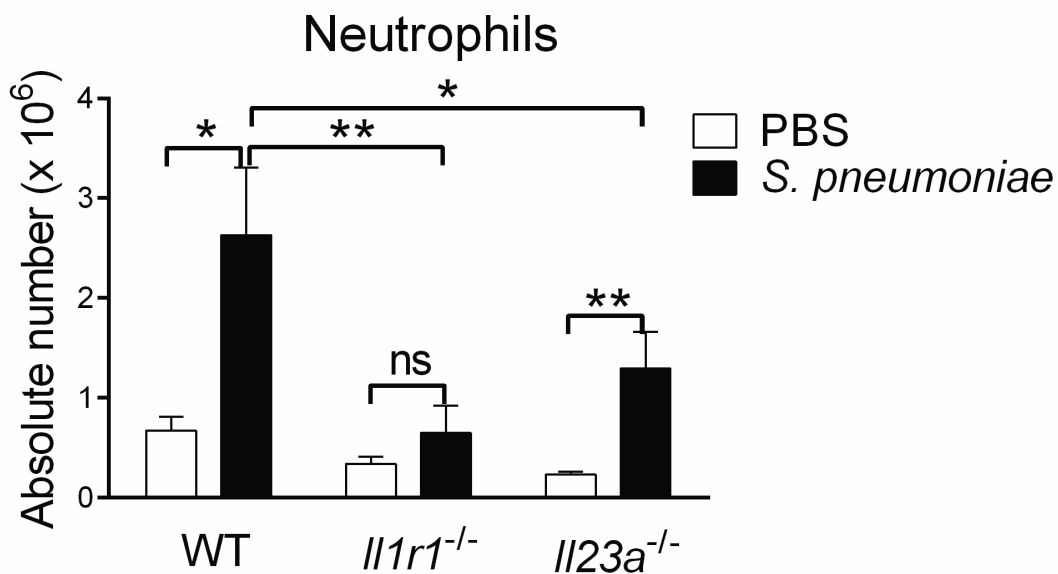


Figure 2

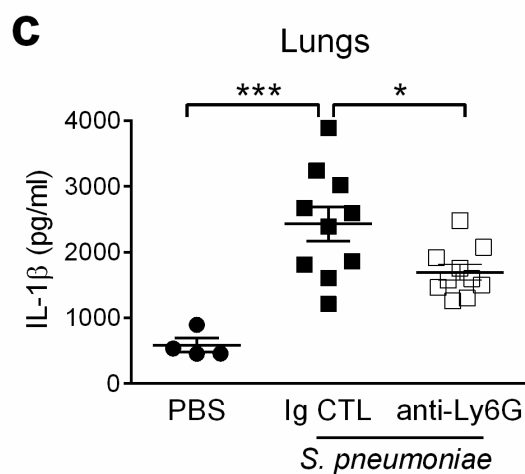
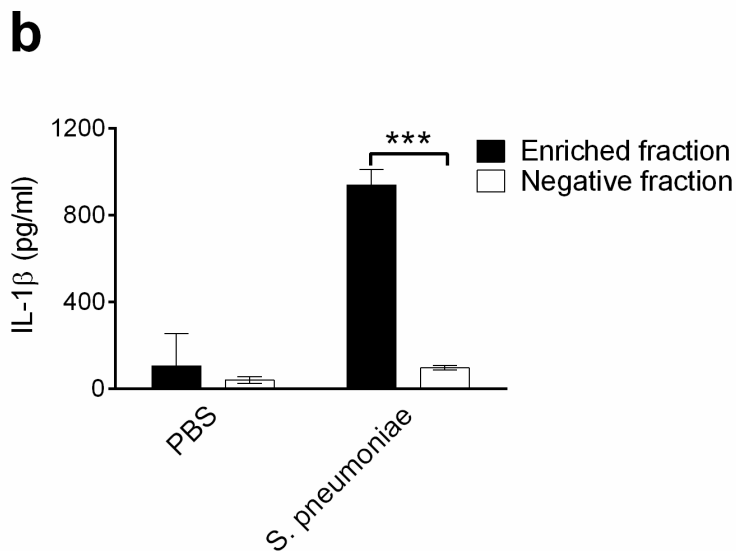
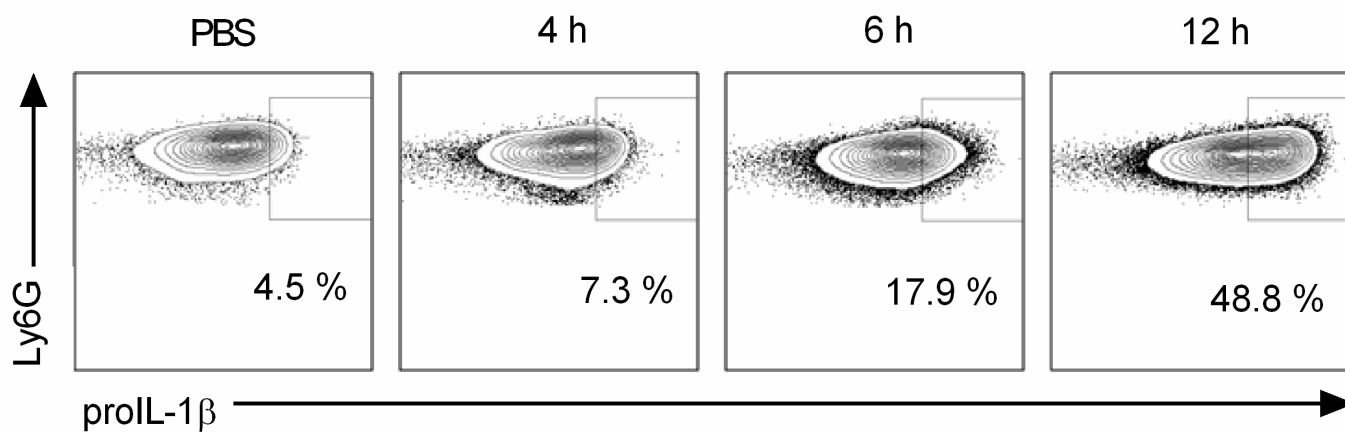
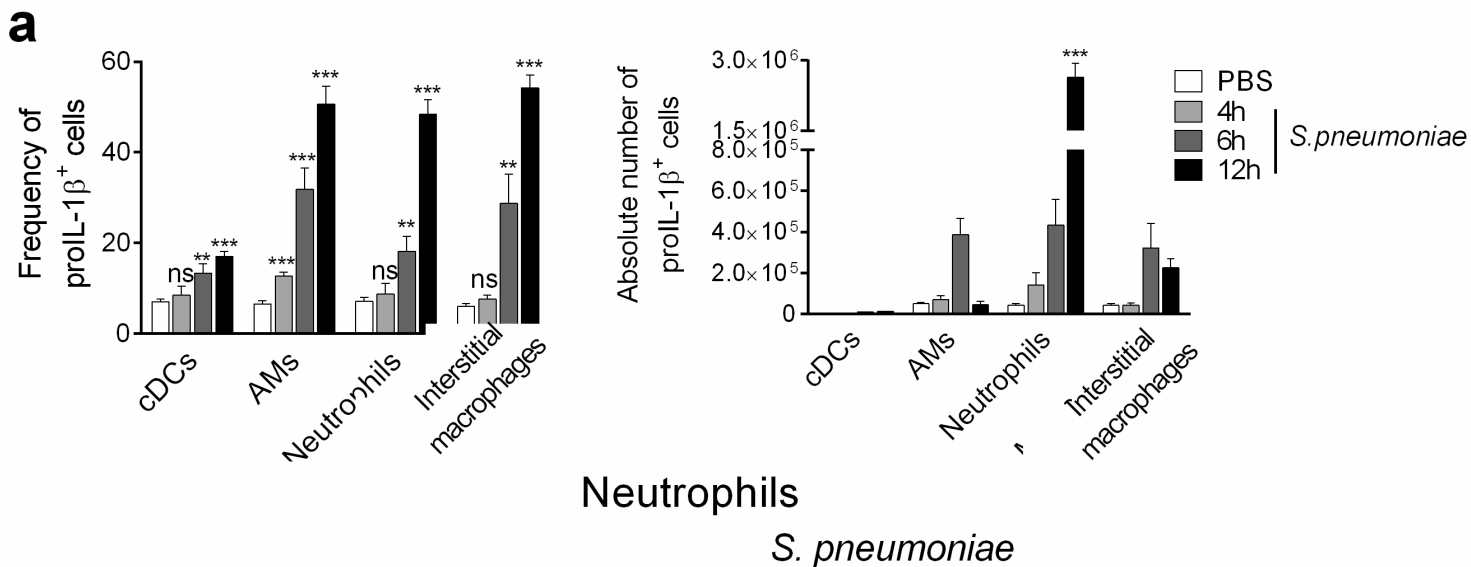


Figure 3

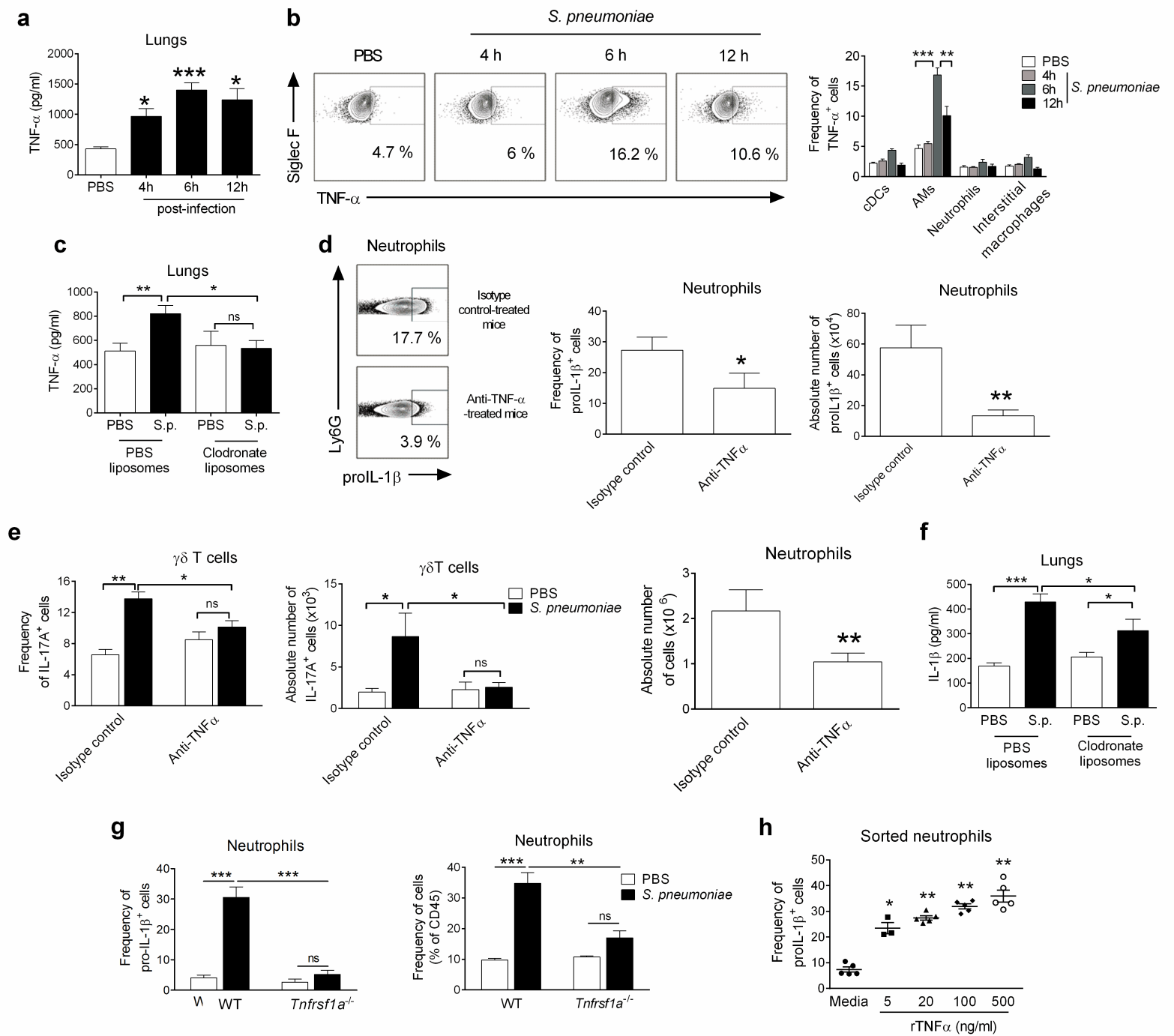


Figure 4

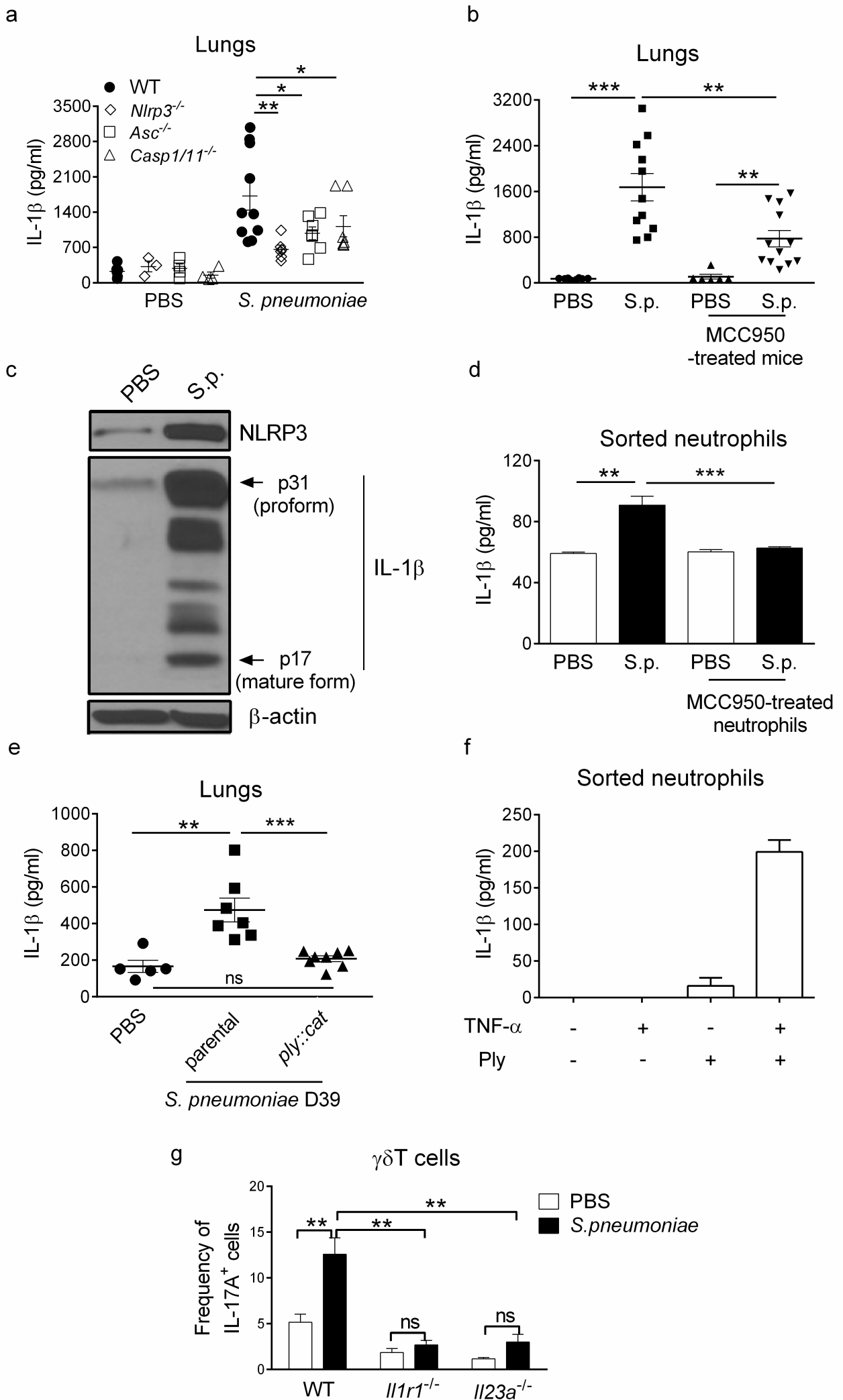


Figure 5

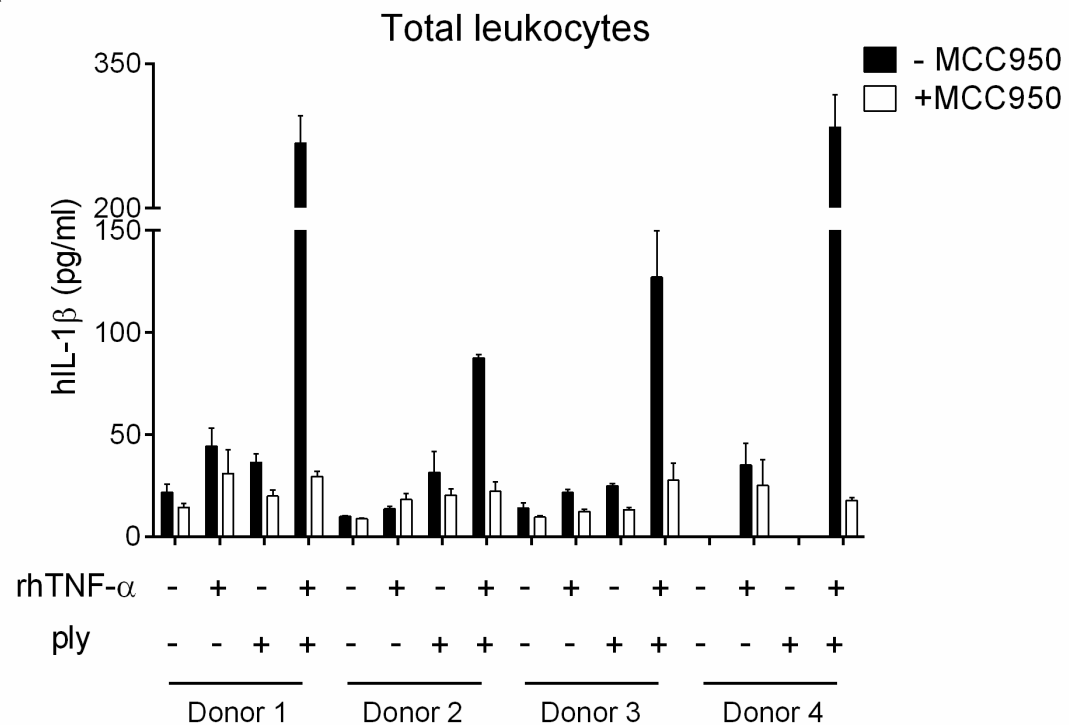
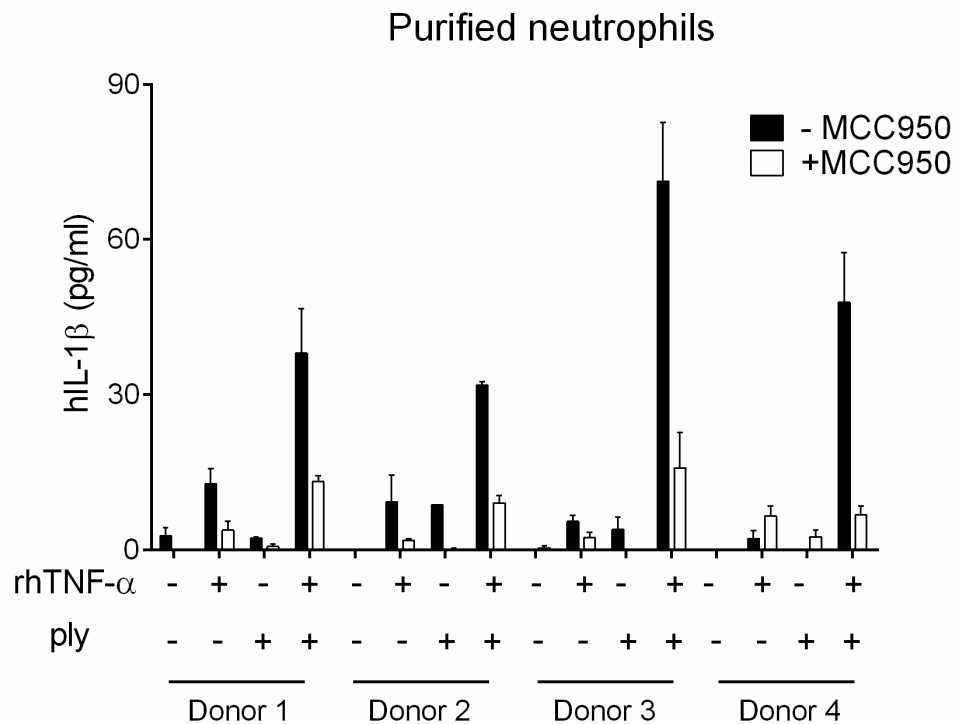
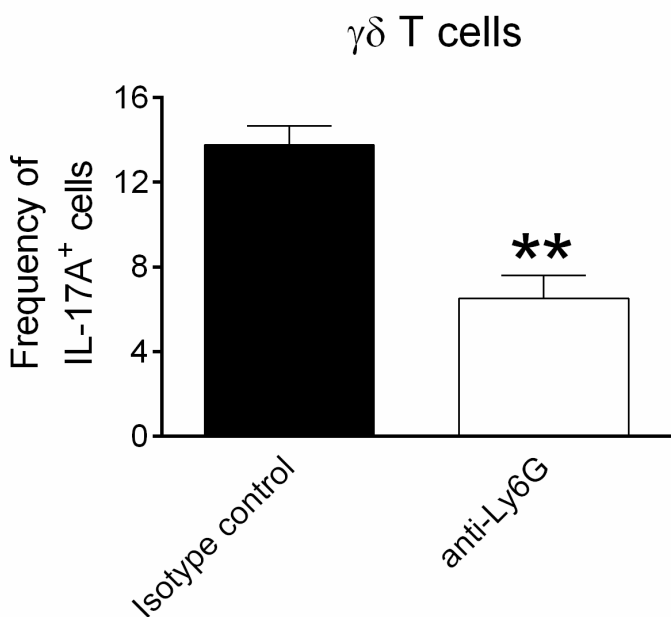
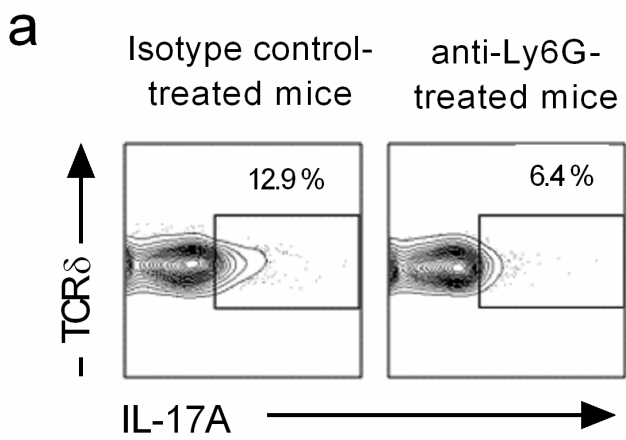
a**b**

Figure 6



b

CD27⁻ $\gamma\delta$ T cells

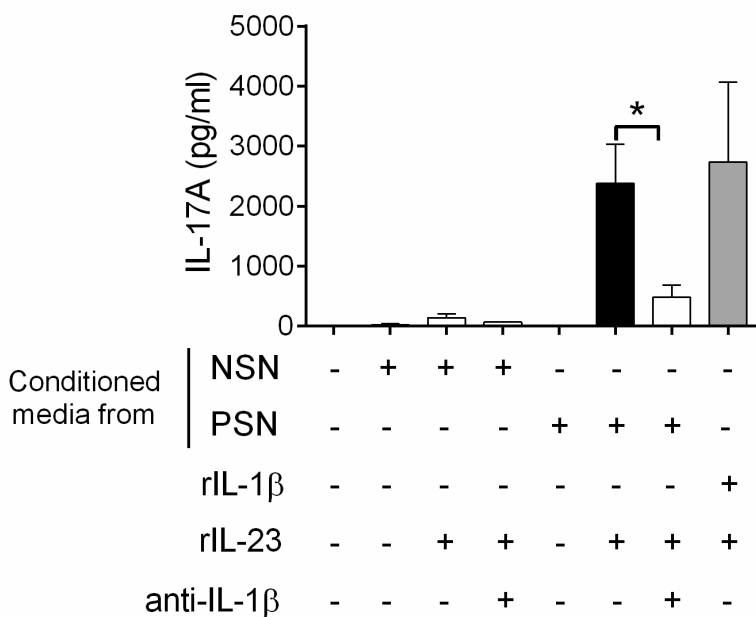


Figure 7

Supporting Information:

Hassane et al.,

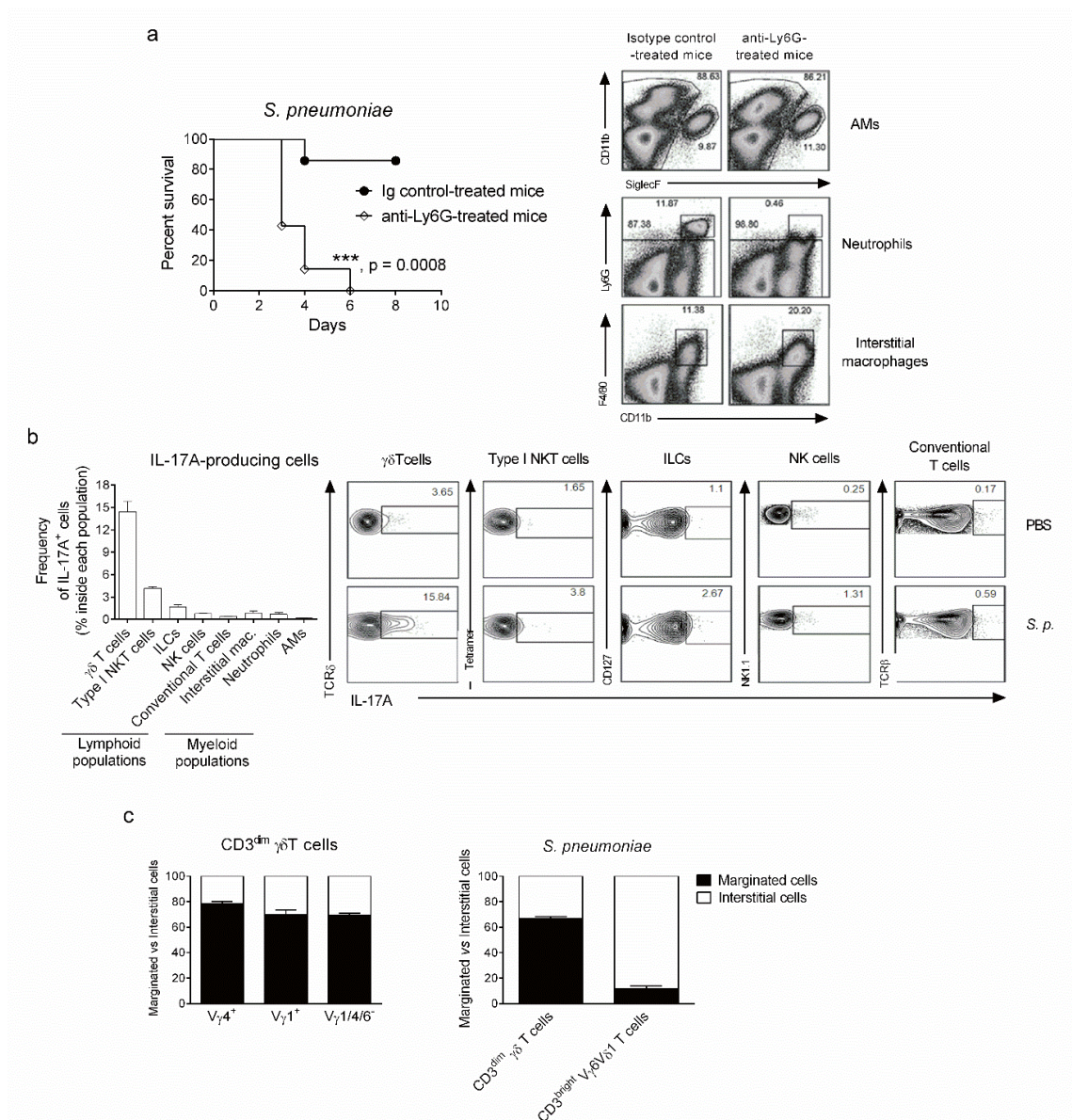


Figure S1: Role of neutrophils and IL-17A-producing cells in *S. pneumoniae*-induced pneumonia. (a) WT mice pre-treated or not with an anti-Ly6G (NIMP-R14; 100 μg/mouse) were infected with *S.p.* (5×10^5 CFU). Survival rate was monitored daily ($n = 7$) and is presented in the *left panel*. Specificity of anti-Ly6G mAb treatment was assessed by flow cytometry. Frequency of alveolar macrophages, neutrophils and interstitial macrophages in CD45⁺ pulmonary cells of isotype control-treated or anti-Ly6G-treated mice is shown in the *right panel*. (b) Mice were infected i.n. with *S.p.* (5×10^5 CFU) and were euthanized sacrificed 12 h later. Lymphoid and myeloid pulmonary cell subsets (gating strategy depicted in Table 1) were assessed for intracellular IL-17A expression (*left panel*). Representative FACS plots of intracellular IL-17A production by lymphoid cells from control and infected mice are shown in the *right panel*. (c) Location of γδT cell subsets in the pulmonary compartments was assessed by FACS approach. The location of CD3^{dim}γδT cells based on V_γ chain usage from naive mice is presented in the *left panel*. Analysis of CD3^{dim} vs CD3^{bright} V_γ6V_δ1⁺ T cells from *S.p.*-infected (12 h p.i.) mice is presented in the *right panel*. The mean ± SEM of one representative out of three experiment is shown ($n = 4-5$).

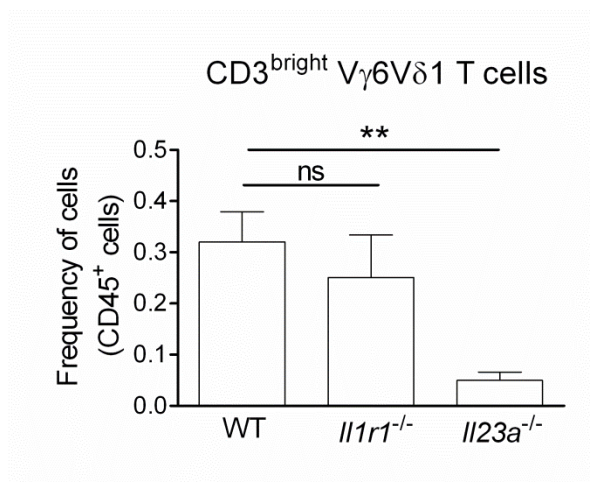


Figure S2: IL-23 is important in homeostasis of pulmonary CD3^{bright} Vγ6Vδ1⁺ T cells. Frequency of CD3^{bright} Vγ6Vδ1⁺ T cells in WT, *Il1r1*^{-/-} and *Il23a*^{-/-} naïve mice was assessed by flow cytometry. The mean ± SEM of frequency of CD3^{bright} Vγ6Vδ1⁺ T cells from two experiments is shown (n = 5).

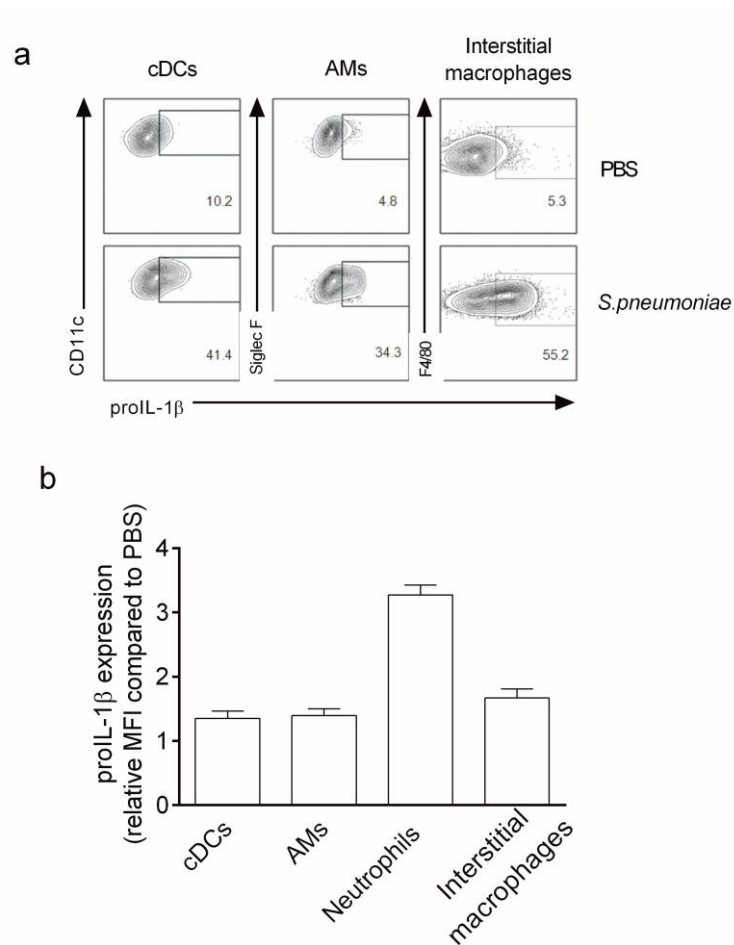


Figure S3: ProIL-1 β expression by lung myeloid populations during *S. pneumoniae* infection. WT mice were i.n. infected or not with *S. pneumoniae*. **(a)** ProIL-1 β expression in pulmonary myeloid populations was analysed by flow cytometry 12 h p.i.. Gates are set based on isotype control. **(b)** Intensity of proIL-1 β expression in myeloid subsets (12 h p.i.) is represented as fold increase normalized to PBS control mice (n = 6).

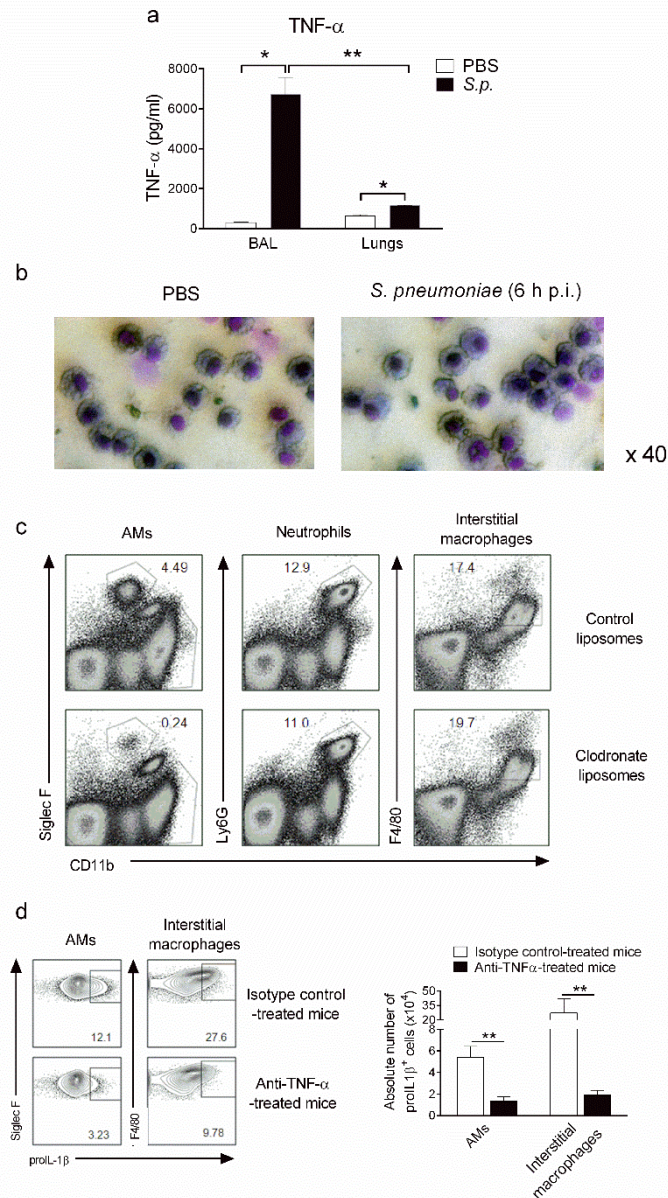


Figure S4: Role of TNF- α and AMs in proIL-1 β expression by myeloid cells. (a-b) WT mice were i.n. infected or not with *S. pneumoniae* and euthanized culled 6 h post-infection. (a) Levels of TNF- α in broncho-alveolar lavage fluid (BALF) or lung tissue (after BALF removal and blood perfusion) were determined by ELISA (n = 3-5) (b) Morphology and Giemsa staining of cytopsin from broncho-alveolar lavages is shown. One representative picture for each group is shown (n = 5). (c) WT mice were i.n. treated twice (day -2 and day -1) with control or clodronate liposome (50 μ l) and tested for depletion specificity at day 0 by flow cytometry. Representative facs plots of the frequency of alveolar macrophages, neutrophils and interstitial macrophages in CD45⁺ pulmonary cells is shown. (d) WT mice were i.p. treated with isotype control or anti-TNF- α mAb 16 h prior to infection. Levels of proIL-1 β expression by alveolar and interstitial macrophages were analyzed by flow cytometry 12 h p.i.. Representative FACS plots of pro-cytokine expression are shown in the left panel. Absolute numbers of proIL-1 β ⁺ cells pooled from two experiments is represented in the lower panel (n = 6).

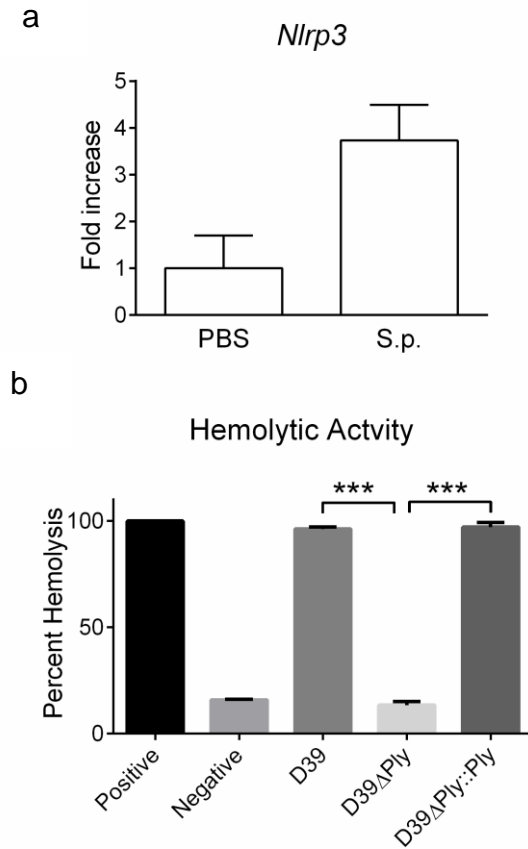


Figure S5: *Nlrp3* mRNA expression in lung neutrophils and hemolytic activity of D39 mutant strains. (a) FACS-sorted neutrophils from PBS or *S.p.*-infected mice (12 hp.i.) were analyzed by RT-qPCR for levels of *Nlrp3* mRNA transcripts normalized to housekeeping gene (*Gapdh*). (b) Hemolytic activities of D39 strains. Data represent a pool of three experiments performed in duplicate.

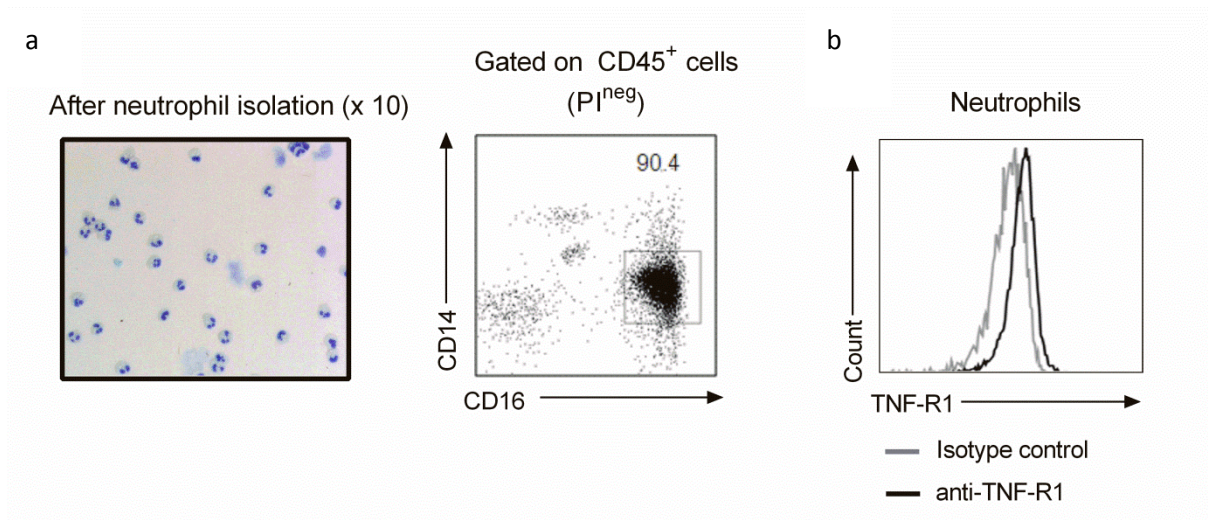


Figure S6: Purity and TNF-R1 surface expression of human neutrophils after isolation. **(a)** Analysis of human neutrophil purity using morphology-based or FACS analysis (CD16⁺ CD14^{low}). Data presented are representative of the nine donors. **(b)** Analysis of TNF-R1 expression on human neutrophils prior to *in vitro* culture. One representative histogram out of 9 donors is shown.

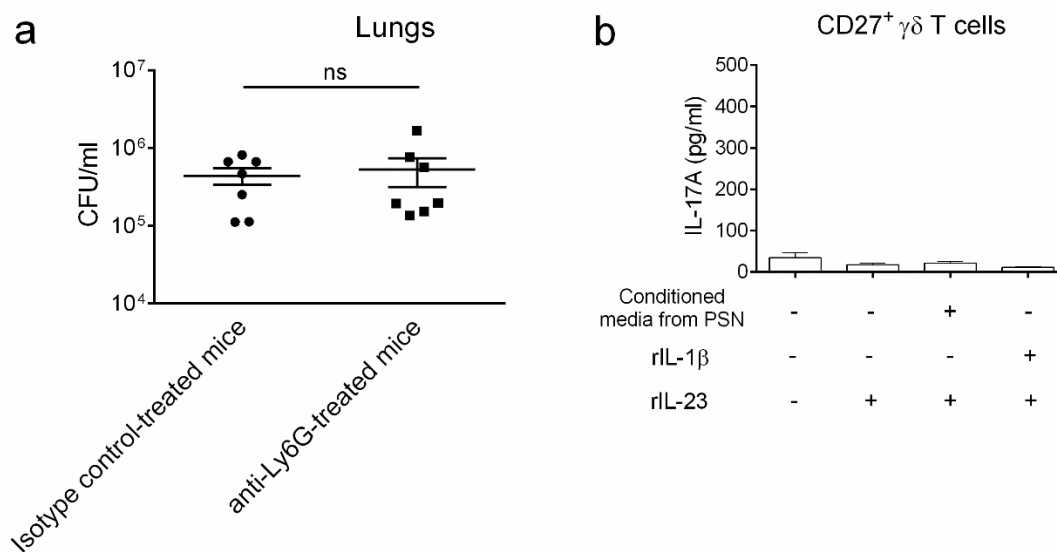


Figure S7: Neutrophil depletion does not modulate bacterial burden in the lungs during the early course of pneumococcal infection. (a) Bacterial colonies were counted in control and neutrophil-depleted mice 4 h p.i. post-pneumococcus infection. Individual replicates and means \pm SEM of CFU/ml from two experiments are shown (n = 7). (b) FACS-sorted pulmonary CD27⁺ $\gamma\delta$ T cells from naive mice were incubated at 37°C for 20 h with conditioned media from pneumococcus-sensitized neutrophils (PSN). In some conditions, rIL-1 β (1 ng/ml) and rIL-23 (1 ng/ml) were added to the culture. IL-17A in the supernatants were analysed by ELISA. The mean \pm SEM of IL-17A concentrations from three experiments (n = 3-5) is shown.

Populations	Markers
<i>Lymphoid compartment</i>	All CD45+
$\gamma\delta$ T cells	CD3+ TCR δ +
ILCs	Lin- CD90.2+ CD127+
NKT cells	PBS57/CD1d tetramer+ TCR β +
NK cells	CD3- NK1.1+
conventional T cells	PBS57/CD1d tetramer- TCR β +
<i>Myeloid compartment</i>	All CD45+
Neutrophils	CD11b+ Ly6G+
AMs	CD11b+ Siglec F+
Interstitial macrophages	CD11b+ F4/80+
conventional DCs	CD11c+ MHCII+ CD64-

Table 1: Gating strategies for cell population analyses.

IL-7 protects against respiratory pneumococcal infection by promoting innate IL-17A response

Maya Hassane^{1,2}, Daphnée Soulard¹, Bachar Ismail², Fouad Dabboussi², François Trottein¹ and Christophe Paget^{1*}

¹Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 - UMR 8204 - CIIL - Center for Infection and Immunity of Lille, F-59000 Lille, France.

²Laboratoire Microbiologie Santé et Environnement, Ecole doctorale en Sciences et Technologies/ Faculté de Santé Publique, Université Libanaise, Tripoli, Liban.

*Correspondence should be addressed to Christophe Paget (Mailing address: Institut Pasteur de Lille, CIIL, Team “Lung Infection and Innate Immunity”, 1 rue du Prof. Calmette, Lille Cedex, 59019, France; Email: christophe.paget@inserm.fr; Tel: +33 3 2087 7339).

Running title: IL-7 treatment stimulates IL-17A production by V γ 6V δ 1T cells

Keywords: IL-7, IL-17A, $\gamma\delta$ T cells, pneumococcal infection.

Abbreviations used: IL, interleukin; WT, wild-type; NKT, Natural Killer T; MAIT, Mucosal associated invariant T;

Abstract

IL-7 is a critical cytokine in the development and maturation of lymphocytes. Recent evidences suggest that IL-7 is a preferential homeostatic and survival factors in the periphery for ROR γ t⁺ innate-like T cells such natural killer T cells and $\gamma\delta$ T cells. Given the important contribution of these innate subsets and IL-17A in anti-bacterial mucosal immunity, we questioned whether IL-7 can be instrumental in boosting innate immune response against bacterial respiratory infection. Using a cytokine-monoclonal antibody approach, we illustrated a role for IL-7 in specifically increasing the pool of innate-like T cells with a Th17 phenotype. *In vitro* stimulation of lung leukocytes from IL-7-treated mice showed increase capacity to produce IL-17A compared to control mice. Prophylactic IL-7 complex treatment in *Streptococcus pneumoniae*-infected animals led to an increase in the absolute number of $\gamma\delta$ T17 cells but not NKT17 cells. This was accompanied with a decreased bacterial burdens and increased neutrophilia in infected mice. Thus our report brings as proof of principle that IL-7 could be used as a “biodrug” in the context of bacterial infection and may pave the way to the development of new cytokine-based prophylactic treatments during lung bacterial infection.

Introduction

Interleukin-7 (IL-7) is a pleiotropic cytokine produced by stromal cells especially in lymphoid tissues (Wiles et al., 1992). This cytokine is critical for B and T cell development in primary lymphoid organs and for regulating the proliferation of mature T cells in the periphery (Fry et al., 2005). The receptor of IL-7 is a heterodimer consisting of two chains: the α chain (CD127), which is shared with thymic stromal lymphopoietin (TSLP), and the common γ chain (γ c) (CD132) which mediates signalling via JAK-STAT pathways (Palmer et al., 2008).

Nowadays, several clinical studies have been registered worldwide, using recombinant human (rh) IL-7 treatment following bone marrow transplantation, as well as in patients presenting cancer, idiopathic CD4 lymphocytopenia, sepsis and chronic viral infections, like HIV and hepatitis B and C infections. The rhIL-7 treatment led essentially to an increase in CD4⁺ and CD8⁺ T cell numbers, ameliorating the status of the patient (Mackall et al., 2011). At the doses tested, the IL-7 treatment is rather well-tolerated by patients; the observed secondary effects being limited to fever, malaise, erythema, pain at the site of injection and an increase in the hepatic enzymes (Gao et al., 2015). However, no clinical studies based on IL-7 administration were applied in the context of bacterial infections.

Interestingly, IL-7 has been shown to be an important homeostatic factor in periphery for innate-like T subsets with high capacity to produce IL-17A including Natural Killer T (NKT) cells, mucosal-associated invariant T cells and $\gamma\delta$ T cells (Michel et al., 2012; Tang et al., 2013; Webster et al., 2014). This effect is at least due to the high density expression of IL-7 receptor on these subsets which allow them to uptake low levels of IL-7 found in non-lymphoid tissues. However, while it solely controls homeostatic parameters in NKT17 cells (Webster et al., 2014), IL-7 additionally modulates $\gamma\delta$ T cell's ability to produce IL-17A (Michel et al., 2012). Since we and

others have demonstrated that innate IL-17A produced by innate like T cells is important in anti-microbial host defense against pneumococcus (Cao et al., 2014; Hassane et al., under revision; Ivanov et al., 2012) via its capacity to regulate neutrophil recruitment (Kolls et al., 2010). Therefore, we hypothesized that a local prophylactic IL-7 treatment can protect mice against a model of pneumococcal pneumonia.

To enhance IL-7 activity, the cytokine can be administered in the form of cytokine/antibody complexes (IL-7/M25). This formulation allows a significant increase in the half-life (2 h vs 24 h) and the biological activity *in vivo* (50- to 100-fold) of IL-7 (Boyman et al., 2008).

Here, we demonstrate that intranasal administration of IL-7/M25 complex to naive mice increased the cellular pool of lung innate-like T immune cells presenting a Th17 phenotype with no detectable systemic effects. Moreover, using an invasive strain of *S. pneumoniae*, we demonstrate that IL-7 increases the absolute number of IL-17A⁺ $\gamma\delta$ T cells. Interestingly, this phenotype is accompanied by increased neutrophil recruitment and enhanced bacterial containment/elimination. Thus, we report a role for IL-7 in imprinting an IL-17-enriched microenvironment into the lungs that will facilitate the early host innate response to respiratory bacterial infection. This observation should be considered in the further development of new cytokine/cell-based future vaccines against respiratory bacterial pathogens such as *Streptococcus pneumoniae*.

Materials and Methods

Mice

8- to 10-week-old male wild-type C57BL/6J mice were purchased from Janvier (Le Genest-St-Isle, France). C57BL/6J ROR γ T-eGFP mice were bred in house at the Pasteur institute of Lille. Mice were bred under pathogen-free conditions. All animal work conformed to the French governmental, local (CEEA number 00357.01) and use committee guidelines.

Reagents and Abs

Monoclonal antibodies against mouse CD45 (APCCy7- or BV421 or AF700-conjugated), CD3 (Pacific Blue or PerCpCy5.5-conjugated), TCR δ (PerCpCy5.5-conjugated), TCR β (FITC- or V450-conjugated), NK1.1 (PeCy7- or PE- or PeCy7- or FITC-conjugated), Ly6G (APC-Cy7- or AF700- or FITC-conjugated), CD11b (PerCPCy5.5- or FITC-conjugated), Siglec F (BV421-conjugated), CD11c (FITC-conjugated), MHCII (FITC-conjugated), CD4 (PE- or efluor 450- or PerCPCy5.5-conjugated), CD127 (PeCy7-conjugated), CD90.2 (AF700- or BV510-conjugated), CD19(APC- or FITC-conjugated), Gr-1(FITC-conjugated), CD27 (PeCy7-conjugated), IL-17A (PE-conjugated), IL-22 (APC-conjugated) and appropriated isotype controls were purchased from BioLegend, BD Pharmingen and eBioscience. PBS-57 glycolipid-loaded and unloaded control CD1d tetramers (APC- or PE-conjugated) were from the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Tetramer Facility (Emory University, Atlanta, GA). Recombinant mouse IL-7 was purchased from eBioscience. Anti-IL-7 monoclonal antibody (clone M25) was purchased from Bio X Cell. Mouse ELISA kits are from R&D systems and eBioscience.

Infection with S. pneumoniae

S. pneumoniae serotype 1 clinical isolate E1586 sequence type ST304 has been described elsewhere (Munoz et al., 2010). Mice were anesthetized and administered i.n. with 50 µl of PBS containing live bacteria.

Preparation of pulmonary immune cells

Mice were treated each other day with 3 doses of IL-7 (400 ng/mouse)/M25 (2 µg/mouse) complex (i.n.) and then infected or not with *S. pneumoniae*. Lung mononuclear cells (MNCs) were prepared by classical procedures. Briefly, lungs were perfused with PBS 2% FCS, excised and finely minced, followed by enzymatic digestion for 20 min at 37°C in PBS containing 1 mg/ml collagenase type VIII (Sigma-Aldrich) and 1 µg/ml DNase type I (Roche). After wash, lung homogenates were resuspended in a 20% Percoll™ gradient, and centrifuged at 2000 rpm without brake at RT for 15 min. The pellet was washed in PBS 2% FCS and red blood cells were removed using lysis buffer (Sigma-Aldrich).

In vitro assays

Lungs were harvested from naïve mice and cell suspensions were prepared as previously described. Leukocytes were cultured 20 h in complete media containing PMA (100 ng/ml) and ionomycin (1 µg/ml).

Intracellular FACS staining

Lungs were harvested 12 hours after the infection and MNCs were prepared as described above. Cells were incubated in RPMI 1640 5% FCS containing Golgi Plug/Golgi Stop (BD Biosciences)

for 2 h at 37°C. Then, cells were washed with appropriate dilutions of the different antibodies for 30 min in PBS 2% FCS. Cells were washed, and fixed using IC Fixation Buffer (eBioscience, CliniSciences, Montrouge, France). Fixed cells were then permeabilized in Permeabilization Buffer (eBioscience), according to the manufacturer's instructions. Cells were stained with PE-conjugated mAb against IL-17A or APC-conjugated mAb against IL-22 and analyzed on a LSR Fortessa (BD Biosciences). FACS analyses were performed using the FlowJo software (Treestar, OR USA).

Statistical analysis

All statistical analysis was performed using GraphPad Prism software. The statistical significance was evaluated using non-parametric Mann-Whitney U tests to compare the means of biological replicates in each experimental group. Survival rates after *S. pneumoniae* challenge were analyzed using a log-rank test. Results with a P value of less than 0.05 were considered significant. ns: not significant; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

Results

IL-7/M25 complex increased the local pool of innate-like T cells with Th17-like phenotype.

To investigate its effects on lung innate immune response, we treated naive mice with IL-7/M25 by i.n. route. After a week of treatment, we assessed the frequency and absolute number of immune populations by FACS. IL-7/M25 treatment did not affect the adaptive compartment including CD4⁺ and CD8⁺ T cells, or B cells (data not shown). In contrast, this treatment induced a significant increase in CD27⁻ $\gamma\delta$ T cells (Fig. 1A, left panel), a population with specific ability to produce IL-17A (Ribot et al., 2009). On the other hand, CD27⁺ $\gamma\delta$ T cells which predominantly produced IFN- γ were not affected by this treatment (Fig. 1A, left panel). Moreover, V γ 6V δ 1⁺ T cells have been recognized as main IL-17 producers within the lung $\gamma\delta$ T compartment (Paget et al., 2015; Roarck et al., 2004). Interestingly, i.n. IL-7 treatment increased the local pool of V γ 6V δ 1⁺ T cells (Fig. 1A, right panel). IL-7/M25 complex treatment also led to a significant increase in NKT cell frequency (Fig. 1B, left panel), an effect mainly explained by an increase of the IL-17A-producing NK1.1⁻ NKT cell subset (Michel et al., 2007) (Fig. 1B, right panel). To confirm our observations, we have used ROR γ c reporter mice, a mandatory transcription factor for IL-17 production (Ivanov II et al., 2006). Expression of ROR γ t was not modulated in the cellular population tested except for $\gamma\delta$ T and NKT cells (Supplementary Fig. 1). It is noteworthy that no modulation of $\gamma\delta$ T nor NKT cell frequencies was observed in the spleen of IL-7/M25-treated mice in comparison with control mice (Fig. 1C). Altogether, intranasal administration of IL-7 leads to a local increase in $\gamma\delta$ T and NKT cells presenting a Th17-like phenotype.

IL-7 treatment increased the capacity of lung leukocytes to produce IL-17A.

In attempt to link these descriptive observations with a biological phenotype, lung leukocytes from control or IL-7-treated mice were stimulated *ex vivo*. Although no differences were observed in IFN- γ release in both groups (Fig. 2A, right panel), the levels of IL-17A detected were significantly increased in the lung cells from IL-7 treated mice (Fig. 2A, left panel). Of note, we failed to detect any modulation in the cytokine production of stimulated spleen cells obtained from the two groups confirming the local effect of this treatment (Fig. 2B).

In order to determine the cellular sources responsible for this increased IL-17 production, we i.n. treated control, $\gamma\delta$ T cell-deficient (*Tcr δ ^{-/-}*) and type I NKT cell-deficient (*J α 1 δ ^{-/-}*) mice with IL-7 prior *ex vivo* stimulation. Interestingly, $\gamma\delta$ T cell and NKT cell deficiencies strongly reduced IL-17A production in PBS-treated mice (Fig. 2C). Moreover, IL-7 effect on IL-17A production was almost abolished in *Tcr δ ^{-/-}* mice while NKT cell deficiency only slightly affected its biological activity (Fig. 2C). Collectively, our data suggest that IL-7 effects on IL-17A biology are predominantly due to lung $\gamma\delta$ T cells.

IL-7 complex treatment increased IL-17A production by V γ 6V δ 1⁺ T cells following pneumococcal infection.

We have previously shown that IL-17A was essential for bacterial containment and mice survival during pneumococcal infection (Hassane et al., under revision). Moreover, we highlighted $\gamma\delta$ T cells especially the V γ 6V δ 1⁺ subset as the main and earlier producers of IL-17A in this model (Hassane et al., under revision; Paget et al., 2015). For this reason, we assessed the effects of IL-7 in boosting the host innate immune response to pneumococcal infection. Using intracellular cytokine staining, we observed an increase in absolute number of IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells in IL-

7-pretreated mice (Fig. 3A). In contrast, we failed to observe an effect on IL-17A-producing NKT cells (Fig. 3B). Moreover, IL-7 treatment increased the intrinsic capacity of V γ 6V δ 1⁺ $\gamma\delta$ T to produce IL-17A but not non-V γ 6V δ 1⁺ $\gamma\delta$ T neither NKT cells as judged by intracellular staining (Fig. 3C). Thus, our results indicate that IL-7 pre-treatment induce both homeostatic and functional modulation in the pool of IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells.

IL-7 treatment increases pneumococcus-induced neutrophilia and bacterial containment but has no effect on survival.

Since IL-17A-producing $\gamma\delta$ T cells are important in the host response against pneumococcal pneumonia (Cao et al., 2014; Hassane et al., 2016; Wilson et al., 2015), we have assessed pathological parameters in IL-7-treated mice. IL-7 treatment efficiently controlled bacterial burden in the lungs as well as bacterial dissemination (Fig. 4A). Neutrophils play an important role in the control of the bacterial load during *S. pneumonia* infection (Mizgerd et al., 2008). Interestingly, bacterial containment in treated animals was accompanied by a significant increase in neutrophil recruitment (Fig. 4B). Surprisingly, despite control of bacterial burdens in treated mice, we detected no improvement of mice survival (Fig. 4C). Taken together, IL-7 prophylactic treatment allows increase in neutrophilia and bacterial containment but does not positively impact on survival.

Discussion

Interleukin-7 has been clinically used in several contexts including cancer, chronic viral infections, bone marrow transplantation and sepsis. IL-7-dependent proliferation of T lymphocytes was observed and associated with encouraging effect on the health status of the patients. However, little is known about the therapeutic effect of IL-7 during bacterial infections. Nevertheless, some pre-clinical studies have highlighted the potential utility of IL-7 to improve outcomes during i.v. *Mycobacterium tuberculosis* infection (Maeurer et al., 2000). Repeated rIL-7 application in infected mice led to an improvement of their survival without effects on granuloma formation or bacterial burdens (Maeurer et al., 2000). Additionally, endogenous IL-7 was demonstrated critical for the protection against oral *Citrobacter rodentium* infection (Zhang et al., 2015). Elaborately, IL-7R α blockade led to an increase in bacterial loads and colon inflammation, associated with a decrease in mice survival (Zhang et al., 2015).

Here, we report here that prophylactic i.n. IL-7 treatment controlled bacterial growth and systemic dissemination during respiratory *S. pneumoniae* infection, an effect associated with higher neutrophilia in treated animals. In line with (Michel et al., 2012; Webster et al., 2014), IL-7 treatment allowed increase in the pool of innate IL-17 producers. Moreover, our results suggest that $\gamma\delta$ T cells especially the V γ 6V δ 1⁺ subset are likely to be responsible for this increased cytokine production. Since we and others have recently described the critical role of $\gamma\delta$ T17 cells especially V γ 6V δ 1⁺ subset in the control of pneumococcal pneumonia (Cao et al., 2014; Hassane et al., under revision; Paget et al., 2015; Wilson et al., 2015), we can reasonably speculate that these cells are responsible for the protective effect of IL-7. However further *in vivo* experiments in transgenic models lacking IL-17A and/or $\gamma\delta$ T cells will be required to confirm our hypothesis. It is noteworthy that the Caldwell laboratory reported that IL-7 administration in an experimental

model of sepsis increased in a $\gamma\delta$ T cell-dependent manner IL-17 levels (Kasten et al., 2010; Tschop et al., 2008). Moreover, this was accompanied with a reduced bacterial burdens and increased neutrophils recruitment (Kasten et al., 2010). More recently, i.v. administration of recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing an immunodominant *M. tuberculosis*-specific Ag (Ag85B) in combination with IL7 (Ag85-IL-7 fusion protein) has been shown to increase Ag-specific CD8⁺ T cells in the lungs in a $\gamma\delta$ T17 cell-dependent manner (Hatano et al., 2016).

As previously shown, we confirmed that local administration of IL-7 induced a preferential expansion of both lung $\gamma\delta$ T17 and NKT17 cells (Michel et al., 2012; Webster et al., 2014). However, our *in vitro* experiments indicated that $\gamma\delta$ T cells were mainly responsible for this increase IL-17A production. In this context, it is likely that $\gamma\delta$ T17 cells and NKT17 cells compete during infection for activating cytokines (*e.g.* IL-1 β and IL-23). Therefore, the high density expression of IL-1R1 and IL-23R on resting V γ 6V δ 1⁺ T cells (Paget et al., 2015) provides them an undeniable benefit over NKT cells to efficiently uptake activating cytokines. It is also possible that during infection, IL-7 itself can directly trigger $\gamma\delta$ T17 cells to enhance their capacity to produce IL-17A as recently proposed (Michel et al., 2012).

Despite strong reduction in bacterial growth and dissemination, we unfortunately failed to enhance survival in IL-7-treated mice during lethal pneumococcal pneumonia. However, it is clear that during experimental bacterial or viral pneumonia, animals do not solely die from bacterial dissemination and therefore lung inflammation has to be highly considered. In this study, we did not perform histological analyses to compare the lung inflammatory status in control vs IL-7-treated infected mice. However, although IFN- γ levels remained unchanged, we consistently observed an increase in IL-13 production following *ex vivo* stimulation of lung leukocytes isolated from IL-7-treated mice (not shown). Not surprisingly, this was associated with a significant lung

eosinophilia compared to control animals (not shown). Of note, human eosinophils were shown to express a functional IL-7R α and to respond to rhIL-7 by CD69 upregulation (Kelly et al., 2009). Further studies will be required to understand whether IL-7 treatment can be used as a sole therapeutic agent or rather in combination with immunomodulatory drugs to circumvent exacerbated inflammation.

Indeed, IL-7 treatment has been shown to induce side effects which can be a major drawback to its use in clinics. For instance, systemic administration of IL-7 in macaques presenting refractory cancer led to an increase of CD4⁺ and CD8⁺ conventional T cells but was associated with splenomegaly and adenopathy (Beq et al., 2009). However, IL-7/M25 complex administration by i.n. route seems to have local effects in the lungs with no obvious systemic side effects. The use of this formulation also allows for smaller quantities of rIL-7 injected although the biological activity is increased. Indeed, IL-7/anti-IL-7 complex induces a stronger and more prolonged intracellular signalling through IL-7R, an effect dependent on the Fc domain of the IgG (Bergtold et al., 2005). This fraction shows unique pharmacokinetic properties conferring a positive effect on the cytokine activity (Bergtold et al., 2005). The neonatal Fc receptor (FcRn) has been shown to play a substantial role in the activity of this kind of complex. This receptor fixes the complex in the endosomes and increases its half-life *in vivo* by preventing its degradation (Roopenain et al., 2007). The expression of FcRn is essential to preserve M25 half-life and the efficacy of IL-7/M25 complex. Another approach using a fusion protein between IL-7 and the Fc region of M25 also increased the half-life in comparison with IL-7 alone but remains less efficient than the IL-7/M25 complex (Martin et al., 2013) suggesting the existence an additional mechanism independent of FcRn-Fc interaction. The use of FcRn-deficient mice will be informative to understand the mechanisms underlying IL-7 activity in host response to respiratory pneumococcal infection.

In conclusion, despite a better understanding of its action mechanisms is required, we demonstrate that IL-7/M25 treatment confers a beneficial effect on the host to contain bacterial growth and dissemination during pneumococcus-induced pneumonia. Given the “double-edged sword” nature of IL-17, our report should encourage the design of prophylactic or therapeutic strategies to target IL-7 biology (rIL-7 or neutralizing antibody) in other pathological situations including inflammatory disorders such as chronic obstructive pulmonary disease as well as in other relevant respiratory bacterial infections.

References

1. Beq, S., S. Rozlan, D. Gautier, R. Parker, V. Mersseman, C. Schilte, B. Assouline, I. Rance, P. Lavedan, M. Morre, and R. Cheynier. 2009. Injection of glycosylated recombinant simian IL-7 provokes rapid and massive T-cell homing in rhesus macaques. *Blood* 114:816-825.
2. Bergtold, A., D. D. Desai, A. Gavhane, and R. Clynes. 2005. Cell surface recycling of internalized antigen permits dendritic cell priming of B cells. *Immunity* 23:503-514.
3. Boyman, O., C. Ramsey, D. M. Kim, J. Sprent, and C. D. Surh. 2008. IL-7/anti-IL-7 mAb complexes restore T cell development and induce homeostatic T Cell expansion without lymphopenia. *J Immunol* 180:7265-7275.
4. Cao, J., D. Wang, F. Xu, Y. Gong, H. Wang, Z. Song, D. Li, H. Zhang, D. Li, L. Zhang, Y. Xia, H. Xu, X. Lai, S. Lin, X. Zhang, G. Ren, Y. Dai, and Y. Yin. 2014. Activation of IL-27 signalling promotes development of postinfluenza pneumococcal pneumonia. *EMBO molecular medicine* 6:120-140.
5. Fry, T. J., and C. L. Mackall. 2005. The many faces of IL-7: from lymphopoiesis to peripheral T cell maintenance. *J Immunol* 174:6571-6576.
6. Gao, J., L. Zhao, Y. Y. Wan, and B. Zhu. 2015. Mechanism of Action of IL-7 and Its Potential Applications and Limitations in Cancer Immunotherapy. *Int J MolSci* 16:10267-10280.
7. Hatano, S., T. Tamura, M. Umemura, G. Matsuzaki, N. Ohara, and Y. Yoshikai. 2016. Recombinant Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin expressing Ag85B-IL-7 fusion protein enhances IL-17A-producing innate gammadelta T cells. *Vaccine* 34:2490-2495.
8. Ivanov, II, B. S. McKenzie, L. Zhou, C. E. Tadokoro, A. Lepelley, J. J. Lafaille, D. J. Cua, and D. R. Littman. 2006. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 126:1121-1133.
9. Ivanov, S., J. Fontaine, C. Paget, E. Macho Fernandez, L. Van Maele, J. Renneson, I. Maillet, N. M. Wolf, A. Rial, H. Leger, B. Ryffel, B. Frisch, J. A. Chabalgoity, J. C. Sirard, A. Benecke, C. Faveeuw, and F. Trottein. 2012. Key role for respiratory CD103(+) dendritic cells, IFN-gamma, and IL-17 in protection against Streptococcus pneumoniae infection in response to alpha-galactosylceramide. *The Journal of infectious diseases* 206:723-734.
10. Kasten, K. R., P. S. Prakash, J. Unsinger, H. S. Goetzman, L. G. England, C. M. Cave, A. P. Seitz, C. N. Mazuski, T. T. Zhou, M. Morre, R. S. Hotchkiss, D. A. Hildeman, and C. C. Caldwell. 2010. Interleukin-7 (IL-7) treatment accelerates neutrophil recruitment through gamma delta T-cell IL-17 production in a murine model of sepsis. *Infect Immun* 78:4714-4722.
11. Kelly, E. A., C. J. Koziol-White, K. J. Clay, L. Y. Liu, M. E. Bates, P. J. Bertics, and N. N. Jarjour. 2009. Potential contribution of IL-7 to allergen-induced eosinophilic airway inflammation in asthma. *J Immunol* 182:1404-1410.
12. Kolls, J. K., and S. A. Khader. 2010. The role of Th17 cytokines in primary mucosal immunity. *Cytokine Growth Factor Rev* 21:443-448.
13. Mackall, C. L., T. J. Fry, and R. E. Gress. 2011. Harnessing the biology of IL-7 for therapeutic application. *Nat Rev Immunol* 11:330-342.
14. Maeurer, M. J., P. Trinder, G. Hommel, W. Walter, K. Freitag, D. Atkins, and S. Storkel. 2000. Interleukin-7 or interleukin-15 enhances survival of Mycobacterium tuberculosis-infected mice. *Infect Immun* 68:2962-2970.
15. Martin, C. E., E. M. van Leeuwen, S. J. Im, D. C. Roopenian, Y. C. Sung, and C. D. Surh. 2013. IL-7/anti-IL-7 mAb complexes augment cytokine potency in mice through association with IgG-Fc and by competition with IL-7R. *Blood* 121:4484-4492.
16. Michel, M. L., A. C. Keller, C. Paget, M. Fujio, F. Trottein, P. B. Savage, C. H. Wong, E. Schneider, M. Dy, and M. C. Leite-de-Moraes. 2007. Identification of an IL-17-producing NK1.1(neg) iNKT cell population involved in airway neutrophilia. *J Exp Med* 204:995-1001.

17. Michel, M. L., D. J. Pang, S. F. Haque, A. J. Potocnik, D. J. Pennington, and A. C. Hayday. 2012. Interleukin 7 (IL-7) selectively promotes mouse and human IL-17-producing gammadelta cells. *Proc Natl AcadSci U S A*109:17549-17554.
18. Mizgerd, J. P. 2008. Acute lower respiratory tract infection. *The New England journal of medicine* 358:716-727.
19. Paget, C., M. T. Chow, N. A. Gherardin, P. A. Beavis, A. P. Uldrich, H. Duret, M. Hassane, F. Souza-Fonseca-Guimaraes, D. A. Mogilenko, D. Staumont-Salle, N. K. Escalante, G. R. Hill, P. Neeson, D. S. Ritchie, D. Dombrowicz, T. Mallewaey, F. Trottein, G. T. Belz, D. I. Godfrey, and M. J. Smyth. 2015. CD3bright signals on gammadelta T cells identify IL-17A-producing Vgamma6Vdelta1+ T cells. *Immunology and cell biology* 93:198-212.
20. Palmer, M. J., V. S. Mahajan, L. C. Trajman, D. J. Irvine, D. A. Lauffenburger, and J. Chen. 2008. Interleukin-7 receptor signaling network: an integrated systems perspective. *Cell MolImmunol*5:79-89.
21. Ribot, J. C., A. deBarros, D. J. Pang, J. F. Neves, V. Peperzak, S. J. Roberts, M. Girardi, J. Borst, A. C. Hayday, D. J. Pennington, and B. Silva-Santos. 2009. CD27 is a thymic determinant of the balance between interferon-gamma- and interleukin 17-producing gammadelta T cell subsets. *Nat Immunol*10:427-436.
22. Roark, C. L., M. K. Aydintug, J. Lewis, X. Yin, M. Lahn, Y. S. Hahn, W. K. Born, R. E. Tigelaar, and R. L. O'Brien. 2004. Subset-specific, uniform activation among V gamma 6/V delta 1+ gamma delta T cells elicited by inflammation. *Journal of leukocyte biology* 75:68-75.
23. Roopenian, D. C., and S. Akilesh. 2007. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nature reviews* 7:715-725.
24. Tang, X. Z., J. Jo, A. T. Tan, E. Sandalova, A. Chia, K. C. Tan, K. H. Lee, A. J. Gehring, G. De Libero, and A. Bertoletti. 2013. IL-7 licenses activation of human liver intrasinusoidal mucosal-associated invariant T cells. *J Immunol*190:3142-3152.
25. Tschop, J., A. Martignoni, H. S. Goetzman, L. G. Choi, Q. Wang, J. G. Noel, C. K. Ogle, T. A. Pritts, J. A. Johannigman, A. B. Lentsch, and C. C. Caldwell. 2008. Gammadelta T cells mitigate the organ injury and mortality of sepsis. *Journal of leukocyte biology* 83:581-588.
26. Webster, K. E., H. O. Kim, K. Kyparissoudis, T. M. Corpuz, G. V. Pinget, A. P. Uldrich, R. Brink, G. T. Belz, J. H. Cho, D. I. Godfrey, and J. Sprent. 2014. IL-17-producing NKT cells depend exclusively on IL-7 for homeostasis and survival. *Mucosal Immunol*7:1058-1067.
27. Wiles, M. V., P. Ruiz, and B. A. Imhof. 1992. Interleukin-7 expression during mouse thymus development. *Eur J Immunol*22:1037-1042.
28. Wilson, R., J. M. Cohen, R. J. Jose, C. de Vogel, H. Baxendale, and J. S. Brown. 2015. Protection against *Streptococcus pneumoniae* lung infection after nasopharyngeal colonization requires both humoral and cellular immune responses. *Mucosal immunology* 8:627-639.
29. Zhang, W., J. Y. Du, Q. Yu, and J. O. Jin. 2015. Interleukin-7 produced by intestinal epithelial cells in response to *Citrobacter rodentium* infection plays a major role in innate immunity against this pathogen. *Infect Immun*83:3213-3223.

Figure legends

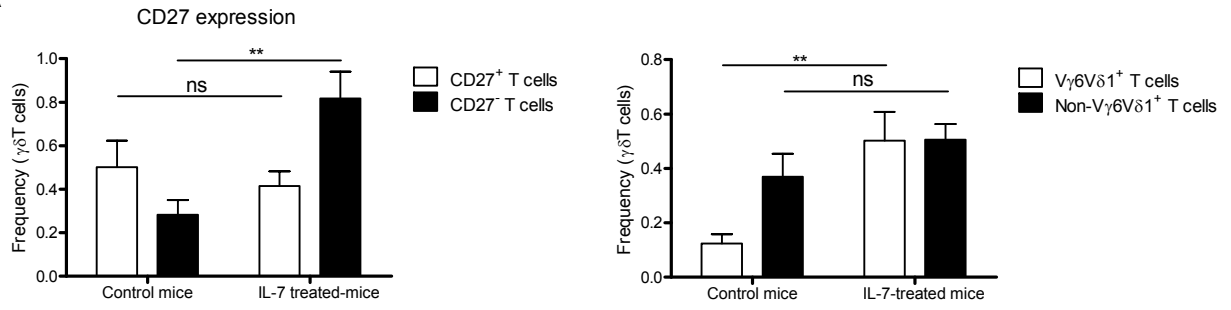
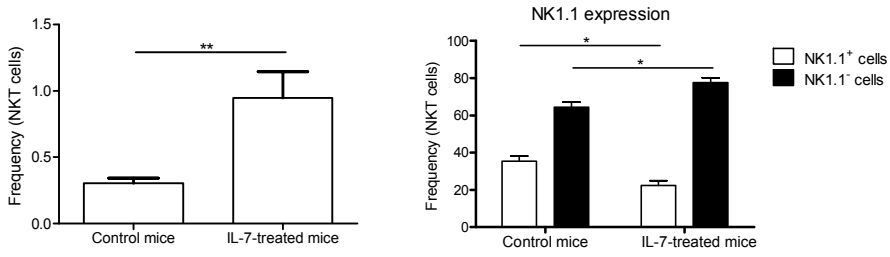
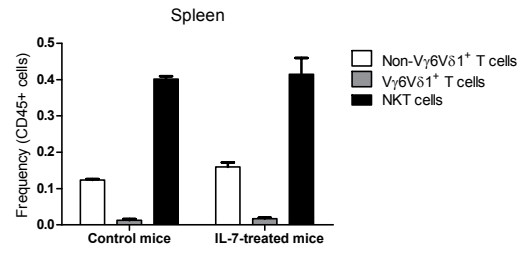
Figure 1: IL-7 treatment increases the Th-17-like cellular pool. WT C57BL/6 mice were treated or not with 3 doses of IL-7/M25 complex every other day, and one day after the last shot, mice were sacrificed and cells were assessed by FACS. *A*, Frequencies of CD27⁻ and CD27⁺ $\gamma\delta$ T cells were analysed by flow cytometry (left panel) and pulmonary V γ 6V δ 1 and non-V γ 6V δ 1 T cells frequencies are shown (right panel). *B*, NKT cells (left panel) and NK1.1-negative and positive populations (right panel) frequencies are shown. *C*, $\gamma\delta$ T and NKT cells frequencies were analysed in the spleen. The mean \pm SEM of 4 independent (ind.) experiments (n = 4-5) is shown. *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001.

Figure 2: IL-7 treatment increases leukocytes' IL-17A production *ex vivo*. Mice were treated or not with IL-7/M25 complex and leukocytes were then stimulated or not *ex vivo* with PMA/Ionomycin for 20 h. *A* and *B*, IL-17A (left panel) and IFN- γ (right panel) levels from the supernatants of incubated pulmonary (*A*) and splenic (*B*) cells were measured by ELISA. The mean \pm SEM of 2 ind. experiments (n = 4-5) is shown. *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001. *C*, IL-17A levels were measured by ELISA following *ex vivo* stimulation of pulmonary leukocytes from WT, TCR δ ^{-/-} and J α 18^{-/-} mice with PMA/ionomycin. One ind. experiment (n = 4-5) is shown. Ns, not significant; *, P < 0.05.

Figure 3: IL-7 treatment induces IL-17A production by V γ 6V δ 1⁺T cells following *S. pneumoniae* infection. *S.p.*-infected mice were treated or not with IL-7/M25 complex and pulmonary cells were assessed by FACS 12 h post-infection (p.i.). *A*, FACS plots of IL-17 production by $\gamma\delta$ T cells (left panel) and absolute number of IL-17A-positive $\gamma\delta$ T cells (right panel) were shown. *B*, FACS plots of IL-17 production by NKT cells (left panel) and absolute number of IL-17A-positive NKT cells (right panel) were shown. *C*, Frequency of IL-17-producing Non-V γ 6V δ 1⁺T (left panel), V γ 6V δ 1⁺T (middle panel) and NKT (right panel) cells were analyzed by flow cytometry. The mean \pm SEM of 3 ind. experiments (n = 4-5) is shown. *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001.

Figure 4: IL-7 treatment increases bacterial containment and neutrophilia. *A*, IL-7-treated or control mice were challenged with *S.p.* and the number of CFU was determined 60 h p.i. in the lungs (left panel) and in the spleen (right panel). Individual counts of 2 ind. experiments (n = 7-10) are shown. *B*, Frequency of pulmonary neutrophils from *S.p.*-infected mice was assessed by FACS 12 h p.i. in control and IL-7-treated mice. The mean \pm SEM of 3 ind. experiments are shown (n = 4-5). *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001. *C*, Control and IL-7-treated mice were infected with *S.p.* (5×10^5 CFU) and monitored daily for survival.

Supplementary Figure 1: Frequency of ROR γ t-positive $\gamma\delta$ T and NKT cells was analyzed by flow cytometry. One ind. experiment (n = 4-5) is shown.

A**B****C****Figure 1**

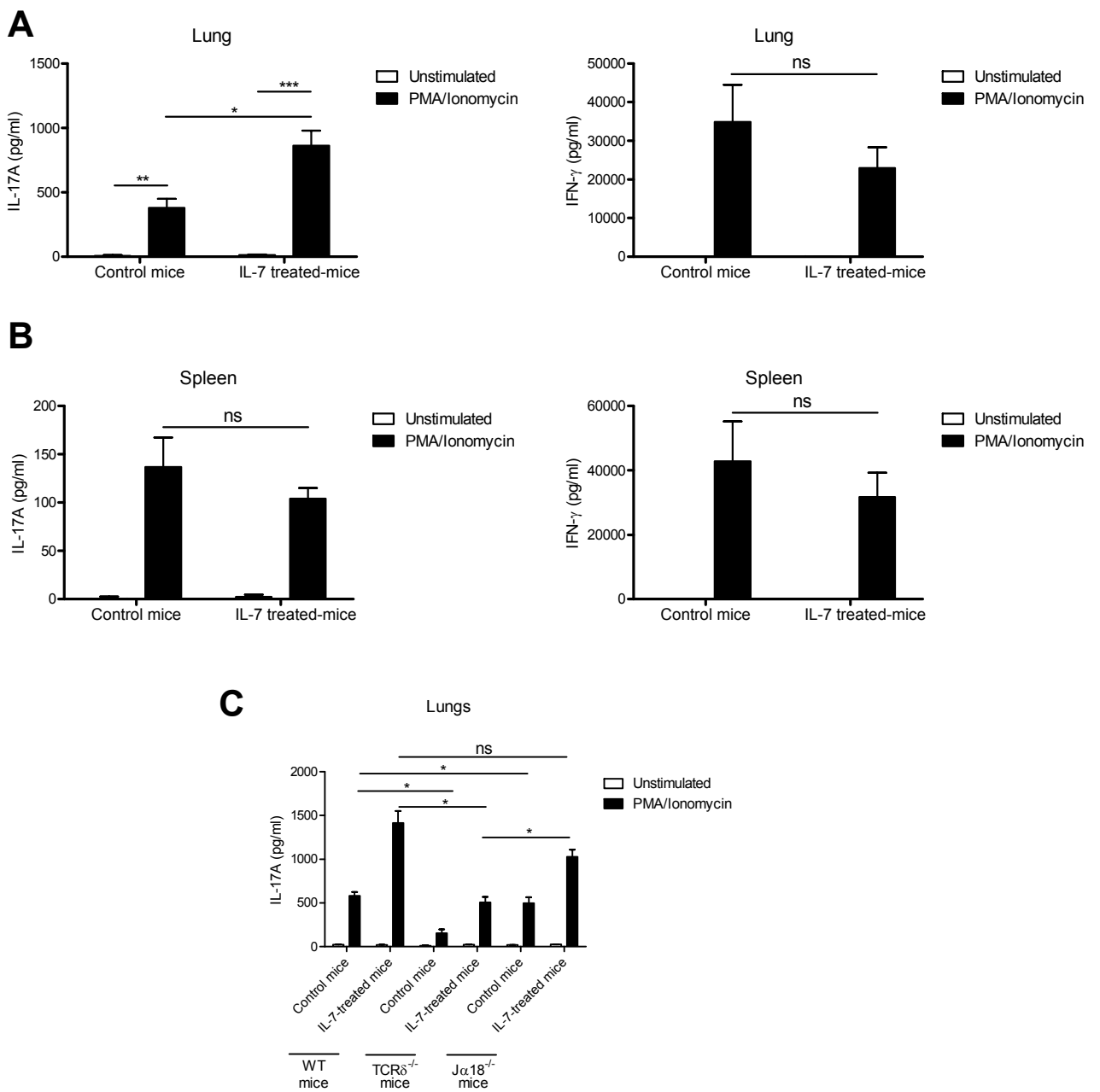
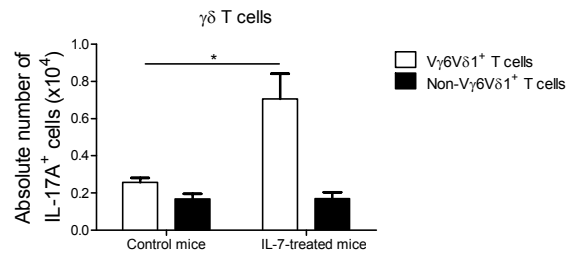
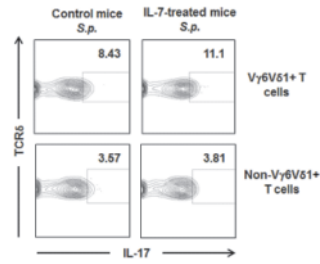
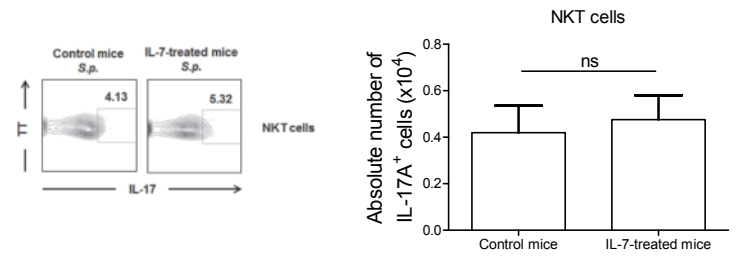
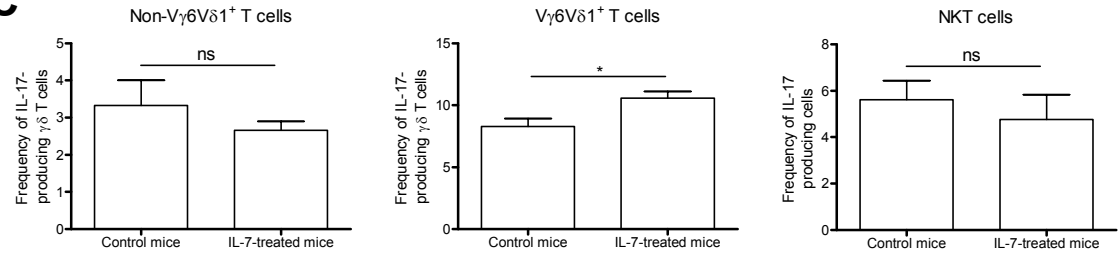
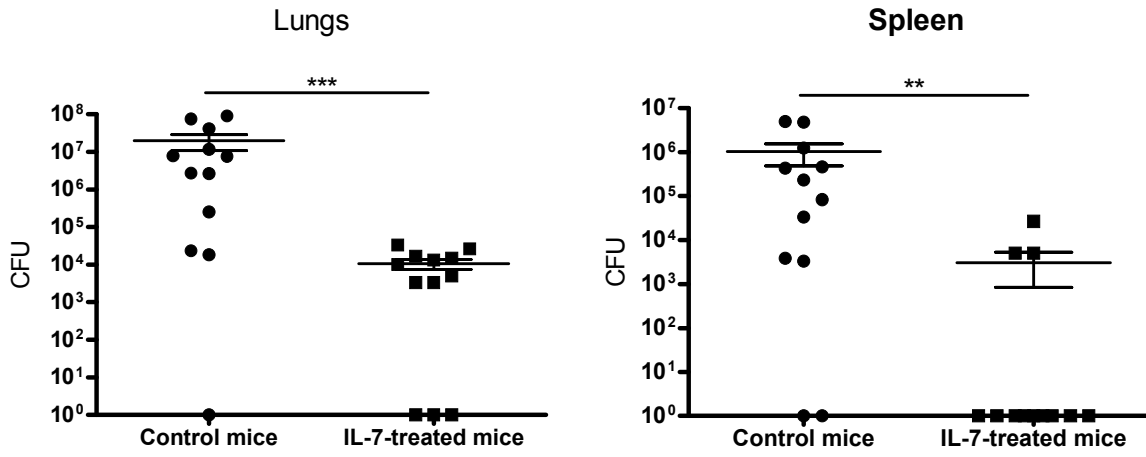
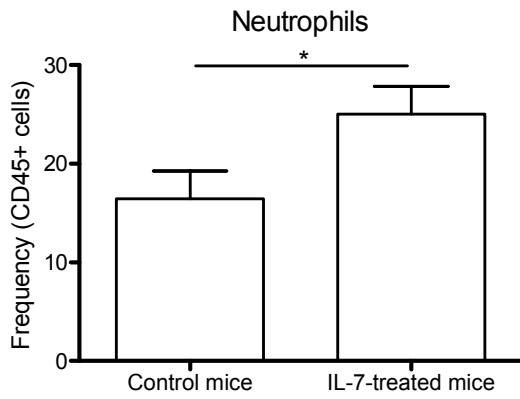
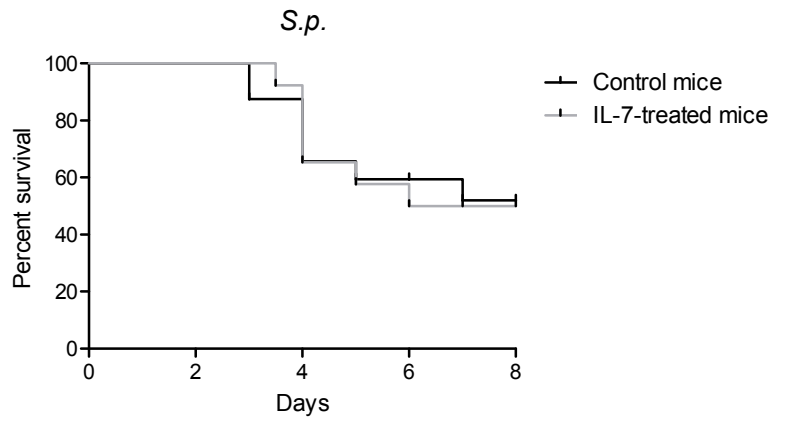
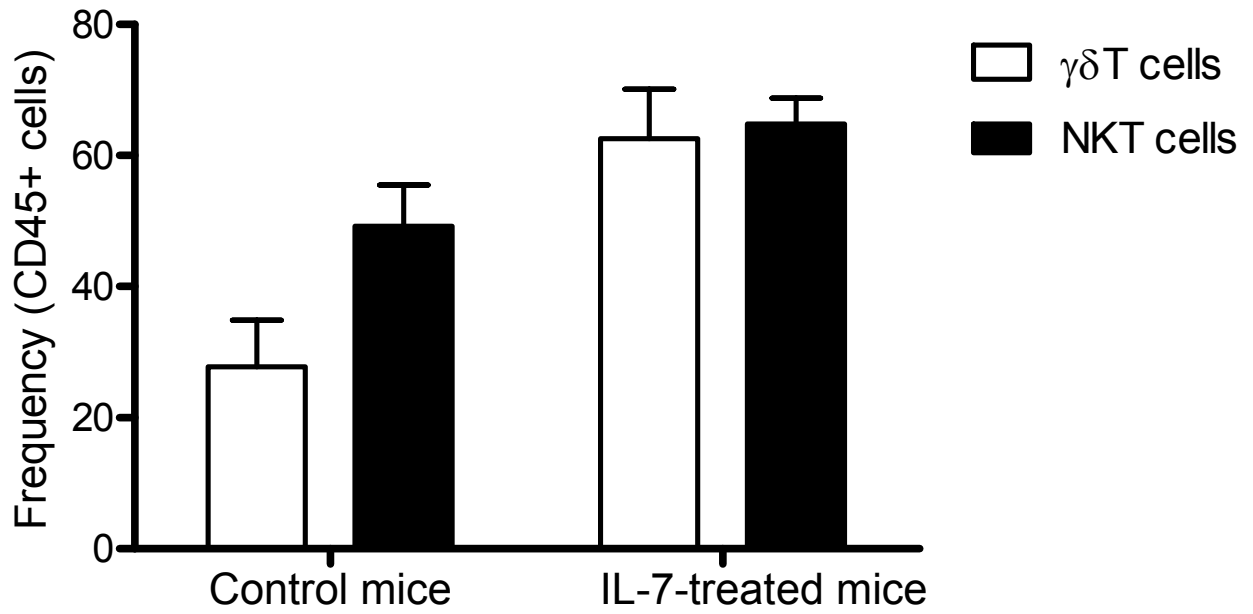


Figure 2

A**B****C****Figure 3**

A**B****C****Figure 4**

ROR γ t⁺ cells



Supplementary Figure 1