UNIVERSITÉ DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE :

SANTE, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE DU VIVANT

Centre d'Etude des Pathologies Respiratoires

INSERM U1100

THÈSE présentée par :

Florent CREUSAT

soutenue le : **17 décembre 2019**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Tours**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la vie et de la santé

Etude et origine des neutrophiles régulateurs dans l'infection pulmonaire

THÈSE dirigée par :

Dr PAGET Christophe	HDR, Chargé de Recherche, INSERM U1100

RAPPORTEURS :

Dr WITKO-SARSAT Véronique	HDR, Directeur de Recherche, INSERM U1016
Dr LE GOFFIC Ronan	HDR, Chargé de Recherche, INRA UR0892

JURY :

Pr DIMIER-POISSON Isabelle	HDR, Professeur, Université de Tours
Dr WITKO-SARSAT Véronique	HDR, Directeur de Recherche, INSERM U1016
Dr LE GOFFIC Ronan	HDR, Chargé de Recherche, INRA UR0892
Dr FAVEEUW Christelle	HDR, Chargé de Recherche, INSERM U1019
Dr SI-TAHAR Mustapha	HDR, Directeur de Recherche, INSERM U1100
Dr PAGET Christophe	HDR, Chargé de Recherche, INSERM U1100

Remerciements

Aux membres du jury

Je tiens en premier lieu à remercier l'ensemble des membres du jury et en particulier le Professeur Isabelle Dimier-Poisson pour avoir accepté d'être la présidente de mon jury de thèse.
Je remercie également le Docteur Ronan Le Goffic et le Docteur Véronique Witko-Sarsat d'avoir accepté d'être les rapporteurs de travail de thèse.
Je tiens également à remercier le Docteur Christelle Faveeuw pour notre collaboration sur ce projet et pour avoir accepté d'en être l'examinatrice.

Aux différents collaborateurs

Je remercie le Docteur Thierry Mallevaey, le Docteur François Trottein et leurs équipes respectives pour leur contribution et pour avoir permis l'avancement de ce projet.

A Mustapha Si-Tahar

Je te remercie de m'avoir accueilli au sein du CEPR. Tu m'auras vu évoluer tout au long de ces trois années, depuis mon oral pour la bourse jusqu'à ma soutenance de thèse en étant examinateur. Je te remercie aussi pour ta disponibilité et nos entrevues qui ont toujours été enrichissantes.

A Christophe Paget

Je vais essayer de rester concis, merci Christophe pour ces trois années passées passées au CEPR. Tu m'as permis de m'épanouir dans ce travail et prendre confiance en moi même si, il faut le dire, nous avons bien galéré à mettre en place notre modèle d'étude. Je tiens aussi à te remercier pour ta gentillesse et ta disponibilité, et je sais que j'ai eu beaucoup de chance de t'avoir comme directeur de thèse.

A Youenn Jouan

Que puis-je te dire à part te remercier pour toutes ces journées de manips à rester tard pour passer nos plaques, à revenir dans la nuit pour vérifier que tout allait bien et faire le plein du FACS. Merci aussi pour toutes nos discussions scientifiques et médicales, j'ai beaucoup appris grâce à toi et je t'en suis reconnaissant.

A Chloé Boisseau et Loïc Gonzalez

Merci à tous les deux de m'avoir supporté (dans tous les sens du terme !) dans les manips, et aussi pour nos discussions toujours très professionnelles. Je vous souhaite le meilleur pour la suite !

A Thomas Baranek

Merci pour tes conseils aussi bien en sciences que pour l'enseignement, mais aussi pour ta bonne humeur permanente et ta disponiblité.

Au reste de l'équipe 1

Merci à ma voisine de bureau Déborah pour son aide au début de la thèse (il fallait bien me lancer !) et pour nos discussions sur les différents projets qui m'intéressaient, ça m'a permis de garder un pied en bio cell et en biochimie. Merci également à Adeline, Antoine, Delphine, Gemma, Sylvie, aux deux Virginie et à Yonatan, ça a été un plaisir de travailler avec vous.

Au reste de l'unité et aux autres scientifiques

Je tiens bien évidemment à remercier l'ensemble de l'unité pour son accueil, et en particulier Thomas pour nos discussions aussi bien scientifiques qu'historiques ou encore politiques, c'était agréable de pouvoir discuter de tout ça avec quelqu'un.
Enfin, je tiens à remercier Alexandre, Alexie, David, Elsa, Mylène, Seda, Thibault et Woodiz pour leur soutien et pour avoir partagé tous les petits moments, bons ou mauvais, de la vie des thésards.
Merci aussi à Roxane Lemoine pour ta gentillesse et pour tous ces moments passés à discuter pendant que je bataillais avec le trieur.
Et merci à Yves Levern pour ces longs tris à l'INRA, ça a toujours été un plaisir de discuter cytométrie avec toi.

A ma famille

Je tiens d'abord à remercier ma sœur Carole, à chaque fois que l'on se retrouvait ça me ramenait des années en arrière lorsque nous étions encore tous les deux à Pierrefitte. Je te souhaite tout le meilleur et j'espère que l'on pourra se voir plus souvent à l'avenir.

Je ne remercierai jamais assez mes parents, sans vous je n'aurais rien pu faire de tout cela. Merci de m'avoir soutenu depuis toujours, dans les moments difficiles surtout mais aussi dans les meilleurs moments de ma vie. Cette thèse vous appartient entièrement et je vous remercie de m'avoir enseigné les plus belles valeurs en me montrant votre exemple, que je m'efforcerai de suivre et de transmettre à mon tour.

Et enfin, à Marion

Merci d'être à mes côtés depuis toutes ces années, de m'avoir soutenu lorsque j'étais au plus bas et de m'avoir permis de révéler le meilleur de moi-même. Merci d'avoir supporté tous ces week-ends de travail et quelques fois d'absence, les explications interminables de mon projet et surtout de m'avoir nourri pendant la rédaction !
Ce petit séjour à Tours n'a pas été aussi facile que nous le pensions mais nous nous sommes toujours soutenus l'un l'autre, et je sais que je pourrai toujours compter sur ton soutien.

Table des matières

Remerciements ____ ***1***

Table des matières ____ ***3***

Résumé ____ ***7***

Summary ____ ***8***

Liste des abréviations ____ ***9***

Table des illustrations ____ ***13***

Introduction ____ ***15***

I Préface ____ **15**

II Les neutrophiles ____ **17**

II.1 Découverte ____ 17

II.2 Caractéristiques ____ 18

II.3 Origine et développement ____ 19

II.3.1 Engagement vers la lignée granulocytaire ____ 20

II.3.2 Des progéniteurs communs aux neutrophiles différenciés ____ 22

II.3.3 Neutrophile différencié : la voie de la maturité ____ 23

II.4 Devenir des neutrophiles et rôle à l'homéostasie ____ 25

II.4.1 La circulation sanguine : de la moelle aux tissus ____ 25

II.4.2 Rôle des neutrophiles dans l'homéostasie des tissus ____ 27

II.4.3 Interconnexion avec le rythme circadien ____ 30

II.5 Voies d'activation du neutrophile ____ 31

II.5.1 La reconnaissance des pathogènes et des signaux de danger ____ 31

II.5.2 L'activation par les récepteurs non PRR ____ 39

II.6 Fonctions du neutrophile ____ 46

II.6.1 Fonctions antimicrobiennes et cytotoxiques ____ 47

II.6.2 Fonctions immunomodulatrices : le neutrophile au carrefour de l'immunité ____ 54

II.6.3 Remodelage tissulaire : dégâts et réparation ____ 64

II.7 Pathologies associées au neutrophile ____ 66

II.7.1 Infections bactériennes : un rôle central du neutrophile ____ 66

II.7.2 Maladies inflammatoires : le neutrophile acteur et médiateur ____ 67

II.7.3 Cancer : neutrophiles anti-tumoraux vs pro-tumoraux ? ____ 68

III Le virus *Influenza* A ____ **70**

III.1 Les virus *Influenza* : présentation et enjeux 70
III.2 Le virus *Influenza* A : structure et cycle 72
III.2.1 Structure 72
III.2.2 Cycle viral 74
III.3 Généralités sur la grippe 80
III.3.1 La grippe épidémique saisonnière 80
III.3.2 Les complications de la grippe 81
III.3.3 Les pandémies de grippe 83
III.4 La réponse immunitaire dirigée contre IAV 84
III.4.1 Reconnaissance du virus et activation de la réponse innée 84
III.4.2 La réponse immunitaire adaptative 87
III.4.3 Immunopathologie 90
III.5 Rôle du neutrophile dans l'infection à IAV 91
III.5.1 Le neutrophile, un acteur essentiel dans la lutte contre le virus 91
III.5.2 Les dégâts liés au neutrophile : un excès de zèle ? 92

***Contexte et objectifs de l'étude* 95**

***Résultats* 97**

Introduction à l'article 97

Influenza A virus infection programs neutrophils for regulatory functions in an IFN-γ-dependent manner 99

***Discussion et perspectives* 133**

I Identification d'une sous-population de neutrophiles régulateurs au cours de l'infection à IAV 134

I.1 Sca-1 : un marqueur de neutrophiles régulateurs 134
I.2 Les neutrophiles régulateurs Sca-1$^+$ sont morphologiquement matures 137
I.3 Les neutrophiles Sca-1$^+$: Une population hétérogène ? 138
I.4 Rôle de la protéine Sca-1 chez le neutrophile 139

II Revisite du rôle du neutrophile dans la grippe 141

II.1 Les conséquences du rôle des neutrophiles dans la grippe ne sont-elles que dépendantes du modèle utilisé ? 141
II.2 Comment étudier plus spécifiquement les neutrophiles régulateurs dans la grippe ? 142

III Programmation des neutrophiles Sca-1+ dans la moelle 144

III.1 De l'infection pulmonaire à la programmation dans la moelle osseuse 144
III.2 L'IFN-γ est une cytokine clé dans la programmation des neutrophiles Sca-1$^+$ lors de l'infection à *Influenza* 145

III.3 Les neutrophiles nécessitent un ou plusieurs autres facteurs pour l'induction d'un programme régulateur _____ 146

III.4 Les neutrophiles régulateurs peuvent-ils provenir d'une polarisation *in situ* ?_____ 147

IV Les neutrophiles Sca-1+ à l'homéostasie : Niches tissulaires et facteurs de survie 148

V Opportunités cliniques _____ 149

Bibliographie_____ 153

Annexe_____ 210

Résumé

Les neutrophiles représentent une population de cellules immunes effectrices-clés dans la lutte anti-infectieuse. Longtemps considérées comme des cellules ultraspécialisées dans l'élimination des microbes, de plus en plus de recherches tendent pourtant à repositionner le neutrophile comme un acteur de la régulation des réponses immunitaires dans de nombreux contextes (cancer, auto-immunité, infection). De plus, il semble aujourd'hui clair qu'il n'existe pas un type de neutrophile mais que celui-ci est doué de fonctions multiples (parfois antagonistes) en lien avec l'environnement ou potentiellement à des sous-populations fonctionnelles préexistantes.

De ce fait, le(s) neutrophile(s) pourraient jouer un rôle bénéfique ou délétère en fonction de la pathologie ou de la phase inflammatoire de la pathologie. A titre d'exemple, le neutrophile semble pouvoir présenter un profil pro- et/ou anti-inflammatoire au cours de l'infection grippale.

De façon générale, le neutrophile semble jouer un rôle-clé dans l'immunopathologie grippale et ses complications comme le syndrome de détresse respiratoire aiguë. En effet, sa présence dans les voies aériennes est corrélée à la sévérité de la pathologie dans les modèles expérimentaux et chez les patients. Toutefois, d'autres études semblent indiquer un rôle protecteur du neutrophile au cours de l'infection grippale. Bien que la différence de modèles utilisés puisse expliquer en partie ces résultats discordants, nous émettons l'hypothèse qu'un tel phénotype pourrait être également dû à l'existence de différentes sous-populations fonctionnelles jouant des rôles opposés au cours de la grippe.

Au cours de l'infection par le virus *Influenza* (IAV), nous avons observé l'émergence d'une population de neutrophiles matures exprimant le marqueur de cellules souches hématopoïétiques Sca-1 (Ly6A). Cette population existe à l'homéostasie et présente un tropisme particulier pour les tissus non lymphoïdes. Au cours de l'infection IAV, les neutrophiles Sca-1^+ présentent un profil phénotypique et fonctionnel immunorégulateur se caractérisant par l'expression de protéines membranaires régulatrices comme PD-L1 ou MHC-II et la sécrétion de médiateurs anti-inflammatoires comme l'IL-10 et l'arginase-1. L'acquisition de ces fonctions semble avoir lieu dans la moelle osseuse via un mécanisme dépendant de l'IFN-γ. La déplétion de ces neutrophiles Sca-1^+ aboutit à une susceptibilité accrue des animaux à l'infection IAV et à une exacerbation des phénomènes inflammatoires associés à l'infection. En conclusion, nos travaux suggèrent un nouveau concept où une infection virale localisée peut modifier à distance le développement médullaire fonctionnel des neutrophiles.

Summary

Neutrophils are key innate effector cells during infections, mostly described as single footsoldiers of innate immunity that eliminate pathogens through multiple mechanisms. However, emerging evidences tend to reposition neutrophils as cells endowed with relevant immunomodulatory functions in various immune responses including auto-immunity, cancer and viral infections. Thus, it is now admitted that neutrophils can play multiple (sometimes opposite) functions in relation to the environment or the existence of preset functional subsets.

In this context, neutrophil(s) can play either protective or deleterious role according to the disease and the inflammatory stage of the disease. This paradigm can be further exemplified during experimental *Influenza* A virus (IAV) infection, a model of lung immunopathology, in which neutrophils have been shown to play either pro- or anti-inflammatory functions.

It is usually conceded that neutrophils play a critical role in IAV-dependent immunopathology and its complications such as acute respiratory distress syndrome. Thus, its presence in airways is correlated to disease severity in experimental model and clinical studies. However, some studies indicate a protective role for neutrophils during IAV infection. While the differences in the model used may somehow explain these contradictory results, we hypothesized that this discrepancy may arise from the existence of functional subsets that play opposite roles during IAV infection.

During IAV infection, we observed the emergence of a subset of mature neutrophils expressing the hematopoietic stem cell marker Sca-1 (Ly6A). This subset could be observed under steady-state and preferentially populated non lymphoid tissues. During flu infection, Sca-1^+ neutrophils displayed a phenotypic and functional profile of cells endowed with immunoregulatory functions. Specifically, they expressed the regulatory surface makers PD-L1 and MHC-II and secreted anti-inflammatory molecules such as IL-10 and arginase-1. These functions appeared to be acquired in the bone marrow during neutrophil development in an IFN-γ-dependent manner. Interestingly, depletion of Sca-1^+ neutrophils culminated in increased susceptibility to IAV infection and IAV-dependent inflammation. In sum, our work suggest a new immunological concept in which a distant viral infection can remote the functional development of neutrophils in the bone marrow.

Liste des abréviations

APC	Antigen Presenting cell
BPCO	Bronchopneumopathie Chronique Obstructive
C/EBP	CCAAT-Enhancer-Binding Protein
CARD	Caspase recruitment domain
CCL	C-C motif chemokine Ligand
CCR	C-C Chemokine Receptor
CD	Cluster de Différenciation
CLP	Common Lymphoid Progenitor
CLR	C-type Lectin Receptor
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMP	Common Myeloid Progenitor
CXCL	C-X-C motif chemokine Ligand
CXCR	C-X-C Chemokine Receptor
DAG	Diacylglycerol
DAMP	Danger Associated Molecular Pattern
DC	Cellule dendritique
DD	Death Domain
FADD	FAS-Associated Death Domain-containing protein
Fc	Fragment crystallizable region
FcγR	Fcγ chain Receptor
fMLF/fMLP	formyl-Methonine-Leucine-Phenilalanine
FPR	Formyl Peptide Receptor
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
G-CSFR	G-CSF Receptor
GM-CSF	Granulocyte/Macrophage Colony Stimulating Factor
G-MDSC	Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cell
GMP	Granulocyte Monocyte Progenitor
GPCR	G Protein-Coupled Receptor
HA	Hémagglutinine
HSC	Cellules Souches Hématopoïétiques
IAV	*Influenza* A Virus
ICAM	InterCellular Adhesion Molecule
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IKK	IκB kinase-β
IL	Interleukine
iNKT	invariant Natural Killer T cell
IP3	Inositol triphosphate

IRAK	IL-1R-associated kinase
ISG	Interferon-stimulated gene
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
JAK	Janus Kinase
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
KO	Knock-Out
LB	Lymphocyte B
LBA	Lavage Bronchoalvéolaire
LPS	Lipopolysaccharide
LRTI	Low Respiratory Tract Infection
LT	Lymphocyte T
LTB_4	Leukotriène B_4
LT-HSC	Long Term- Hematopietic Stem Cell
Ly6G	Lymphocyte antigen 6 group G
MDSC	Myeloid-Derived Suppressor Cell
MGG	May-Grünwald Giemsa
MMP	Matrix MetalloProteinase
MPO	Myéloperoxydase
MyD88	Myeloid Differentiation primary response 88
NA	Neuraminidase
N_{BH}	Neutrophil B-cell Helper
NE	Neutrophil Elastase
NET	Neutrophil Extracellular Trap
NF-κB	Nuclear Factor-kappa B
NK	Natural Killer
NLR	NOD-like receptor
NLRP	NLR type P
NO	Nitric Oxide
NOD	Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing protein
NOX2	NADPH oxidase 2
NP	Nucléoprotéine
NS	Protéine Non Structurale
PA	Protéine Acide
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PB	Protéine Basique
PD-1	Programmed Death receptor 1
PD-L1	Programmed Death-Ligand 1
PGE_2	Prostaglandine E2
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
PIP3	Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate

PKC	Protein Kinase C
PLC	Phospholipase Cβ
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate
PR3	Protéinase 3
PRR	Pattern Recognition Receptor
RdRp	RNA-dependent RNA-polymerase complex
RIG	Retinoic acid-Inducible Gene
RIP	Receptor-Interacting Protein
RLR	RIG-I-like Receptor
ROS	Reactive Oxygen Species
Sca-1	Stem cells antigen-1
SDRA	Syndrome de Déficience Respiratoire Aiguë
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
ST-HSC	Short Term- Hematopietic Stem Cell
TAK	TGFβ-Activated Kinase
TAN	Tumour Associated Neutrophil
Th	T helper
TIR	Toll/Interleukin-1 Receptor
TIRAP	TIR domain containing Adaptor Protein
TLR	Toll-Like Receptor
TNF	Tumor Necrosis Factor
TRADD	TNFR-associated Death Domain protein
TRAF	TNFR-Associated Factor
TRAIL	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vRNP	Viral Ribonucleoprotein
WT	Wild Type

Table des illustrations

Figure 1 : Les acteurs de la réponse immunitaire innée et adaptative. (Dranoff 2004) 15
Figure 2 : Table chauffante utilisée par Max Schultze 17
Figure 3 : Morphologie et coloration MGG des neutrophiles humains et murins. (Adapté de Pillay et al. 2013) 18
Figure 4 : Développement des cellules hématopoïétiques humaines et murines et marqueurs caractéristiques. (Seita et al. 2010) 19
Figure 5 : Les différents modèles de différenciation impliquent différents progéniteurs possibles pour les neutrophiles. (Adolfsson et al. 2005) 20
Figure 6: Le rôle de PU.1 et C/EBPα dans la différenciation des GMP. (Ostuni et al. 2016) 21
Figure 7 : Dynamique des neutrophiles dans la moelle osseuse à l'état basal (gauche) et lors d'un état inflammatoire (droite). (Eash et al. 2010) 24
Figure 8 : Le recrutement des neutrophiles. (Kolaczkowska et al. 2013) 26
Figure 9 : Les neutrophiles expriment une grande variété de PRR (C.J. Thomas et al. 2013) 31
Figure 10 : Signalisation des TLR membranaires du neutrophile. (Adapté de Takeuchi et al. 2010) 33
Figure 11 : Les mécanismes complexes d'activation de l'inflammasome NLRP3. (Jo et al. 2016) 36
Figure 12 : Signalisation des récepteurs couplés à une protéine G. (Futosi et al. 2013) 38
Figure 13 : Signalisation de FPR1 : différentes voies et différents effets pour un seul récepteur. (M. Liu et al. 2012) 39
Figure 14 : Récepteurs au fragment Fc des anticorps exprimés par les neutrophiles et voies de signalisation. (Futosi et al. 2013) 40
Figure 15 : Récepteurs aux cytokines exprimés par les neutrophiles et voies de signalisation. (Futosi et al. 2013) 42
Figure 16 : Structure des différentes chimiokines. 44
Figure 17:Mécanismes de phagocytose par le neutrophile. (Nordenfelt et al. 2011) 46
Figure 18 : Devenir du phagosome et rôle des composés produits par le neutrophile. (Nordenfelt et al. 2011) 47
Figure 19 : Composition des différentes granules du neutrophile. (Borregaard et al. 2007) 49
Figure 20 : Mécanismes de production des ROS par l'enzyme multimérique NOX. (El-Benna et al. 2016) 50
Figure 21 : Composition et assemblage des NETs après activation du neutrophile. (Sørensen et al. 2016) 52
Figure 22 : Les neutrophiles expriment une grande variété de médiateurs solubles impliqués dans de nombreux mécanismes physiologiques et immunitaires. (Mantovani et al. 2011) 54
Figure 23 : Le neutrophile est capable de recruter un grand nombre de cellules immunitaires parsa production de chimiokines. (Tecchio et al. 2016) 56
Figure 24 : Le rôle immunorégulateur de NO est dépendant des condtions inflammatoires. (Guzik et al. 2003) 62
Figure 25 : Rôle du couple PD-1/PD-L1 sur la régulation des lymphocytes T. (Bardhan et al. 2016) 63
Figure 26 : Les neutrophiles participent à la résolution de l'inflammation via leur apoptose. (Soehnlein et al. 2010) 66
Figure 27 : Le neutrophile au centre du processus inflammatoire dans la BPCO. (Liu et al. 2017) 68

Figure 28 : Evolution des virus Influenza et espèces concernées. (Hutchinson et al. 2018) _____ *70*

*Figure 29 : Structure du virion Influenza A. (Hutchinson et al. 2018)*_____ *73*

Figure 30 : Infection d'une cellule de l'hôte par IAV. (Hutchinson et al. 2018) _____ *79*

*Figure 31 : Protection et vulnérabilité à la pandémie de virus Influenza A de 1918. (Worobey et al. 2014)*____ *83*

Figure 32 : Reconnaissance de IAV par les PRR. (Tripathi et al. 2015) _____ *85*

Figure 33 : Schéma récapitulatif de la dynamique des neutrophiles Sca-1^{+} au cours de l'infection au virus Influenza _____ *133*

Introduction

I Préface

Au cours de l'évolution, les organismes ont développé différents mécanismes pour se protéger des aggressions extérieures, comme par exemple les micro-organismes pathogènes. Ces mécanismes se sont développés au fur et à mesure que les organismes se complexifiaient et se sont notamment dotés de différents facteurs spécialisés dans le traitement des infections et autres agressions. L'ensemble de ces facteurs forme l'immunité chez les êtres pluricellulaires.

Les celllules de l'immunité rentrent en action au cours d'un processus complexe, l'inflammation, qui coordonne le recrutement des cellules immunitaires sur le lieu de l'agression, leur activation, et provoque des réactions pouvant se propager à l'ensemble de l'organisme.

De façon dogmatique, l'immunité est séparée en deux bras : l'immunité innée et l'immunité adaptative. Toutefois, cette vision ne semble plus aujourd'hui être en pleine adéquation avec les découvertes récentes et notamment l'existence de populations immunes possédant des propriétés hybrides entre inné et adaptatif (Figure 1).

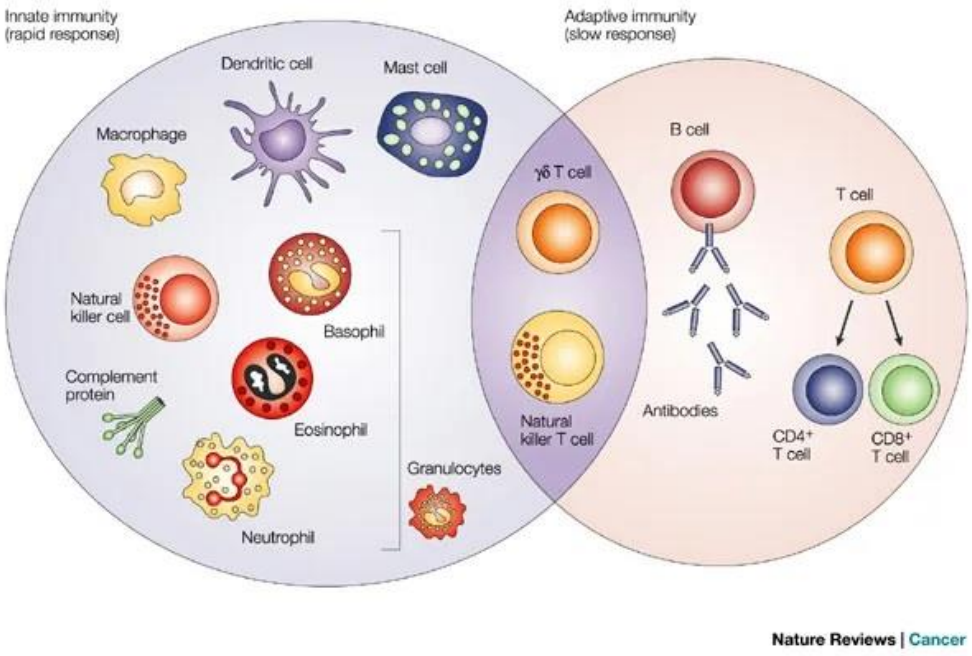


Figure 1 : Les acteurs de la réponse immunitaire innée et adaptative. (Dranoff 2004)

L'immunité innée comprend la première ligne de défense de l'hôte incluant, par exemple, les barrières physiques (peau, muqueuses), ou encore certains contingents cellulaires ayant la capacité de répondre rapidement à une agression via des mécanismes de détection hautement conservés. On peut ainsi citer les phagocytes comme les granulocytes ou les macrophages. On trouve également les cellules dendritiques, véritables sentinelles de l'organisme importantes dans le déclenchement de la réponse immune, ou encore des lymphocytes innés comme les cellules Natural Killer (NK) ou les « innate lymphoid cells » (ILC) (Moro et al. 2010), cellules douées d'importantes fonctions régulatrices et effectrices.

L'immunité adaptative comprend des cellules qui expriment des récepteurs réarrangés (de façon somatique) ayant une haute spécificté pour un antigène donné. Bien que pré-existantes, ces cellules nécessitent une éducation et une expansion clonale pour agir efficacement. Ainsi leur réponse est plus tardive que celle des cellules de l'immunité innée mais possède un avantage indéniable au-delà de leur action spécifique : elle confère à l'hôte une mémoire immunitaire. Les cellules douées de ces propriétés adaptatives sont les lymphocytes T (LT) et les lymphocytes B (LB).

Enfin, comme énnoncé précédemment, la découverte ces 30 dernières années de populations cellulaires présentant à la fois des caractéristiques de cellules innées et adaptatives fait parfaitement sens dans la réalité d'une réponse immune continue et non cloisonnante. Ces cellules sont d'origine lymphoïde et ont été regroupées sous le terme de lymphocytes T non conventionnels ou lymphocytes T innés.

Pendant de nombreuses années, la communauté scientifique pensait que chaque type cellulaire possédait une fonction qui lui était propre. Il est clair aujourd'hui que chaque type de cellule immune semble être capable d'exercer plusieurs fonctions.

Ceci s'explique par l'existence de sous-populations fonctionnelles émergant de variations dans les processus de différenciation et d'éducation ou encore par la conservation d'un certain niveau de plasticité permettant de moduler leurs fonctions dans un contexte et un environnement donné.

Cette notion est particulièrement pertinente pour le neutrophile, un granulocyte longtemps considéré comme un simple phagocyte de l'immunité innée, mais qui ne cesse de dévoiler des compétences variées dans la régulation des réponses immunes et des rôles paradoxaux dans un grand nombre de pathologies.

II Les neutrophiles

II.1 Découverte

Les polynucléaires neutrophiles ont été découverts pour la première fois par Max Schultze en 1865 sur du sang humain via un système de table chauffante (Brewer 1994; Schultze 1865). Ce système est composé d'une partie centrale de la taille d'une lame de microscope et de deux bras latéraux en L, chauffés par une lampe escamotable permettant de régler la température de chauffe (Figure 2). Il a permis à Max Schultze d'observer la plupart des leucocytes au cours de ses expériences sur le protoplasme, et notamment les granulocytes en mouvement lorsque le sang était à 37°C.

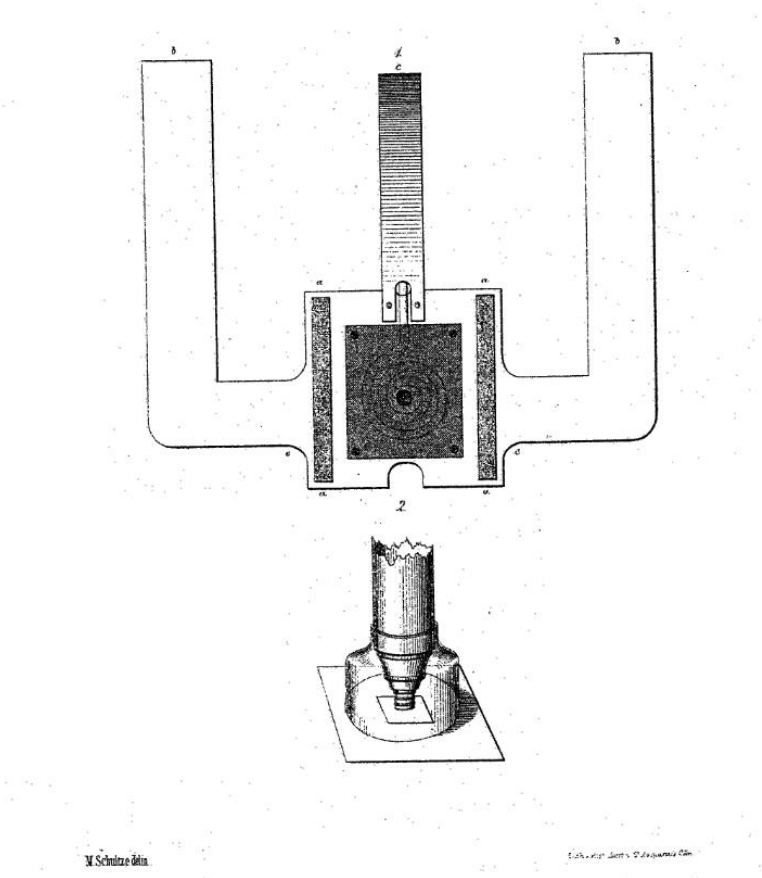


Figure 2 : Table chauffante utilisée par Max Schultze

Les neutrophiles doivent leur nom de « polynucléaires » à ces premières observations suggérant la présence de plusieurs noyaux. Le terme de « neutrophile » provient lui de la coloration neutre de leur cytoplasme obtenue à l'aide d'une coloration histologique acide et

basique (Ehrlich 1891), comme la coloration de May-Grünwald Giemsa (MGG) composée d'éosine et d'azur et bleu de méthylène.

Les neutrophiles ont ensuite été notamment décrits par Elias Metchnikoff dans ses travaux sur la phagocytose (Metchnikoff 1891). Ce rôle de cellule spécialisée et mono-tâche impliquée dans la phagocytose est resté longtemps associé au neutrophile, avant que des travaux plus récent ne lui reconnaissent de nombreuses autres fonctions, augmentant ainsi l'attrait de cette cellule pour la communauté scientifique bien au-delà du domaine infectieux.

II.2 Caractéristiques

Le neutrophile est une cellule sphérique d'environ 10 µm de diamètre chez la souris et 10-12 µm chez l'Homme lorsqu'il est en suspension dans le sang (Hidalgo *et al.* 2019). Les observations récentes ont montré que les neutrophiles possèdent un noyau unique plurilobé, invalidant ainsi leur nom de « polynucléaire ». Ce noyau se segmente au cours de la maturation, et possède généralement 3 à 5 segmentations (Figure 3). En plus de ce noyau segmenté, les neutrophiles possèdent un grand nombre de vésicules dans leur cytosol, nommées granules, qui leur donnent la coloration neutre caractéristique observée en MGG dans les premières observations.

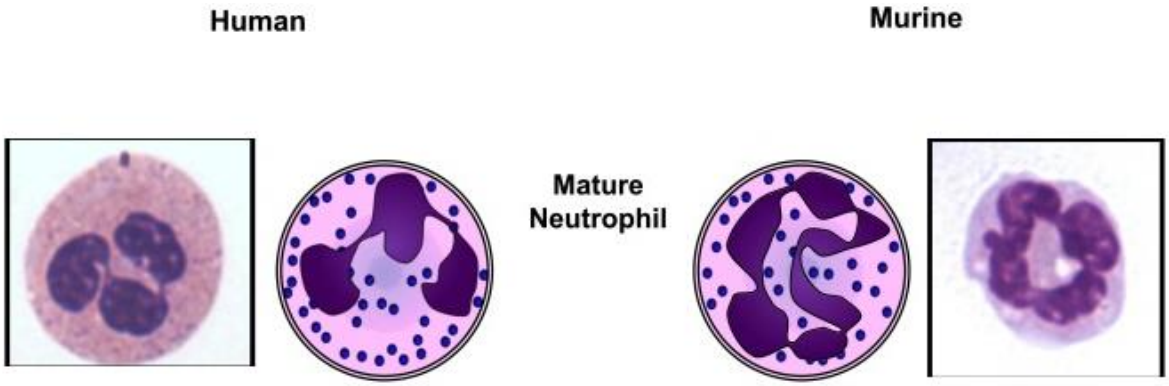


Figure 3 : Morphologie et coloration MGG des neutrophiles humains et murins. (Adapté de Pillay *et al.* 2013)

Les neutrophiles sont parmi les leucocytes les plus répandus chez l'Homme et la souris, représentant environ 60 % des leucocytes circulant chez l'Homme et 25 % chez la souris. Du fait de leur courte durée de vie dans la circulation, les neutrophiles sont rapidement renouvelés nécessitant une production constante et importante de nouvelles cellules dans la moelle osseuse afin de maintenir un niveau stable de cette population en périphérie (Boxio *et al.* 2004; Pillay *et al.* 2010).

II.3 Origine et développement

Les neutrophiles sont générés en continu dans la moelle osseuse à partir de cellules souches hématopoïétiques (HSC), précurseurs de toutes les cellules immunitaires et sanguines LSK (Lineage$^-$ Sca-1$^+$ c-kit$^+$) identifiés par l'expression de c-kit (CD117) et Sca-1 (Stem Cell Antigen-1) et l'absence de marqueurs de cellules différenciées comme Ter119, CD3ε ou encore CD19 (Lineage$^-$) (Figure 4) (Seita *et al.* 2010). Pendant leur maturation, les futurs neutrophiles passent ainsi par plusieurs étapes de différenciation afin de produire des cellules matures prêtes à peupler les différents compartiments de l'organisme.

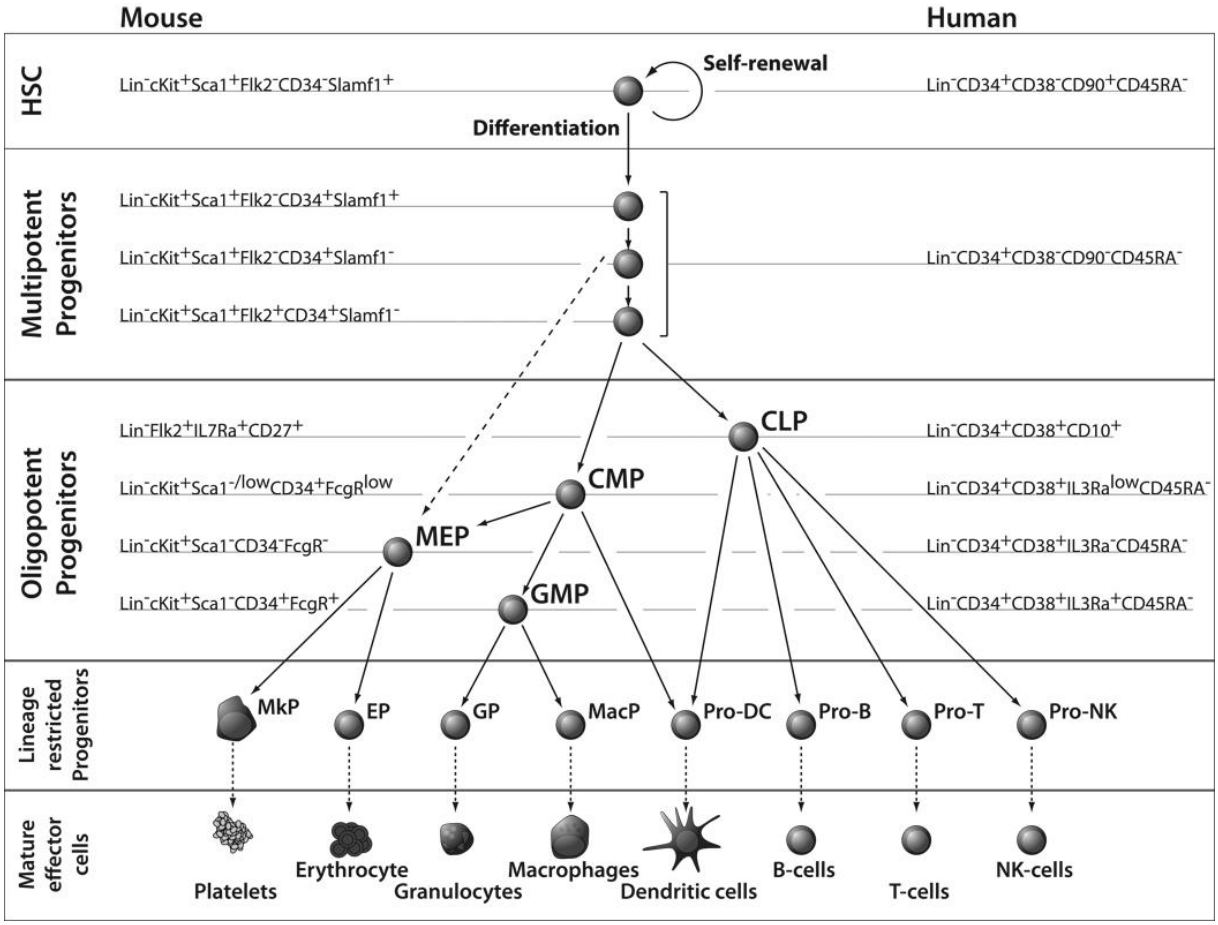


Figure 4 : Développement des cellules hématopoïétiques humaines et murines et marqueurs caractéristiques. (Seita *et al.* 2010)

HSC : cellule souche hématopoïétique ; CLP : progéniteur commun des lymphocytes ; CMP : progéniteur commun des myélocytes ; MEP : progéniteur des mégakaryocyte/érythrocyte ; GMP : progéniteur des granulocytes/macrophages ; MkP : progéniteur des mégakaryocytes ; EP : progéniteur des érythrocytes ; GP : progéniteur des granulocytes ; MacP : progéniteur des macrophages ; Pro-DC : progéniteur des cellules dendritiques ; Pro-B : progéniteur des lymphocytes B ; Pro-T progéniteur des lymphocytes T ; Pro-NK :progéniteur des cellules Natural Killer

Plusieurs théories ont été émises pour expliquer ce développement, nous aborderons ici le modèle classiquement admis établi principalement par les travaux d'Irving Weissman (Weiskopf *et al.* 2016) (Figure 4). Les alternatives impliquant plus d'hétérogénéité dans les progéniteurs des différentes lignées seront également abordées (Figure 5).

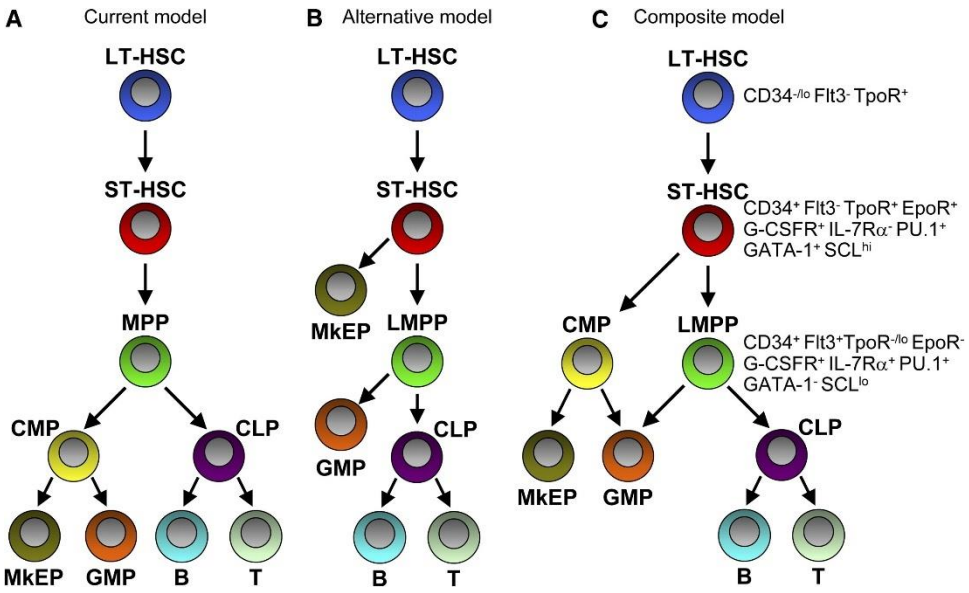


Figure 5 : Les différents modèles de différenciation impliquent différents progéniteurs possibles pour les neutrophiles. (Adolfsson *et al.* 2005)

MPP : progéniteur multipotent ; LMPP : lymphoid- primed MPP

II.3.1 Engagement vers la lignée granulocytaire

Dans la moelle osseuse, les cellules souches à fort potentiel de renouvellement (LT-HSC pour Long-Term HSC) perdent peu à peu cette caractéristique et se différencient en cellules à plus faible potentiel (ST-HSC pour Short-Term HSC (Weiskopf *et al.* 2016). Cette différenciation s'opère via la perte d'expression du facteur de transcription Homeobox protein HoxB5, impliqué dans l'adhérence des progéniteurs aux cellules VE-Cadhérine$^+$ de la vasculature (J. Y. Chen *et al.* 2016). Les ST-HSC acquièrent progressivement le récepteur tyrosine kinase Flt3 (aussi nommé CD135), un récepteur spécifique à Flt3L (Fms-related tyrosine kinase 3 Ligand), un facteur de croissance clé dans la différenciation de la lignée myéloïde (Adolfsson *et al.* 2001; Christensen *et al.* 2002).

Ces cellules se différencient ensuite en progéniteurs multipotents (MPP) exprimant CD244 puis progressivement CD48 (Kiel *et al.* 2005). Ces progéniteurs donnent naissance ensuite à deux lignées distinctes : la branche myéloïde via les progéniteurs communs des myélocytes (CMP) contenant notamment les futurs neutrophiles, et la branche lymphoïde via

les progéniteurs commun des lymphocytes (CLP). L'expression de la chaine α du récepteur à l'interleukine-7 (CD127) engage une partie des progéniteurs multipotents vers la voie de différenciation en CLP (Kondo *et al.* 1997), et les cellules $CD127^-$ se différencient quant à elles en CMP (Akashi *et al.* 2000).

Les CMP peuvent être ensuite discriminés selon leur expression de CD34 et du récepteur au fragment Fc FcγR-II/III, les cellules $CD34^+$ $FcγR^{lo}$ étant les progéniteurs les plus précoces (Akashi *et al.* 2000). La perte d'expression de la phosphoglycoprotéine transmembranaire CD34 mène à l'engagement vers les lignées $CD34^-$ $FcγR^{lo}$ des mégacaryocytes et des érythrocytes. En parallèle, l'expression du récepteur au fragment Fc caractérise les progéniteurs directs des granulocytes et macrophages (GMP, $CD34^+$ $FcγR^{hi}$).

Alternativement, les GMP pourraient être issus de progéniteurs lympho-myéloïdes, les LMPP (lymphoid-primed multipotent progenitors). Ces progéniteurs découverts par l'équipe de Sten Jacobsen, expriment Flt3, G-CSFR et CD127 seraient à l'origine des GMP et des CLP, le modèle supprimant les CMP (Adolfsson *et al.* 2005).

Sous l'effet des facteurs de croissance des granulocytes et des monocytes G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor) et M-CSF (Monocyte-Colony Stimulating Factor), les GMP s'engagent vers la voie des granulocytes (Rieger *et al.* 2009). En effet, d'un point de vue mécanistique, une augmentation de l'expression du récepteur au G-CSF est induit par le facteur de transcription C/EBPα (Friedman 2002), dont l'expression est elle-même régulée positivement en *cis* par le G-CSF (Dahl *et al.* 2003). C/EBPα réprime alors le facteur de transcription PU.1 (Reddy *et al.* 2002) permettant la différenciation des GMP en myéloblaste, premier stade de différenciation de la lignée granulocytaire (Dahl *et al.* 2003) (Erreur ! Source d u renvo

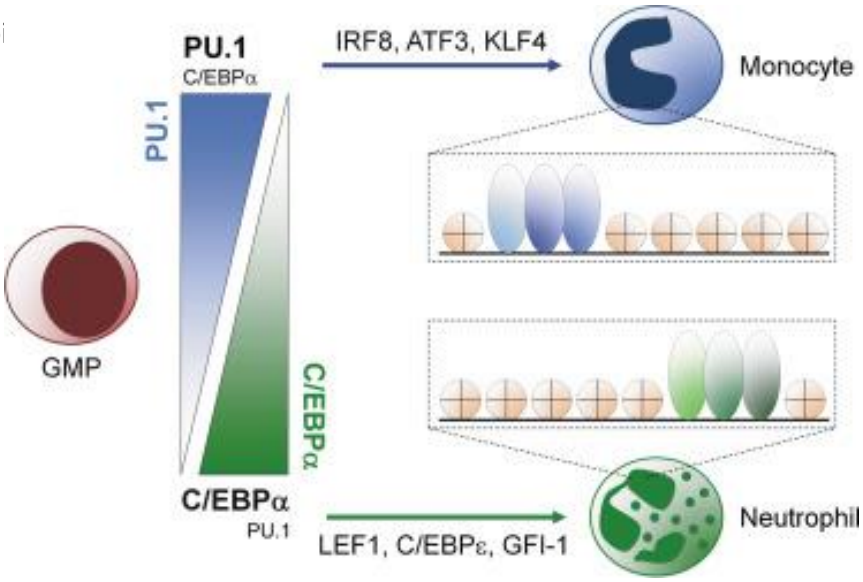


Figure 6: Le rôle de PU.1 et C/EBPα dans la différenciation des GMP. (Ostuni et al. 2016)

II.3.2 Des progéniteurs communs aux neutrophiles différenciés

Premier stade de différenciation de la lignée granulocytaire, les myéloblastes sont des cellules relativement sphériques présentant un rapport nucléocytoplasmique élevé. Leur différenciation nécessite ainsi de profonds remodelages cytoplasmiques et nucléaires. Il est à noter que la rétention des neutrophiles dans la moelle durant ce processus est assurée par l'expression du récepteur chimiokinique CXCR4 (Q. Ma *et al.* 1998).

Ces précurseurs sont les derniers à exprimer l'enzyme Tyrosine-Protein Kinase Kit ou c-kit (CD117) et les premières à exprimer la peptidase transmembranaire CD13 et le récepteur de la famille des sialoadhésines CD33 (Friedman 2002). L'expression de CD13 permet de discriminer la voie de différenciation en neutrophile de celle commune aux autres granulocytes : les éosinophiles et les basophiles.

Le stade promyélocyte est le premier à produire des granules primaires ou azurophiles en grande quantité et à les stocker dans son cytoplasme (Niels Borregaard *et al.* 2007). Ce stade est donc différenciable en microscopie via une coloration MGG, les granules étant colorés en rouge. La production de myéloperoxydase (MPO), de protéases à sérine comme la cathépsine G, de défensines ou encore de lysozyme est stockée dans ces granules, leur conférant principalement une activité antimicrobienne. Par exemple, la MPO agit lors de la phagocytose des bactéries en catalysant la réaction de formation de l'acide hypochloreux HClO à partir d'H_2O_2 et d'ion chlorure. Cet acide est létal pour les bactéries phagocytées après fusion du phagosome (vacuole de phagocytose) et des granules azurophiles (Aratani 2018). L'expression du répresseur de transcription Growth Factor Independence 1 (GFi-1) contribue à la différenciation progressive en promyélocyte via l'induction de la production de MPO (Ostuni *et al.* 2016).

Les stades myélocytes et métamyélocytes se caractérisent par la production graduelle de granules secondaires (ou spécifiques) et par l'arrêt de la production des granules primaires. Les granules secondaires sont de couleur brun foncé en coloration MGG et contiennent par exemple de la collagénase. Ces granules deviennent progressivement majoritaires dans le cytoplasme au cours de la différenciation, en association avec une transformation morphologique du noyau, devenant plus compact et circulaire. Ceci s'accompagne d'une perte des capacités prolifératives (Grassi *et al.* 2018) visualisable par la perte d'expression de Ki67, un marqueur de prolifération qui s'accumule lors des phases mitotiques (I. Miller *et al.* 2018).

L'apport récent de techniques d'analyses transcriptomiques toujours plus performantes a permis de mieux comprendre les modifications génomiques associées à ces différentes étapes de différenciation/ maturation (Evrard *et al.* 2018; Bugl *et al.* 2012). Toutefois, les mécanismes impliqués dans ces effets restent encore largement incompris. A titre d'exemple, une étude récente a pu démontrer l'importance de l'autophagie dans la différenciation des neutrophiles (Riffelmacher *et al.* 2017; Rožman *et al.* 2015). Mécanistiquement, l'autophagie induit une lipolyse conduisant à la libération d'acides gras libres dans le cytosol. Ces acides gras libres soutiennent ainsi la respiration mitochondriale et la production d'ATP indispensable à leur différenciation (Riffelmacher *et al.* 2017). Ainsi, des souris déficientes pour *Atg7*, un gène clé de l'autophagie, présentent une accumulation de neutrophiles immatures ainsi que des neutrophiles non fonctionnels (Riffelmacher *et al.* 2017).

II.3.3 Neutrophile différencié : la voie de la maturité

Après 24 heures de différenciation (Evrard *et al.* 2018), les neutrophiles encore immatures sont des cellules dont le noyau non segmenté présente une morphologie en bande, mais elles sont toutefois capables de fonctions antimicrobiennes. Au cours de leur maturation, le noyau se segmente progressivement et des granules tertiaires se forment dans le cytoplasme. Ces granules sont notamment composés de gélatinase B (d'où leur autre nom de granules à gélatinase) et d'autres protéases de la matrice cellulaire (Matrix MetalloProteinase, MMP).

Au cours de leur maturation, les neutrophiles murins acquièrent graduellement l'expression de Ly6G, une protéine liée à un glycosylphosphatidylinositol (« GPI-linked protein ») dont la fonction sur les neutrophiles reste à ce jour encore mal comprise. Toutefois, cette protéine constitue un marqueur spécifique des neutrophiles ayant permis le développement d'outils biologiques indispensables dans l'étude de ces cellules (anticorps déplétants, souris « reporter » et ablation conditionnelle).

Les neutrophiles matures sont retenus dans la moelle grâce à l'expression de CXCR4, récepteur de la chimiokine CXCL12 (SDF-1). Le gradient de CXCL12, produit au sein de la moelle par les cellules stromales dont les ostéoblastes et les cellules endothéliales (Niels Borregaard 2010), retient ainsi les neutrophiles et les empêche de passer dans la circulation (Eash *et al.* 2010).

En parallèle, les neutrophiles en maturation expriment le récepteur aux chimiokines CXCR2 leur permettant de quitter la moelle sous l'effet de certaines chimiokines ELR^+ (contenant le motif acide glutamique-leucine-arginine avant la première cystéine du motif CXC) comme CXCL1 ou CXCL2. Ces chimiokines sont produites dans les organes en périphérie, établissant un gradient de concentration suivi par les neutrophiles hors de la moelle. De plus, l'expression de CXCR2 permet d'antagoniser l'effet rétenteur dans la moelle de CXCR4 (Eash *et al.* 2010) (Figure 7).

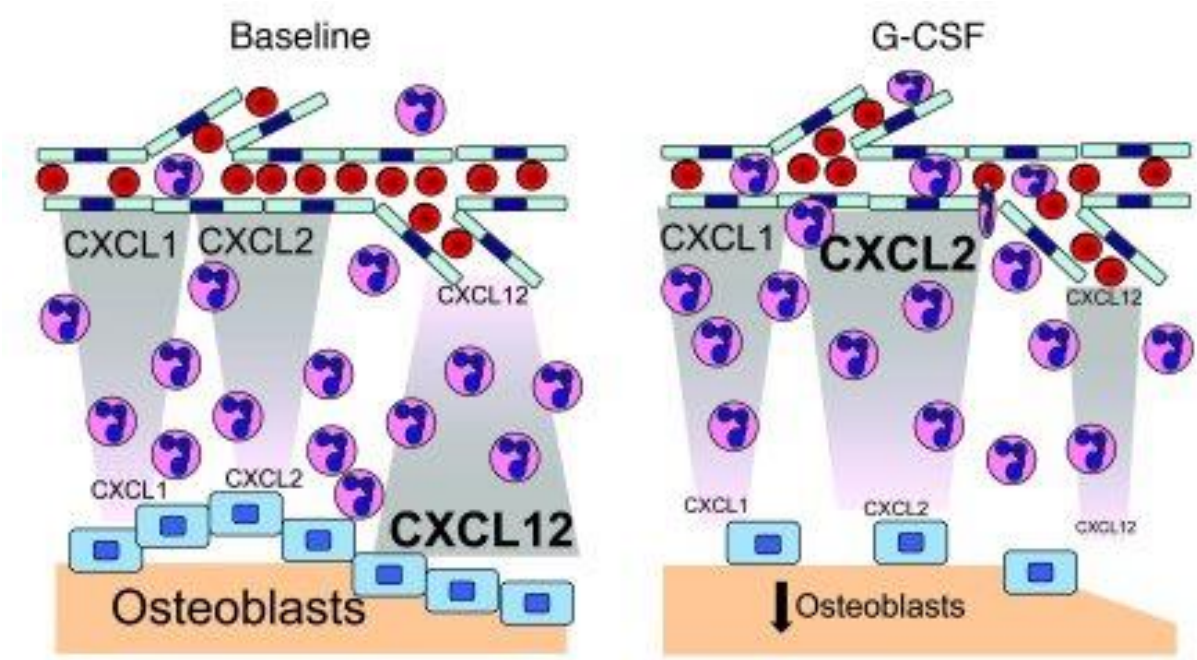


Figure 7 : Dynamique des neutrophiles dans la moelle osseuse à l'état basal (gauche) et lors d'un état inflammatoire (droite). (Eash *et al.* 2010)

Au-delà de son effet dans la différenciation neutrophilique, le G-CSF joue également un rôle dans la mobilisation des neutrophiles vers la périphérie. En effet, le G-CSF participe en *cis* à la « down-modulation » de l'expression de CXCR4 à la surface des neutrophiles rendant ces dernières non répondeuse à CXCL12 (Hyun *et al.* 2006; Semerad *et al.* 2002). Si de nombreux facteurs solubles ont été identifiés dans la régulation de la production de G-CSF en contexte inflammatoire (Demetri *et al.* 1991), les voies conduisant à sa sécrétion à l'homéostasie sont très peu comprises. La production du G-CSF semble surtout induite par l'IL-17, produite principalement par les LT dans les ganglions lymphatiques (Schwarzenberger *et al.* 2000) sous le contrôle de l'IL-23 produite majoritairement par les macrophages. La phagocytose des neutrophiles apoptotiques par ces macrophages mène à une diminution de leur production d'IL-23 (Ley *et al.* 2006; Stark *et al.* 2005; von Vietinghoff *et al.* 2008), limitant la production

d'IL-17 par les LT et donc de G-CSF dans la moelle. Un rétrocontrôle négatif de la différenciation des neutrophiles à l'homéostasie semble donc opérer selon l'axe IL-23/IL-17/G-CSF (Cf. II.4.2.1).

Les neutrophiles matures représentent entre 30 et 40% des leucocytes de la moelle, fréquence maintenue par la constante différenciation des stades plus immatures et le passage des cellules matures dans le sang. Ces neutrophiles possèdent toutes les caractéristiques des neutrophiles retrouvés dans les différents organes, dont la capacité de phagocytose et la libération des trois types de granules contenus dans son cytoplasme.

II.4 Devenir des neutrophiles et rôle à l'homéostasie

A la fin de leur différenciation, les neutrophiles passent dans le sang où ils forment une réserve de cellules rapidement mobilisables en cas d'infection ou d'autre stress. La circulation permet également d'amener les neutrophiles jusqu'aux différents organes périphériques, où ils ont différentes fonctions à l'homéostasie. Ces fonctions sont de plus en plus étudiées et révèlent un rôle multiple du neutrophile à l'homéostasie, qui interagit avec de nombreuses autres cellules (Hidalgo et al. 2019; Casanova-Acebes et al. 2018).

II.4.1 La circulation sanguine : de la moelle aux tissus

Les neutrophiles dans le sang peuvent être librement en circulation ou en adhérence avec l'endothélium, qui est généralement suivie d'un passage vers les différents tissus irrigués par les capillaires sanguins selon les gradients de chimiokines.

Les cellules endothéliales expriment les sélectines P (CD62) et E (CD62E), qui sont reconnues par leur ligand respectif (P-selectin glycoprotein ligand-1 PSGL-1, E-selectin ligand-1 ESL-1) (Kolaczkowska *et al.* 2013). L'interaction de ces sélectines avec leur ligand provoque la fixation du neutrophile à l'endothélium, qui se déplace alors selon un gradient de chimiokine. Afin de se déplacer, le neutrophile réalise des cycles d'association/ désassociation avec les sélectines de l'endothélium (Figure 8).

Lors d'une agression dans un tissu, la production de TNF-α et d'IL-1β notamment (Girbl *et al.* 2018) ou l'action des PAMPs (Pathogen Associated Molecular Pattern) et DAMPs (Danger Associated Molecular Pattern) sur les cellules endothéliales induit une grande production de chimiokines ELR^+ par celles-ci. La forte activation de CXCR2 notamment induit des changements dans la conformation des complexes d'intégrines CD11a/CD18 et CD11b/CD18

qui deviennent plus affines pour leurs ligands ICAM-1 et -2 (InterCellular Adhesion Molecule, CD54 et CD102). Après liaison des intégrines, leur activation provoque la stabilisation du neutrophile et sa préparation à la transmigration vers le tissu. Le neutrophile tend alors à se positionner au niveau des jonctions endothéliales grâce à une succession d'association/désassociation entre CD11b/CD18 et CD54.

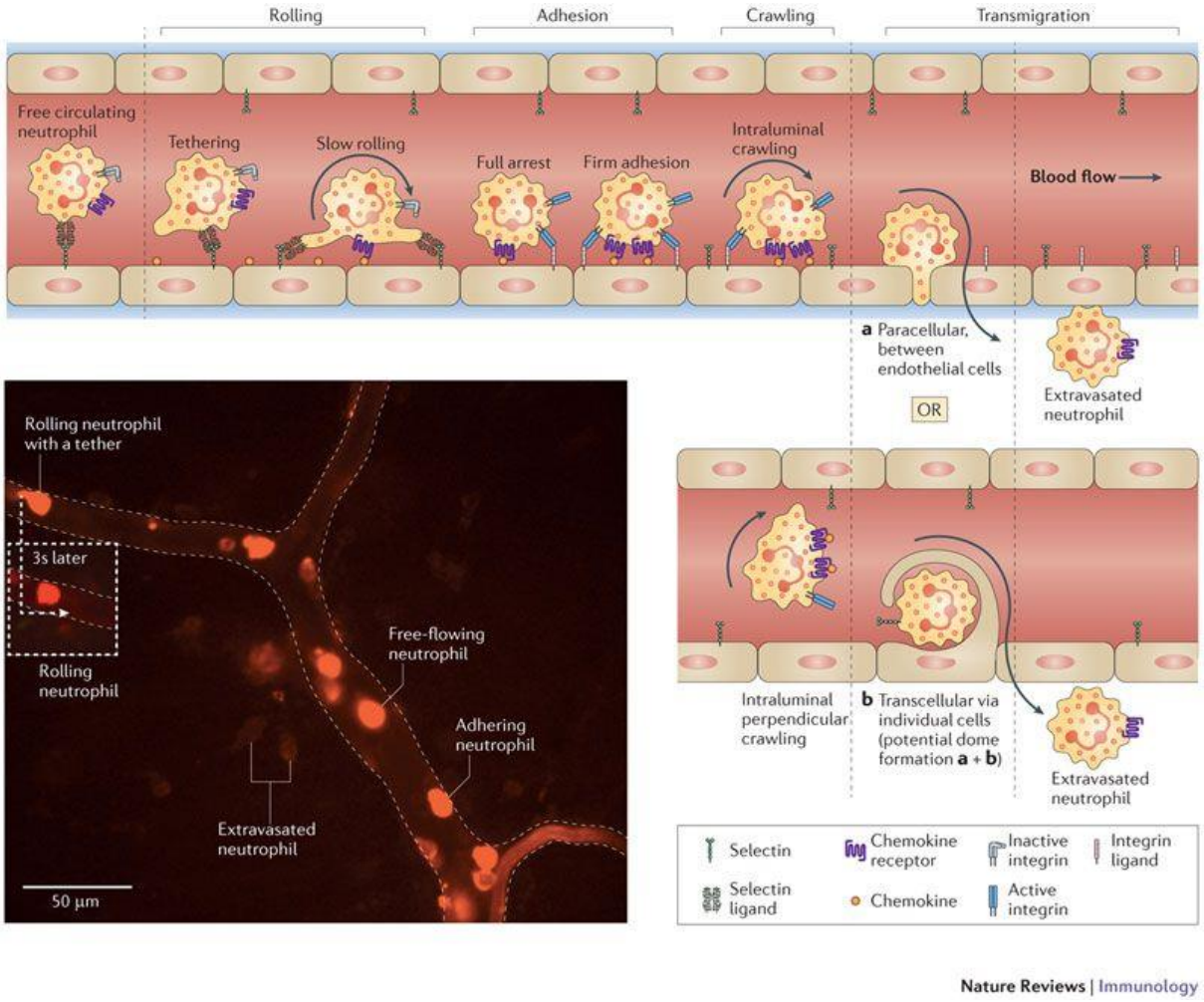


Figure 8 : Le recrutement des neutrophiles. (Kolaczkowska et al. 2013)
(En bas à gauche) Microscopie intravitale de capillaires de peau. Les neutrophiles sont marqués par des anticorps anti-Ly6G couplés à une phycoérythrine.

Après stabilisation au niveau de la jonction endothéliale, le neutrophile opère une transmigration de la circulation vers le tissu. Cette opération, qui dure environ 10 à 20 minutes, fait intervenir entre autres les intégrines précédentes, des molécules de jonctions adhésives (JAM), et des molécules d'adhésion des cellules épithéliales. Les mécanismes ne sont pas clairement identifiés, mais il a été montré que les neutrophiles pouvaient effectuer la transmigration entre deux cellules endothéliales (para-cellulairement) ou à travers une cellule endothéliale (trans-cellulairement).

II.4.2 Rôle des neutrophiles dans l'homéostasie des tissus

La distribution et le rôle des neutrophiles à l'homéostasie n'ont été que peu décrits jusqu'à récemment, la majorité des études se concentrant sur leur rôle pendant les infections. Entre autres, les travaux de l'équipe d'Andres Hidalgo ont mis en lumière la répartition des neutrophiles après leur passage dans le sang (Casanova-Acebes *et al.* 2018). En utilisant un modèle de parabiose avec des souris $Ly6G^{Cre}xRosa26^{TOM}$ ($Ly6G^{TOM}$) et en analysant les résultats en microscopie multiphotonique et en LSM (Light Sheet Microscopy), l'équipe a pu distinguer les différents lieux de peuplement des neutrophiles à l'homéostasie.

Les principaux organes peuplés par les neutrophiles à la suite de leur circulation dans le sang sont la moelle osseuse, la rate et les poumons, puis dans une moindre mesure le foie. Les neutrophiles se retrouvent également dans les intestins, la peau, les muscles ou encore le tissu adipeux (Casanova-Acebes *et al.* 2018; Summers *et al.* 2010). Cette présence dans de nombreux organes en absence d'inflammation s'explique par un large panel de fonctions régulatrices de l'homéostasie, aussi bien spécifiques d'un organe ou communes à l'ensemble de l'organisme.

II.4.2.1 Régulation du développement des progéniteurs hématopoïétiques

Le retour des neutrophiles matures dans la moelle peut s'expliquer par l'augmentation de CXCR4 par les neutrophiles âgés, ce qui provoque leur réponse au gradient de CXCL12 et leur migration vers la moelle (Furze et al. 2008; De Filippo et al. 2018). Les neutrophiles sénescents entrent ensuite en apoptose et expriment notamment la phosphatidylsérine sous le contrôle de facteurs pro-apoptotiques comme Bcl-2 (Akgul et al. 2001; Naito et al. 1997). Les neutrophiles sont alors éliminés par les phagocytes (macrophages, cellules dendritiques), diminuant la quantité d'IL-23 produite et régulant le recrutement de nouveaux neutrophiles. L'axe IL-23/IL-17/G-CSF, décrit précédemment, est ainsi diminué ce qui se traduit par une boucle de régulation négative avec une diminution du recrutement des neutrophiles.

Cette phagocytose s'observe également dans la rate et le foie, où elle est contrôlée par les récepteurs nucléaires Liver X receptor α et β (LXRα et LXRβ). Ces facteurs de transcription, connus pour leur rôle dans l'homéostasie du cholestérol, sont aussi impliqués dans la régulation de l'inflammation (notamment par la répression de la production d'IL-23), et dans la phagocytose par l'augmentation de l'expression du récepteur transmembranaire MERTK (myeloid-epithelial-reproductive tyrosine kinase) (Hong *et al.* 2012).

La présence de neutrophiles dans la moelle semble également limiter les effets du G-CSF sur la niche hématopoïétique. Le G-CSF induit une suppression des ostéoblastes et de leur production de la protéine de matrice osseuse ostéopontine, impliquée dans la rétention des précurseurs hématopoïétiques dans la moelle osseuse (Grassinger *et al.* 2009). Par cette action, le G-CSF augmente la mobilisation des précurseurs et contribue à l'augmentation de la production de neutrophiles en augmentant la quantité de précurseurs disponibles. Toutefois, sous l'effet indirect du G-CSF, les neutrophiles infiltrés dans la moelle produisent de la prostaglandine E2 (PGE_2, un médiateur inflammatoire lipidique dérivé de l'acide arachidonique), qui agit sur les pré-ostéoblastes via son récepteur EP_4 et induit la production d'ostéopontine, restaurant l'ancrage des précurseurs.

Cette synthèse de PGE_2 par les neutrophiles est dépendante de l'activité du système nerveux sympathique via l'activation de récepteurs β-adrénergiques (β3-AR) par la noradrénaline. Ce tonus sympathique est induit par l'action du G-CSF sur les cellules nerveuses G-CSFR$^+$, inhibant ainsi la récupération de la noradrénaline produite (Katayama *et al.* 2006; Kawano *et al.* 2016).

Les neutrophiles participent ainsi à la régulation de l'homéostasie des précurseurs hématopoïétiques dans la moelle osseuse, notamment en participant à des boucles de régulation de leur propre développement.

II.4.2.2 Poumons et surveillance bactérienne

Les neutrophiles sont présents dans le tissu pulmonaire à l'homéostasie. Ils sont principalement localisés dans la vasculature, où ils sont dits « marginalisés », fixés à l'endothélium vasculaire via leurs intégrines et donc très peu mobiles. Les poumons représentent l'une des principales zones d'interaction avec l'environnement, et sont donc régulièrement exposés à de nombreuses agressions comme des polluants, des micro-particules, des allergènes ou encore des micro-organismes pathogènes (grippe) ou opportunistes (*Streptococcus pneumoniae* ou Sp). De plus, la vascularisation des poumons contient environ 10 % du sang total et l'ensemble de la circulation sanguine transite par les capillaires pulmonaires (Dock *et al.* 1961); Andrew Davies 2010), qui peuvent donc être en contact avec des pathogènes passés dans la circulation.

Il est intéressant de noter une production de CXCL12 dans les poumons (Devi *et al.* 2013) et un niveau d'expression de CXCR4 plus élevé que la moyenne sur les neutrophiles

marginalisés, ce qui correspond généralement à un stade « âgé » du neutrophile (Casanova-Acebes *et al.* 2013; Uhl *et al.* 2016). Cette condition âgée correspond aux neutrophiles en fin de vie ou ayant été préalablement confrontés à des pathogènes. Il y aurait donc une rétention des neutrophiles dans les poumons avec un mécanisme similaire à la moelle suivant l'interaction CXCL12/CXCR4. Ces neutrophiles âgés semblent également être la première ligne de défense des poumons, formant la majorité des neutrophiles transmigrant dans le parenchyme pulmonaire.

Dans les poumons, les neutrophiles participent également à l'homéostasie des macrophages alvéolaires qui phagocytent les neutrophiles apoptotiques et diminuent leur production d'IL-23. L'IL-23 contribue à la stimulation de la production de GM-CSF (Granulocyte/Macrophage Colony Stimulating Factor) produit dans les poumons par les LT, les macrophages, les fibroblastes ou encore les cellules endothéliales et épithéliales. Le GM-CSF est indispensable au développement des macrophages alvéolaires et de leurs fonctions immunitaires, notamment la phagocytose et la production de cytokines (TNF-α et IL-6) (Tian *et al.* 2016).

Comme dans les autres organes, cette diminution de l'IL-23 produite induit également une diminution de l'IL-17 qui se traduit par une baisse du recrutement des neutrophiles dans la moelle.

II.4.2.3 La rate : des neutrophiles en soutien aux lymphocytes B

Les neutrophiles sont présents dans la rate, où ils se regroupent au niveau des zones marginales riches en LB. Ces zones sont spécialisées dans l'établissement d'une réponse humorale dépendante et indépendante des LT (Y. -J Liu *et al.* 1991).

Les neutrophiles présents dans ces zones ont été décrits comme étant des neutrophiles « helper » (« B-cell helper » ou N_{BH}) par l'équipe d'Andrea Cerutti, car ils ont une action supportrice des LB aussi bien au niveau de leur survie que de leur production d'anticorps (Puga *et al.* 2012). Cette activité semble indépendante d'un contact entre les deux cellules, les N_{BH} produisant des médiateurs comme BAFF (B-cell activating Factor, CD257), APRIL (A proliferation-inducing ligand, CD256) ou l'IL-21, mais également des structures ressemblant à des NETs (Neutrophil Extracellular Traps) contenant de l'ADN. Via ces mécanismes, les neutrophiles semblent capables de réguler les commutations isotypiques, les hypermutations somatiques ou encore la production d'immunoglobulines des LB.

Les neutrophiles N_{BH} semblent également produire des chimiokines attirant les LB, comme CXCL12 et CXCL13, au niveau des zones marginales de la rate. Ce peuplement extra-folliculaire semble favoriser les réponses humorales rapides indépendantes des LT, les neutrophiles N_{BH} montrant également une activité suppressive des LT $CD4^+$.

Cette position à l'interface entre la rate et la vasculature permettrait donc aux neutrophiles d'exercer à la fois un rôle de sentinelle via le contrôle de l'ensemble des composés transitant dans la rate, et un rôle de soutien à une voie de production plus « innée » d'immunoglobuline, indépendante de centres germinatifs et d'intermédiaires lymphocytaires.

II.4.3 Interconnexion avec le rythme circadien

Plusieurs études ont montré l'importance des neutrophiles dans la régulation de fonctions liées au rythme circadien. Dans les poumons, près de 10% du total des gènes transcrits présentent des oscillations dues au cycle jour/nuit, et près d'un quart de ces transcrits perdent leur oscillation après déplétion des neutrophiles (Casanova-Acebes *et al.* 2018). Parmi ces gènes liés aux neutrophiles, plusieurs groupes impliqués dans certains processus biologiques ont pu être mis en évidence comme des régulateurs du rythme circadien, des gènes de la biosynthèse des lipides, de la réparation de l'ADN, de la transformation cellulaire (carcinogénèse) ou encore de la croissance cellulaire (Casanova-Acebes *et al.* 2018).

De même, la biologie des neutrophiles semble également régulée par le rythme circadien. Par exemple, le « trafficking » et l'infiltration tissulaire des neutrophiles sont optimaux entre 20h et 2h chez l'Homme et la souris (Jilma *et al.* 1999; Casanova-Acebes *et al.* 2013). Des différences ont également été observées sur l'expression de certains marqueurs de surface comme ICAM-1 ou LFA-1 (Lymphocyte Function-associated Antigen 1) (Niehaus *et al.* 2002; Casanova-Acebes *et al.* 2013) ou sur la granulosité cellulaire (Ella *et al.* 2016) au cours de la journée pouvant suggérer un rôle du rythme circadien sur la maturation des neutrophiles. Enfin, la clairance des neutrophiles murins semble plus active le matin (Casanova-Acebes *et al.* 2013).

Toutefois, il reste maintenant à déterminer si ces effets sont dus à un contrôle intrinsèque du rythme circadien sur les neutrophiles ou à des facteurs systémiques. Une étude récente a d'ailleurs pu démontrer le rôle intrinsèque du gène Bmal1 (un gène codant pour un récepteur nucléaire clé dans la régulation de l'horloge circadienne) dans l'induction de CXCR2

par CXCL2, le jour, pouvant ainsi réguler l'infiltration tissulaire et les réponses antimicrobiennes (Adrover *et al.* 2019).

Ainsi, en dehors de la régulation de leur propre développement, les neutrophiles ont également montré des implications dans de nombreuses fonctions biologiques à l'homéostasie.

II.5 Voies d'activation du neutrophile

Les neutrophiles sont capables de fonctions très diversifiées et ont des compétences variées aussi bien dans la lutte directe contre un pathogène que dans l'organisation de la réponse inflammatoire. Pour ce faire, ils sont activés grâce à des récepteurs qui reconnaissent de nombreux motifs endogènes et exogènes et qui entrainent une cascade de signaux permettant l'activation des différentes fonctions du neutrophile. Nous nous intéressons ici aux différentes voies d'activations par les récepteurs du neutrophile et leurs effets. Les fonctions du neutrophile seront abordées dans la partie suivante.

II.5.1 La reconnaissance des pathogènes et des signaux de danger

Les microorganismes dans leur ensemble produisent un grand nombre de dérivés métaboliques ou de produits spécifiques reconnus par les neutrophiles via des récepteurs, les PRR (Pattern Recognition Receptor). Les PRR reconnaissent les PAMP, qui correspondent à des motifs conservés microbiens dans leur intégrité ou transformés par certaines enzymes

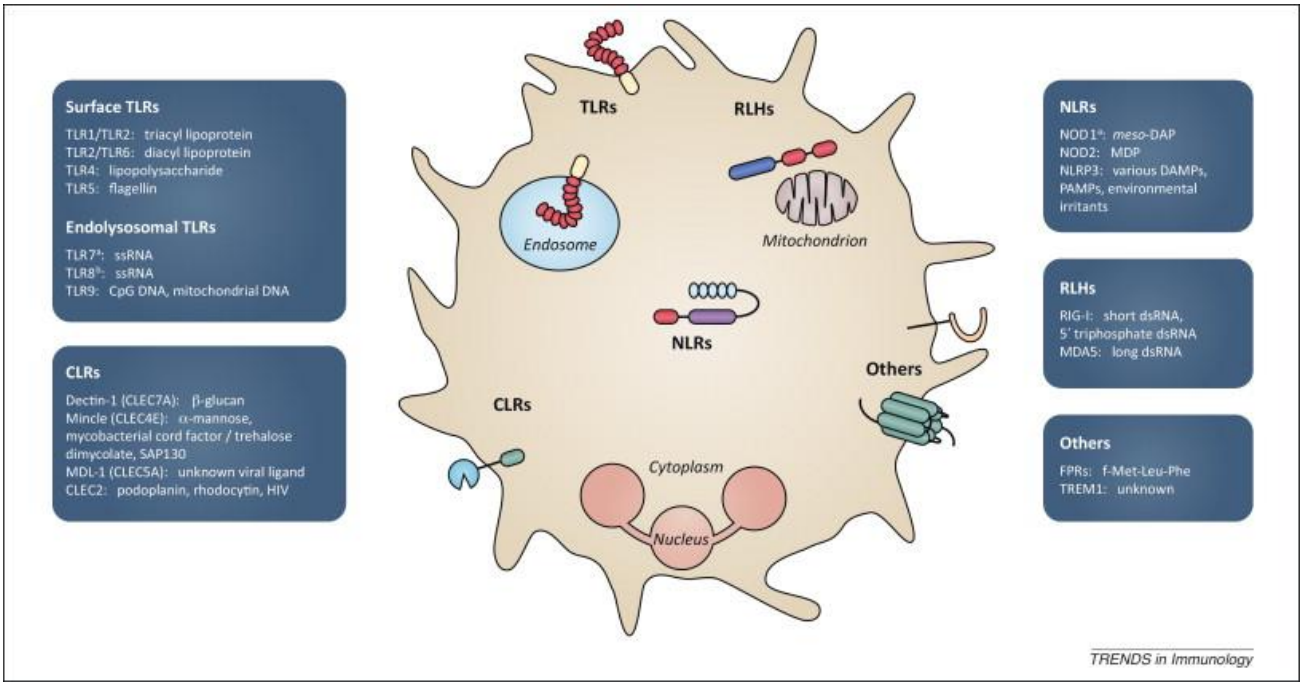


Figure 9 : Les neutrophiles expriment une grande variété de PRR (C.J. Thomas et al. 2013)

présentes dans les tissus. Les PRR peuvent également reconnaitre des DAMP majoritairement produits par les cellules de l'organisme, qui sont très variés dans leur composition. Les neutrophiles expriment ainsi une grande variété de PRR qui leur permettent de reconnaitre des composants de diverses natures (e.g. peptides, lipides, acides nucléiques) issus aussi bien de bactéries que de virus et de champignons (Figure 9).

Tous ces motifs identifiant une agression induisent des réponses spécifiques au pathogène en fonction du récepteur et la voie de signalisation associée, l'environnement dans lequel évolue le neutrophile mais aussi son état d'activation.

II.5.1.1 Les TLR, une grande diversité de reconnaissance

Les PRR les plus étudiés chez le neutrophile sont les TLR (Toll-Like Receptor). Au total, 13 TLR membranaires ou intracellulaires ont été identifiés chez la souris (contre 10 chez l'Homme), mais d'autres sont exprimés parmi les vertébrés (Roach *et al.* 2005).

Les neutrophiles expriment la plupart des TLR à l'exception du TLR endosomal TLR3, ce qui leur permet de reconnaitre une large gamme de composés (Hayashi *et al.* 2003). Les TLR les mieux documentés sont les récepteurs membranaires TLR2 et TLR4, associés respectivement aux bactéries Gram positives et négatives. Ces deux récepteurs peuvent également être activés par des DAMP comme HMGB1 (high-mobility group protein B1) (Park *et al.* 2003; Silva *et al.* 2007).

Le TLR2 reconnait notamment des glycolipides et lipopeptides issus des bactéries, et l'acide lipotéichoïque qui est un composant de la paroi bactérienne des bactéries Gram $^{+}$. Il s'associe en hétérodimère avec le TLR1 ou le TLR6 pour reconnaitre des peptides respectivement Tri- ou Di-acétylés (Figure 10) (Sabroe *et al.* 2002).

Le TLR4 reconnait le LPS (lipopolysaccharide) composant la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Le LPS est particulièrement décrit dans l'activation des neutrophiles et leur survie (Sabroe *et al.* 2002; Colotta *et al.* 1992; Hachiya *et al.* 1995).

Un troisième TLR membranaire est exprimé par les neutrophiles, le TLR5 qui reconnait la flagelline, protéine essentielle au flagelle des bactéries et donc à leur motilité.

Le neutrophile exprime les TLR endosomaux TLR7/8 et TLR9 lui permettant la reconnaissance de matériel génétique souvent issu de la dégradation de pathogène phagocyté

et/ou intracellulaire. Les TLR7/8 et 9 reconnaissent respectivement de l'ARN simple brin (viral ou bactérien) et de l'ADN contenant des motifs d'oligodésoxynucléotides Cytosine-Guanine (CpG ODN) non méthylés, caractéristiques du génome bactérien (Takeuchi *et al.* 2010).

Les TLR induisent la transcription de différents gènes par un mécanisme dépendant d'adaptateurs moléculaires contenant le motif TIR (Toll/interleukin-1 receptor homology domain). Les TLR exprimés par le neutrophile signalent via MyD88 (TLR4 peut aussi signaler via TRIF), un adaptateur contenant un domaine de mort ou DD (Death Domain) en plus d'un motif TIR. Ce DD associé à la mort cellulaire ne semble pas impliqué dans la signalisation du TLR. La plupart des TLR interagissent directement avec MyD88, mais les TLR2 et TLR4 nécessitent un adapteur supplémentaire, TIRAP (TIR domain containing adaptor protein).

MyD88 interagit ensuite avec la kinase à sérine/thréonine IRAK-4 (IL-1R-associated kinase 4) qui active et s'associe avec IRAK-1 et IRAK-2 (Kawagoe *et al.* 2008). Après dissociation de MyD88, l'ensemble des trois IRAK interagit avec TRAF6 (TNFR-associated factor 6) qui agit comme une ubiquitine ligase E3 en recrutant un complexe enzymatique E2 de conjugaison d'ubiquitine composé d'Ubc13 et Uev1A. Le complexe TRAF6-Ubc13-Uev1A catalyse la liaison de poly-ubiquitines liées en K63 (via leur lysine 63) sur TRAF6 avec formation d'une polyubiquitine libre (Xia *et al.* 2009).

La polyubiquitine ainsi formée active ensuite un complexe formé de la kinase TAK1 (TGFβ-Activated Kinase 1) et de ses protéines associées TAB1, TAB2 et TAB3 (TAK1-binding Protein). Ce complexe phosphoryle les enzymes IκB kinase-β (IKK-β) et la Mitogen-activated protein kinase kinase 6 (MAP-KK 6). L'activation de la voie des MAP-K par MAP-KK6 induit la formation du complexe de facteur de transcription Activator Protein 1 (AP-1) qui cible les gènes de certaines cytokines (Figure 10) (Takeuchi *et al.* 2010).

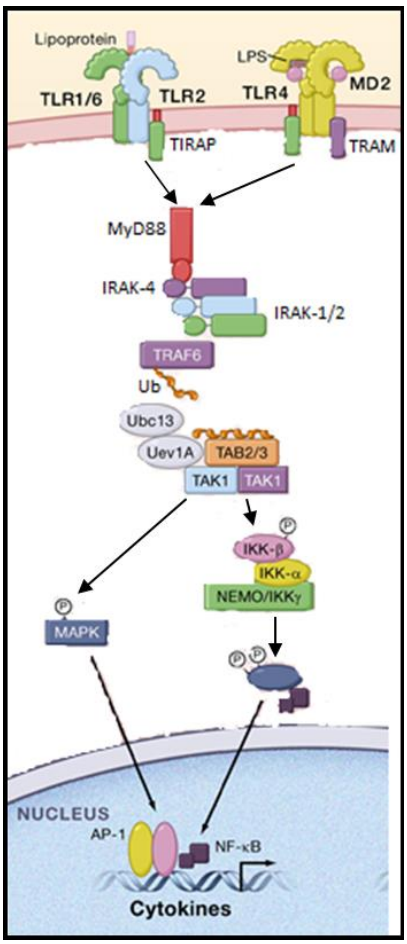


Figure 10 : Signalisation des TLR membranaires du neutrophile. (Adapté de Takeuchi et al. 2010)

Parallèlement, l'enzyme phosphorylée IKK-β s'associe à IKK-α et à NEMO (nuclear factor-kappa B (NF-κB) essential modulator) pour former un complexe IKK qui phosphoryle IκBa, un inhibiteur de NF-κB qui est lié à celui-ci et l'empêche de transloquer dans le noyau. La

phosphorylation d'IκBa entraine la dégradation de celui-ci, ce qui libère NF-κB qui transloque dans le noyau.

L'activation de NF-κB et/ou AP-1 stimule l'expression de cytokines pro-inflammatoires par le neutrophile, comme l'IL-6 ou le TNF-α mais aussi les pro-formes pro-IL-1β et pro-IL-18 qui seront ensuite « maturés » via les inflammasomes.

II.5.1.2 Les RLR, spécifiques de la reconnaissance de l'ARN

En addition des TLR, les récepteurs intracellulaires « Retinoic acid-Inducible Gene (RIG)-I-like Receptors » ou RLR permettent au neutrophile de reconnaitre une variété de fragments d'ARN ou d'ADN endogènes ou pathogènes. Les RLR exprimés par le neutrophile sont RIG-1 et MDA5 (Melanoma Differentiation-Associated gene 5), semblables dans leur construction car comprenant chacun un domaine de recrutement des caspases (CARD) à leur extrémité N-terminale, une hélicase/ATPase centrale formant un DD et un domaine régulateur C-terminal. Ces deux récepteurs reconnaissent de manière complémentaire les ARN double brins, RIG-1 reconnaissant les ARN courts inférieurs à 1 kb et MDA5 les ARN longs supérieurs à 2 kb (C. J. Thomas *et al.* 2013).

Après reconnaissance de ce fragment d'ARN, l'activation des domaines CARD induit une cascade de signalisation en interagissant avec leur adaptateur MAVS (Mitochondrial antiviral-signaling protein ou IPS-1) au niveau de la membrane mitochondriale (Kawai *et al.* 2005).

IPS-1 active par la suite TRAF3, responsable de l'induction de la voie des IFN de type I, acteur principal de la réponse antivirale. L'adaptateur de la voie de signalisation des récepteurs aux TNF, TRADD (TNFR-associated death domain protein), est également activé par IPS-1. TRADD forme un complexe via son DD avec FADD (FAS-associated death domain-containing protein) et RIP1 (Receptor-Interacting Protein 1), provoquant l'ubiquitination de cette dernière, requise pour l'activation de NF-κB (Ermolaeva *et al.* 2008; Pobezinskaya *et al.* 2008).

Parallèlement, FADD active par clivage la caspase-8 ou la caspase-10 qui activent par la suite NF-κB (Takahashi *et al.* 2006).

II.5.1.3 Les NLR et l'inflammasome

La famille des « NOD (Nucleotide-binding Oligomerization Domain)-like receptors » ou NLR regroupe des PRR intracellulaires possédant tous un domaine central NOD et un domaine riche en motif LRR (Leucine Rich Repeat) en C-terminal permettant de reconnaitre un ligand spécifique. Les membres de la famille diffèrent selon leur domaine N-terminal responsable des interactions du récepteur nécessaires à sa signalisation. On dénombre ainsi 4 familles de NLR, avec chacune un domaine différent : A (acidic transactivating domain), B (Baculovirus Inhibitor of apoptosis protein Repeat ou BIR), C (CARD) et P (pyrin domain ou PYD). Les neutrophiles ne semblent exprimer que deux familles de NLR, les NLRC et NLRP.

NOD1 et NOD2, récepteurs appartenant aux NLRC, possèdent un domaine CARD et activent la voie NF-κB via l'adaptateur RIP2 et stimulent en parallèle la production de cytokines pro-inflammatoires. NOD1 reconnait un peptidoglycane bactérien, l'acide g-D-glutamyl-mésodiaminopimélique (iE-DAP), tandis que NOD2 reconnait le peptidoglycane muramyldipeptide. Ces deux récepteurs induisent également la phagocytose des bactéries reconnues, comme le pneumocoque (Ekman *et al.* 2010; Clarke *et al.* 2010; Hommes *et al.* 2015).

Les inflammasomes sont des composants essentiels dans la lutte contre les infections. Ce sont des complexes protéiques permettant notamment la maturation Caspase-1-dépendante et la libération des cytokines inflammatoires IL-1β et d'IL-18. La littérature actuelle indique que le neutrophile exprime de façon fonctionnelle les inflammasomes NLRP1, NLRP3 (M. Hassane *et al.* 2017), NLRP6, NLRP12 et NLRC4 (K. W. Chen *et al.* 2014; Man *et al.* 2015).

L'inflammasome nécessite donc deux signaux pour son activation, le premier signal (priming) est généralement induit par des signaux de type NF-κB et/ou AP-1 en réponse à une stimulation TLR ou à l'engagement de récepteurs à certaines cytokines comme TNF-α ou IL-1β. Le second signal (activation) permet l'assemblage des inflammasomes. Si les signaux activateurs sont plutôt bien décrits pour NLRC4 (flagelline), la diversité de signaux capables d'induire l'assemblage de l'inflammasome NLRP3 semble très large. A titre d'exemple, notre laboratoire a pu mettre en évidence le rôle d'une toxine bactérienne induisant des pores à la membrane produite par le pneumocoque (la pneumolysine) dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 neutrophilique (M. Hassane *et al.* 2017). Toutefois, si les signaux

proximaux capables d'activer NLRP3 sont très variés, les signaux distaux responsables de son activation sont plus restreints et semblent principalement être dépendants de modifications physico-chimiques intracellulaires comme les changements de concentration en potassium (He *et al.* 2016; Jo *et al.* 2016) (Figure 11).

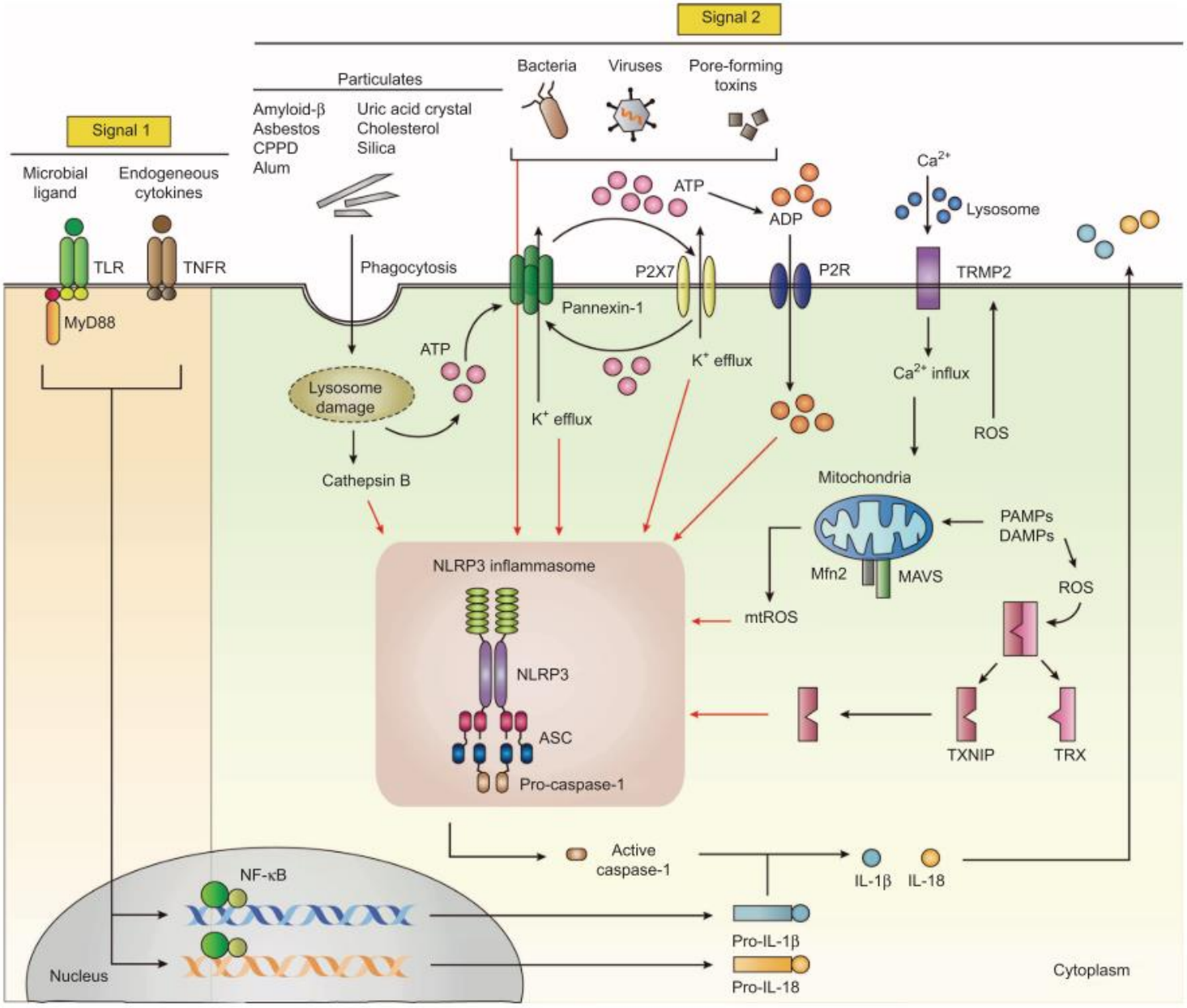


Figure 11 : Les mécanismes complexes d'activation de l'inflammasome NLRP3. (Jo et al. 2016)

L'activation de NLRP3 ou NLRC4 induit leur association avec l'adaptateur ASC (Apoptosis-associated Speck-like protein containing a C-terminal Caspase recruitment domain) via leur domaine pyrine respectif. ASC recrute ensuite la pro-forme de Caspase-1 grâce à son domaine CARD, ce qui active l'enzyme et permet le clivage des formes non fonctionnelles pro-IL-1β et pro-IL-18 en IL-1β et IL-18. En parallèle de cette activité, la Caspase-

1 peut également cliver le lien entre les parties N- et C- terminales de la Gasdermine D, empêchant l'effet inhibiteur de la jonction et activant la Gasdermine D. Cette protéine se lie ensuite aux phosophoinositides de la membrane via sa partie N-terminale, induisant sa propre oligomérisation et provoquant la formation de pores au niveau de la membrane plasmique. Ceci se conclut en la mort du neutrophile, appelée pyroptose (Man et al. 2015; L. Liu et al. 2019).

II.5.1.4 Les CLR, des récepteurs pour les sucres

Les CLR (C-type Lectin Receptor) sont des récepteurs transmembranaires qui reconnaissent principalement certains sucres des microorganismes (bactéries, virus, champignons). Les neutrophiles expriment une large gamme de CLR qui se divise en plusieurs groupes selon la dépendance au calcium des récepteurs et leur nombre de sites de reconnaissance des sucres (CRD, carbohydrate recognition domains) (Geijtenbeek *et al.* 2009).

Les neutrophiles expriment par exemple la Dectine-1 (CLEC7A), qui est un CLR indépendant du calcium et possédant un domaine CTLD (C-type lectin-like domain) pour reconnaitre les β-glucanes des levures et de certaines mycobactéries (Hoving *et al.* 2014). Ils expriment également des récepteurs dépendant du calcium comme Mincle, un CLR avec un CRD qui reconnait l'α-mannose de la paroi des champignons et SAP130, une protéine caractéristique des cellules en nécrose.

Ces récepteurs signalent via SyK (Spleen Tyrosine Kinase) de manière directe ou indirecte, SyK étant couplée aux motifs ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) du récepteur à la chaine γ de la partie Fc (FcγR) pour Mincle (Yamasaki *et al.* 2009) et à des motifs ITAM-like pour la Dectine-1 (Mócsai *et al.* 2010). Le recrutement et la phosphorylation de Syk permet la formation d'un complexe protéique contenant CARD9, Bcl10 (B cell lymphoma 10) et Malt1 (mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1). Ce complexe active par la suite la voie NF-κB, la production de cytokines comme l'IL-10 chez la souris ou encore la phagocytose.

II.5.1.5 Les FPR, de la reconnaissance au chimiotactisme

En dehors des grandes familles de PRR, d'autres types de récepteurs sont également exprimés par le neutrophile pour détecter les bactéries. C'est notamment le cas des récepteurs aux peptides formylés FPR1 et FPR2 (LXA4R). Ces récepteurs couplés à une

protéine G (GPCR) (Figure 12) reconnaissent fMLF (ou fMLP, formyl-Methonine-Leucine-Phenilalanine), un puissant peptide chimiotactique bactérien (M. Liu *et al.* 2012).

La reconnaissance de leur ligand provoque le recrutement de la phospholipase Cβ (PLC) et de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) par le GPCR. PI3K convertit le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP2) membranaire en phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP3).

PIP3 est ensuite clivé en inositol triphosphate (IP3) et en diacylglycerol (DAG) par la PLC (Figure 12) (Futosi *et al.* 2013).

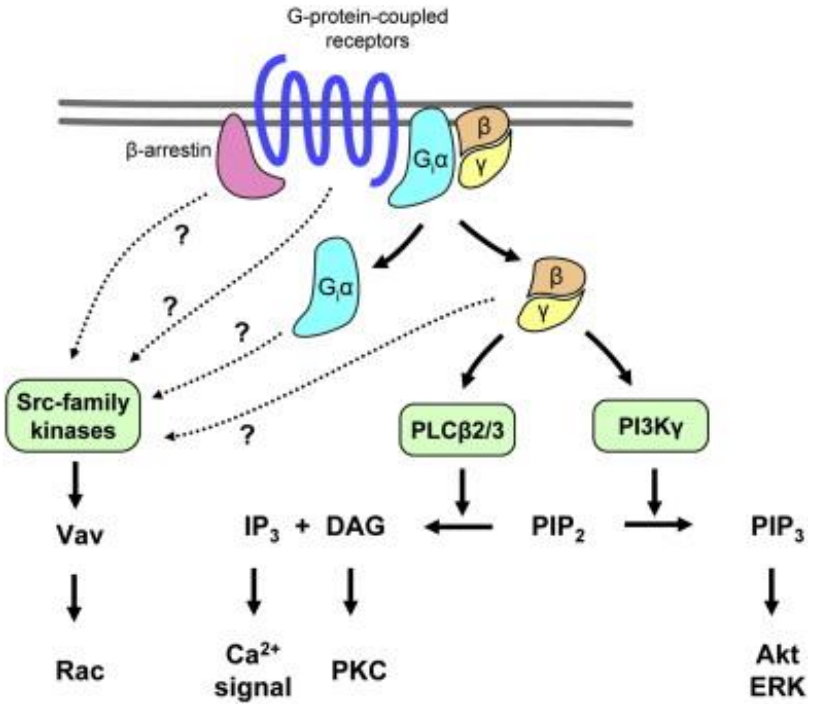


Figure 12 : Signalisation des récepteurs couplés à une protéine G. (Futosi et al. 2013)

Ces deux derniers composés sont des messagers secondaires qui activent notamment la voie NF-κB (Figure 13). IP3 est reconnu par son récepteur IP3R sur la membrane du réticulum endoplasmique, et induit la libération d'ions $Ca2^{+}$. Le calcium libéré permet l'activation de nombreuses enzymes dépendantes du calcium, ce qui entraine notamment la stimulation de la production des ions superoxyde ou ROS (Reactive Oxygen Species) (English 1996).

DAG active en parallèle les isoformes conventionnelles (α et β) de l'enzyme dépendante du calcium PKC (Protein Kinase C), une enzyme importante dans la sécrétion de NETs (Neutrophil Extracellular Traps) (Gray *et al.* 2013). PKC phosphoryle également les sous-unités p40 et p47 de la NADPH Oxidase, enzyme essentielle dans la production de ROS (Figure 13).

Enfin, plusieurs études ont montré le rôle de l'enzyme PI3K dans la migration chimiotactique du neutrophile, notamment en abolissant cette migration avec un traitement par inhibiteur. Le rôle de la kinase n'est toutefois pas réellement connu et l'implication de PIP3 n'a pas été clairement démontrée ou réfutée (K. J. S. S. Martin *et al.* 2015).

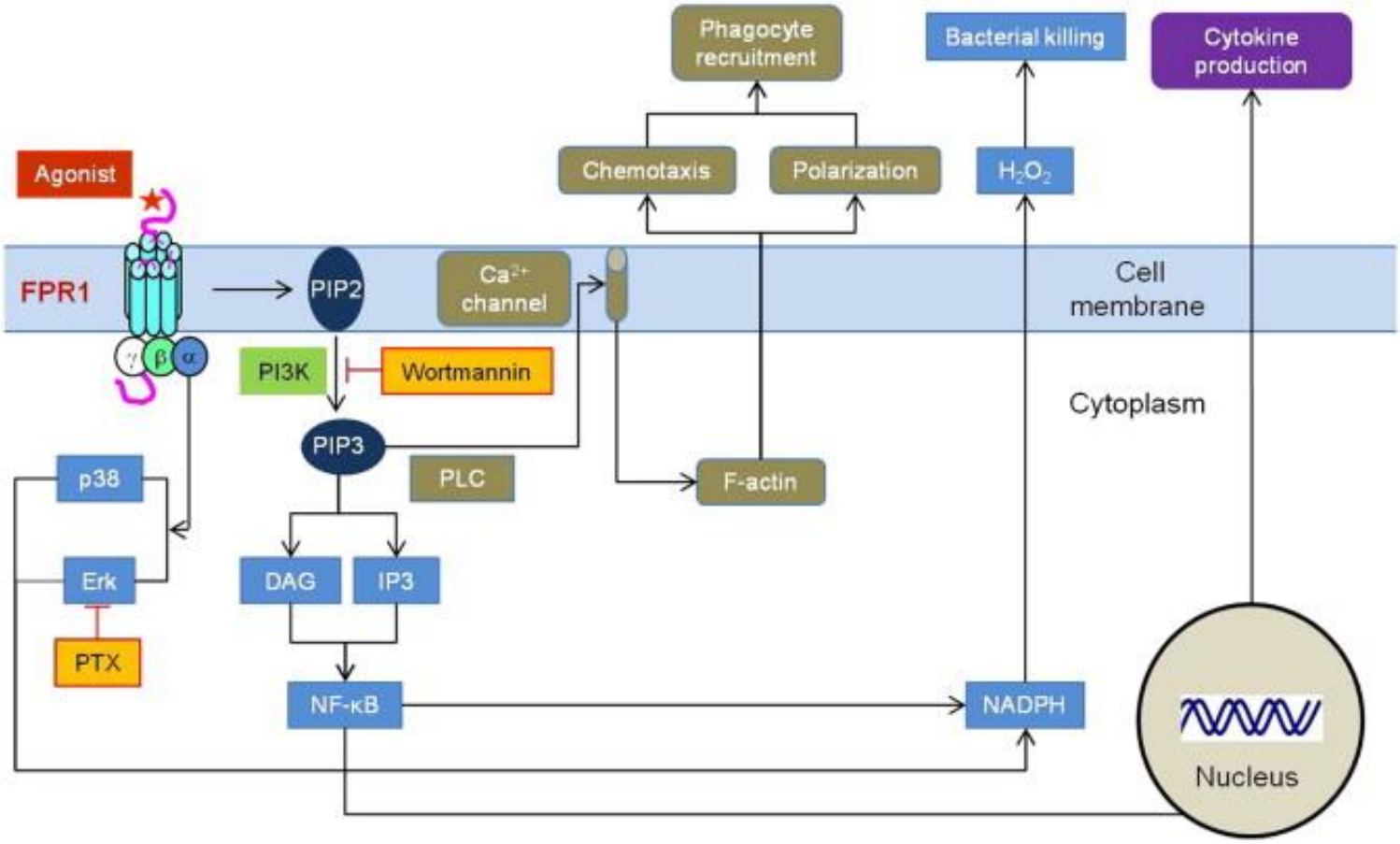


Figure 13 : Signalisation de FPR1 : différentes voies et différents effets pour un seul récepteur. (M. Liu et al. 2012)

II.5.2 L'activation par les récepteurs non PRR

En dehors de l'expression de PRR, les neutrophiles disposent de nombreux récepteurs qui permettent leur activation via la reconnaissance de différents médiateurs. Ces médiateurs sont notamment issus d'autres cellules, immunitaires ou non, et entrainent la migration des neutrophiles et l'activation de leurs capacités spécifiques (Futosi *et al.* 2013).

II.5.2.1 Les récepteurs aux anticorps

Les neutrophiles expriment une variété de récepteurs transmembranaires qui reconnaissent les parties constantes des immunoglobulines après opsonisation des pathogènes. Les neutrophiles sont ainsi capables de reconnaitre différents types d'immunoglobulines, notamment les IgG (chaine γ) et IgE (chaine ε), ainsi que les IgA (chaine α) pour les neutrophiles humains (Figure 14) (Futosi *et al.* 2013).

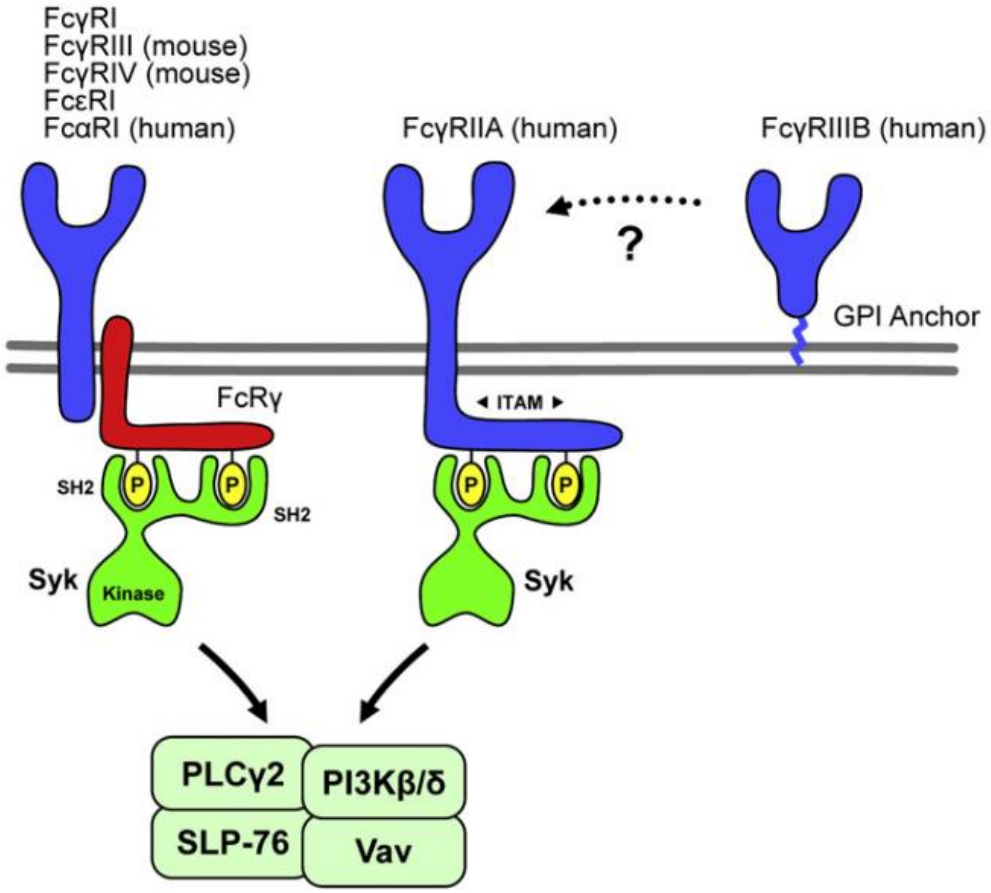


Figure 14 : Récepteurs au fragment Fc des anticorps exprimés par les neutrophiles et voies de signalisation. (Futosi et al. 2013)

Les neutrophiles reconnaissent les IgG via leurs récepteurs FcγRI (CD64), FcγRIII (CD16) et FcγRIV (CD16-2) chez la souris, et FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32) et FcγRIIIB (CD16b) chez l'Homme (Mechetina *et al.* 2002; Guyre *et al.* 1990; Repp *et al.* 1991; Bruhns 2012; Tsuboi *et al.* 2008). La reconnaissance des IgE est assurée chez les deux espèces par FcεRI et FcεRII (CD23) (Vella *et al.* 1999; Saffar *et al.* 2007). Enfin, la reconnaissance des IgA n'a été démontrée que chez l'Homme, via FcαRI (CD89) (Navegantes *et al.* 2017; Otten *et al.* 2004).

La plupart de ces récepteurs (à l'exception des FcγR IIA et IIIB humains) sont couplés de manière non covalente à un adaptateur transmembranaire contenant un motif ITAM intracellulaire, FcRγ (Fc-receptor γ-chain).

Du fait du manque d'études chez le neutrophile, la phosphorylation de ce motif ITAM reste peu compris jusqu'à maintenant. Il semblerait que la famille des Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src (ou famille des kinases Src) soit impliquée (Futosi *et al.* 2012; Au-Yeung *et al.* 2009; M. Turner *et al.* 2000; Saijo *et al.* 2003; Fitzer-Attas *et al.* 2000).

Le signal du Fc récepteur fait ensuite intervenir plusieurs acteurs au sein d'un complexe, comme l'adaptateur SLP-76 qui semble nécessaire pour l'activation de la voie du calcium et la production de ROS par la NADPH Oxidase NOX2. Cette activation par les FcR requiert également Vav3 (Vav guanine nucleotide exchange factor 3) et la GTPase Rac2, essentielle dans l'activation de la NADPH Oxydase qui produit les ROS (C. Kim *et al.* 2001; Utomo *et al.* 2006; Nguyen *et al.* 2017). Il semble également que la participation des PI-3 kinases PI3Kβ et PI3Kδ soit importante dans le signal Fc-récepteur dépendant (Kulkarni *et al.* 2011).

En plus de ces actions inflammatoires, la reconnaissance d'une immunoglobuline provoque la phagocytose du pathogène opsonisé, participant de manière active à l'immunité innée et la clairance bactérienne (Nordenfelt *et al.* 2011).

II.5.2.2 Les récepteurs aux cytokines

Du fait de leur nature innée, les neutrophiles expriment constitutivement un large panel de récepteurs aux cytokines. Ces médiateurs de l'immunité sont produits par les cellules de l'hôte (immunitaires ou non) et permettent l'initiation et la régulation de la réponse immunitaire face à une agression. La reconnaissance de ces facteurs par le neutrophile aboutit à son activation, à une augmentation de sa survie et à l'acquisition de certaines fonctions.

Les neutrophiles expriment quatre grandes familles de récepteurs qui se distinguent notamment par leur mode d'action et de signalisation. Nous aborderons ici les mécanismes de chaque famille qui sont assez bien étudiés, bien que les spécificités d'action de chaque récepteur soient, encore à ce jour, peu connues.

II.5.2.2.1 Les récepteurs aux cytokines de type I et II

Les cytokines de type I et II sont des protéines contenant respectivement 4 et 6 hélices alpha et qui se lient à leur récepteur via un motif d'acides aminés WSXWS.

Le neutrophile exprime, dans la première famille, les récepteurs aux interleukines IL-4, IL-6, IL-12 et IL-15, ainsi qu'aux facteurs de croissance G-CSF and GM-CSF, et dans la deuxième famille les récepteurs aux interférons de type I (IFN-α, IFN-β) et II (IFN-γ) et à IL-10 (Futosi *et al.* 2013).

Ces récepteurs fonctionnent en homodimères ou hétérodimères qui activent la voie des tyrosine kinases JAK (Janus kinase) aboutissant à la phosphorylation des tyrosines des protéines de la famille STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription) (Gadina *et al.* 2001). Après phosphorylation, les STAT forment des dimères et transloquent dans le noyau où elles exercent leur fonction de régulateur transcriptionnel (Figure 15) (Ghoreschi *et al.* 2009; O'Shea *et al.* 2012).La famille des IL-1R, des récepteurs Toll-like

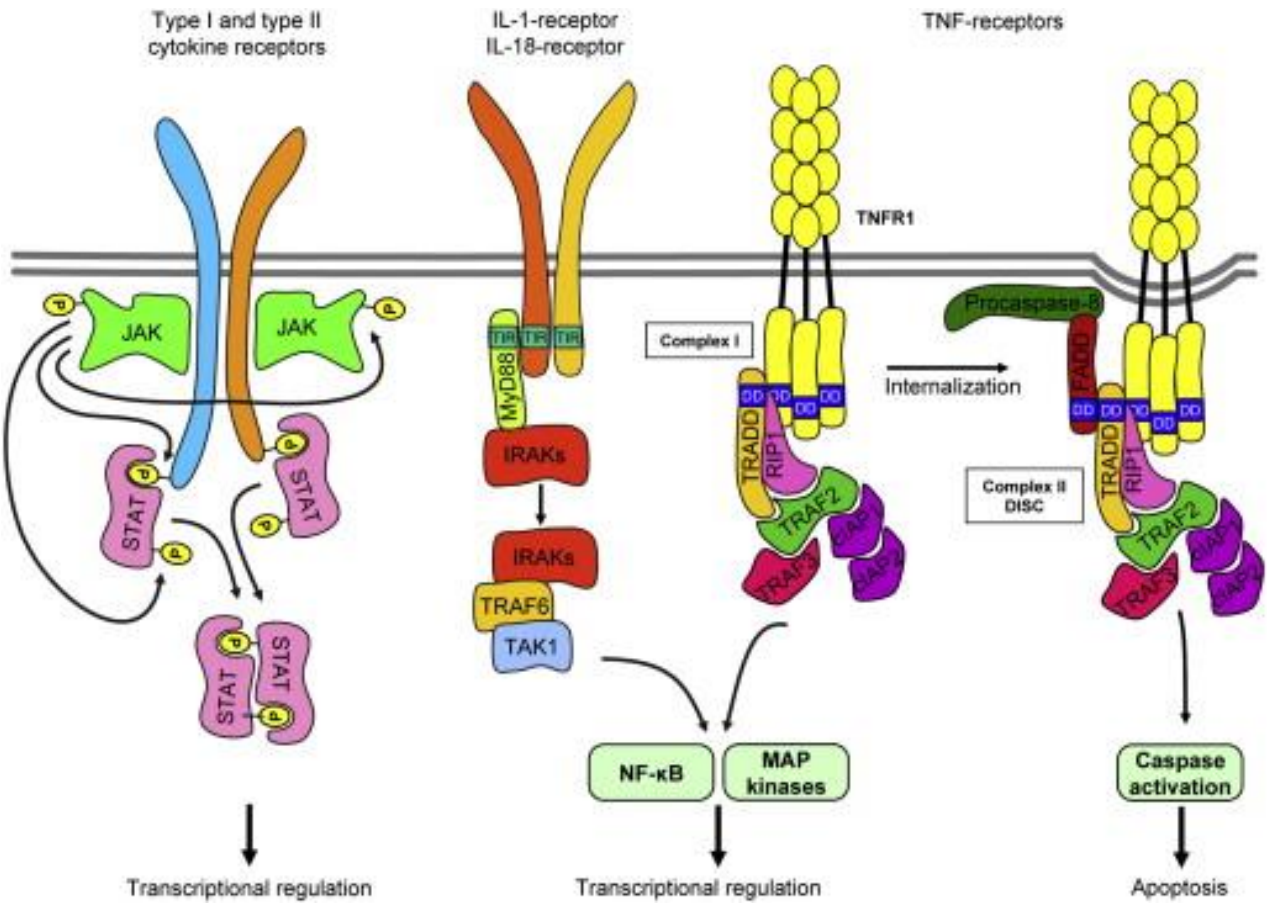


Figure 15 : Récepteurs aux cytokines exprimés par les neutrophiles et voies de signalisation. (Futosi et al. 2013)

Les neutrophiles expriment les récepteurs IL-1RI (récepteur d'IL-1α et IL-1β) et IL-18R (récepteur d'IL-18), qui signalent notamment via MyD88 à la manière des TLR (Cf partie TLR) (Rhyne *et al.* 1988; Fasano *et al.* 1991; Spriggs *et al.* 1992). La reconnaissance des ligands, et particulièrement d'IL-18 (Fortin *et al.* 2009; Hewins *et al.* 2006), induit ainsi le recrutement de MyD88 via les domaines TIR du récepteur, ce qui provoque la libération des IRAK et l'interaction avec TRAF6 et TAK1 pour activer la voie NF-κB (Figure 15).

En parallèle, TAK1 active les enzymes MKK qui à leur tour activent les MAP kinases ERK (Extracellular signal–Regulated Kinase), JNK (c-Jun N-terminal kinase) et p38 (Fortin *et al.* 2009; Hewins *et al.* 2006) (Figure 15).

II.5.2.2.2 La famille des récepteurs aux TNF

Cette famille regroupe une variété de récepteurs qui répondent aux différents facteurs de nécrose des tumeurs (Tumor Necrosis Factor) et induisent une inflammation et aussi l'apoptose des cellules.

Les neutrophiles expriment les deux récepteurs au TNF-α TNFR1 et TNFR2 et d'autres récepteurs de la même famille reconnaissant des composés différents des cytokines (Futosi *et al.* 2013; Kilpatrick *et al.* 2006).

La pluralité de cette famille de récepteurs exprimés par le neutrophile est représentée par la dualité de TNFR1 et TNFR2, récepteurs pro-inflammatoires et anti-apoptotiques mais pouvant également être la source de signaux pro-apoptotiques dans le cas de TNFR1 (Boutaffala *et al.* 2015; H. Zhang *et al.* 2017; Fritsch *et al.* 2017).

Le signal pro-inflammatoire est induit par le recrutement de TRAF2, TRAF3, cIAP1 et cIAP2 (Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 1 et 2), formant le complexe 1 qui active les voies NF-κB et JNK. Ce complexe est formé par le recrutement des protéines directement sur le récepteur dans le cas de TNFR2, ou via les adaptateurs TRADD et RIP1 pour TNFR1 (Figure 15) (Ting *et al.* 1996; Hsu *et al.* 1996).

TNFR1 est cependant capable de transmettre un signal pro-apoptotique via la formation du complexe 2 ou DISC (Death Induced Signaling Complex) après ubiquitination et internalisation du complexe 1. Cela provoque le recrutement de RIP3, FADD, et de la procaspase-8 qui une fois sous sa forme clivée et active induit l'apoptose dans le neutrophile (Figure 15).

II.5.2.2.3 Les récepteurs aux cytokines de la famille des TGF-β

Il existe peu de données sur le rôle des cytokines de la famille des Transforming Growth Factor β sur l'activité des neutrophiles, même si ceux-ci expriment par exemple les récepteurs hétérodimériques TβRI/TβRII (récepteur au TGF-β) (Batlle *et al.* 2019) ou ActRI/ActRIIA (récepteur à l'activine A) (Y. Qi *et al.* 2017). L'effet de cette famille de cytokines est peu connu, en dehors d'une potentielle activation par l'activine A et d'une polarisation des neutrophiles associés au tumeurs (TAN) en neutrophile pro-tumoral (Fridlender *et al.* 2009). L'action de ces cytokines semble dépendre du contexte dans lequel est le neutrophile.

Les mécanismes généraux de la signalisation de ces récepteurs hétérodimériques sont en revanche connus, le récepteur de type II phosphorylant le récepteur de type I après reconnaissance d'un ligand. Le récepteur de type I phosphoryle ensuite Smad2 et Smad3, qui forment un trimère avec Smad4 et transloquent dans le noyau pour cibler les gènes à réguler. Les cibles ne sont pas clairement identifiées, on peut cependant citer un rôle de l'activine A dans la production d'IL-6 et d'O_2^-, ainsi que dans la hausse de la phagocytose (Y. Qi *et al.* 2017; Kang *et al.* 2009).

II.5.2.3 Les récepteurs aux chimiokines

Les chimiokines sont des molécules produites par l'organisme dont la fonction principale est d'attirer certaines cellules vers un tissu spécifique. Nous avons déjà vu le rôle de certaines chimiokines à l'homéostasie comme CXCL12, qui permet de retenir les neutrophiles dans la moelle notamment, grâce à son interaction avec CXCR4 exprimé par le neutrophile.

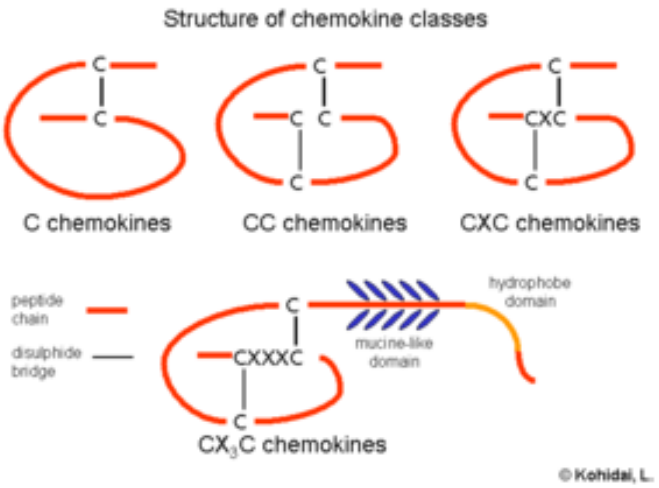


Figure 16 : Structure des différentes chimiokines.

Les neutrophiles expriment de nombreux récepteurs aux chimiokines, répartis en deux types : les récepteurs aux chimiokines CC et CXC. Cette terminologie correspond aux acides aminés N-terminaux des chimiokines, en motif Cystéine-Cystéine ou Cystéine-X (acide aminé aléatoire) -Cystéine (Figure 16). Les neutrophiles peuvent ainsi exprimer les récepteurs CCR1, CCR2, CCR3, CCR5, CXCR1, CXCR2, CXCR3 et CXCR4 (Futosi *et al.* 2013; Rudd *et al.* 2019). Il est intéressant de noter que les neutrophiles peuvent produire les principaux ligands (respectivement) de ces récepteurs : CCL3 (MIP-1α), CCL2 (MCP-1), CCL11 (éotaxine), CCL4 (MIP-1β), CXCL8 (IL-8, Homme uniquement), CXCL1 (GRO-α), CXCL11 (IP-9) et CXCL12 (SDF-1) (Tecchio *et al.* 2016).

Seul CXCR2 est exprimé très fortement par les neutrophiles circulants, tandis que l'expression des autres récepteurs chimiokiniques est faible voire absente à l'homéostasie. En revanche, l'ensemble des récepteurs voient leur expression augmenter après une première stimulation, via le G-CSF (Ottonello *et al.* 2005; S. S. Cheng *et al.* 2001) ou au cours d'une infection comme celle induite par le virus *Influenza* (Rudd *et al.* 2019).

En dehors de leur rôle « attractant », les chimiokines peuvent également activer certaines fonctions du neutrophile et initier la réponse innée. En effet, les récepteurs aux chimiokines transmettent leurs signaux grâce à leur couplage avec une protéine G, qui induit la migration cellulaire mais aussi l'initiation de la phagocytose ou encore la production de NETs. (Cf. II.5.1.5)

II.5.2.4 Autres récepteurs

En dehors des récepteurs aux médiateurs produits par d'autres cellules, les neutrophiles expriment les récepteurs au leukotriène B_4 (LTB_4) BLT1 et BLT2 (Houard *et al.* 2009; Rabiet *et al.* 2007), au facteur d'activation des plaquettes (PAF) PAFR (Stafforini *et al.* 2003) et au fragment C5a du complément C5aR (Rabiet *et al.* 2007). Ces récepteurs sont couplés à une protéine G dont le fonctionnement a été vu précédemment (Cf.II.5.1.5). La principale caractéristique de ces composants est leur fort pouvoir chimiotactique, LTB_4 étant par exemple connu pour sa capacité à attirer les neutrophiles (Oliveira *et al.* 2008). L'activation des différentes fonctions des neutrophiles peut également être induite, ainsi la reconnaissance du fragment C5a par le neutrophile induit la dégranulation, la phagocytose ou encore la production de ROS en plus d'un effet chimiotactique (Becker *et al.* 1985; Perianayagam *et al.* 2004; Eirik Mollnes *et al.* 2002).

Les neutrophiles expriment également certains membres de la famille des TNFR qui reconnaissent des ligands membranaires, comme le récepteur Fas (Renshaw *et al.* 2000; Croker *et al.* 2011), les récepteurs de mort TRAIL-R2 (CD262) et TRAIL-R3 (CD263) (Kamohara *et al.* 2004; McGrath *et al.* 2011), RANK (Receptor activator of nuclear factor κB) (Riegel *et al.* 2012) et le récepteur à la lymphotoxine-β LTβR (Wimmer *et al.* 2012). Leur activation mène aux mêmes voies que celles activées par les TNFR reconnaissant des cytokines (Cf.II.5.2.2.2).

Ainsi, nous venons de voir que le neutrophile exprime une myriade de récepteurs de différentes natures et localisés dans différents compartiments lui permettant d'exercer de nombreuses fonctions en réponse à des stimuli très variés.

II.6 Fonctions du neutrophile

Les neutrophiles ont longtemps été décrits comme ayant uniquement des fonctions de phagocytose, nécessitant leur migration jusqu'au lieu d'infection et un contact avec le pathogène pour déployer leur activité antimicrobienne. Toutefois, les études récentes montrent une pléthore de fonctions déployées par les neutrophiles, qui englobe une activité antimicrobienne à distance via les NETs, une activité cytotoxique sur les cellules tumorales et un large éventail de fonctions immunorégulatrices en interaction avec une grande variété de cellules de l'immunité.

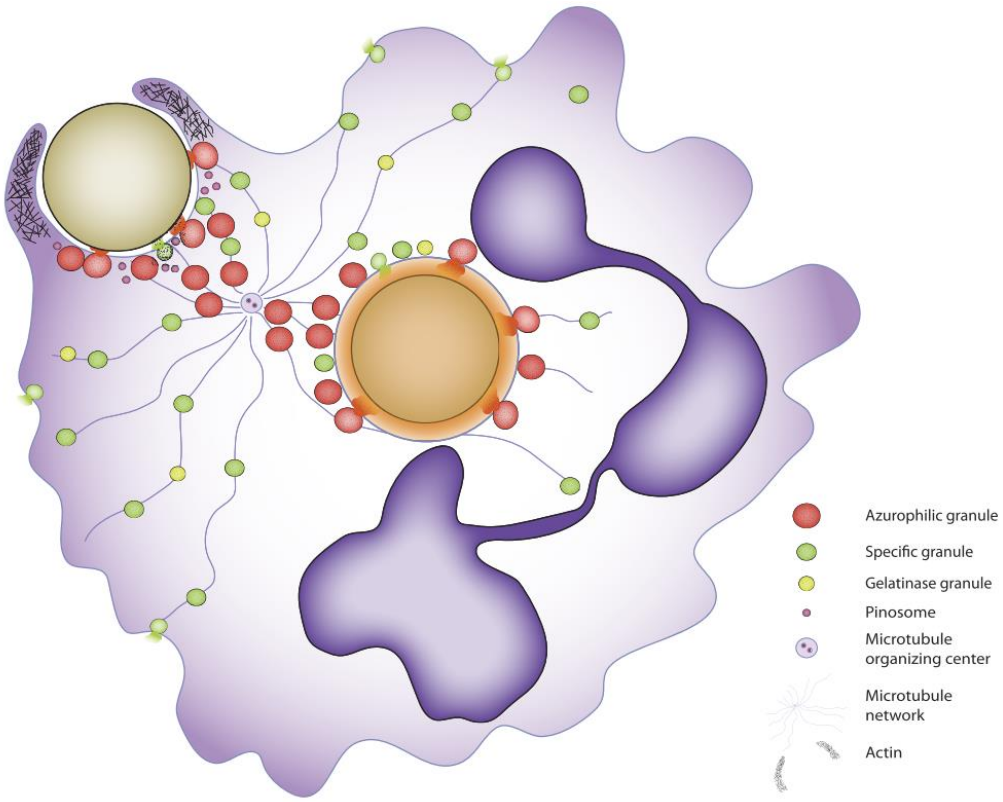


Figure 17:Mécanismes de phagocytose par le neutrophile. (Nordenfelt et al. 2011)

II.6.1 Fonctions antimicrobiennes et cytotoxiques

II.6.1.1 La phagocytose, défense essentielle contre les microbes

Comme nous l'avons vu précédemment, de nombreuses voies d'activation du neutrophile mènent à la phagocytose de particules voire de cellules entières. Après reconnaissance de PAMP ou de DAMP, d'anticorps ou encore du complément, le neutrophile procède à la phagocytose de la particule ou du pathogène cible. Pour ce faire, le neutrophile (et les phagocytes de manière générale) procède tout d'abord par un enveloppement de la cible en modifiant son cytosquelette d'actine/myosine. Ces modifications s'opèrent grâce aux GPCR et aux lipides membranaires modifiés par la voie de signalisation de ces récepteurs (Figure 17).

En effet, la formation de PIP3 est essentielle à la phagocytose de grosses particules (diamètre >0.5 µm) et au recrutement de la PLC (Levin *et al.* 2016). A son tour, la PLC permet le recrutement de différents facteurs qui induisent la formation d'un réseau d'actine qui modifie le cytosquelette du neutrophile, le préparant à la phagocytose. Ce procédé, de quelques minutes chez le macrophage, est extrêmement rapide chez le neutrophile et dure généralement moins de 20 secondes (Segal *et al.* 1980). A la différence des macrophages où le phagosome fusionne avec le lysosome pour dégrader les particules phagocytées, la fusion s'opère chez le neutrophile avec les granules (Figure 18) (Nordenfelt *et al.* 2011).

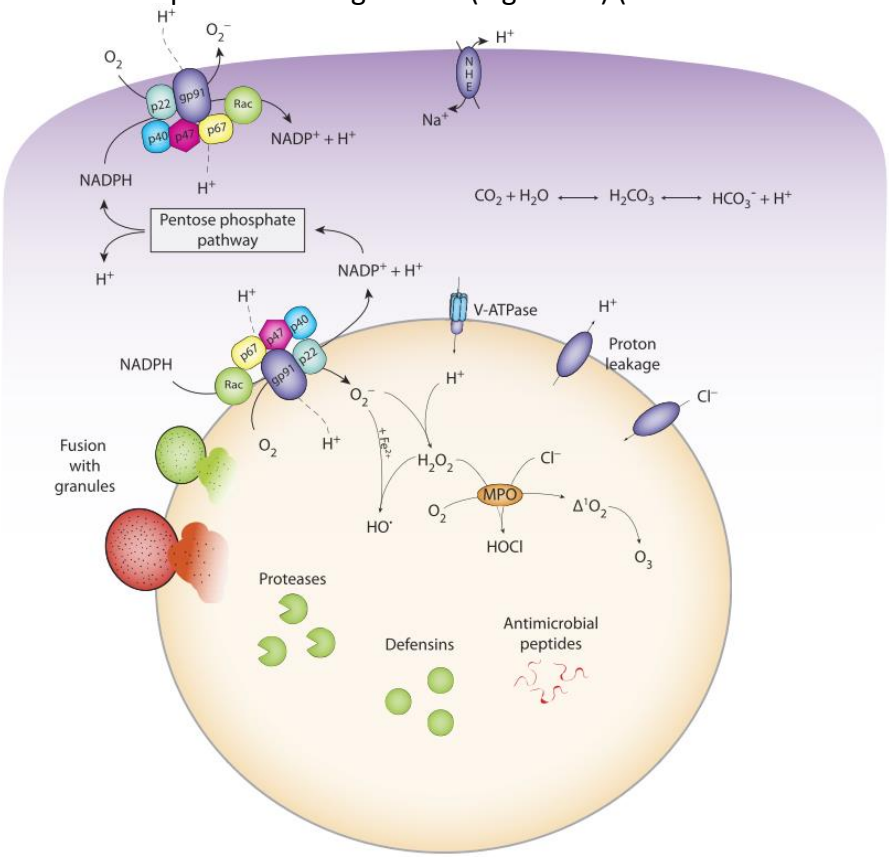


Figure 18 : Devenir du phagosome et rôle des composés produits par le neutrophile. (Nordenfelt et al. 2011)

La dégranulation, que nous verrons dans la partie suivante, est essentielle pour la prise en charge des pathogènes car elle apporte un grand nombre de molécules antibactériennes dans le phagosome et des enzymes sur sa membrane, comme NOX qui produit des ROS (Figure 18). Cet arsenal est très efficace pour détruire les pathogènes, et permet une redoutable efficacité en étant couplé au rythme élevé de phagocytose (Levin *et al.* 2016).

II.6.1.2 Les granules et la dégranulation

Comme nous l'avons vu précédemment, les neutrophiles développent quatre types de granules au cours de leur maturation.

Ces granules peuvent aussi bien fusionner avec les vésicules de phagocytose (Figure 18) qu'avec la membrane plasmique du neutrophile, permettant la libération de leur contenu à l'extérieur de la cellule. Ainsi, de nombreuses molécules libérées ont une action microbicide dans le milieu, et augmentent les capacités antimicrobiennes du neutrophile par des mécanismes indépendants de contacts directs (Figure 19).

II.6.1.2.1 Les granules primaires ou azurophiles

Ces granules sont les premiers à être produits et contiennent de nombreuses protéines à action antibactérienne directe ou indirecte. C'est notamment le cas de la MPO (que nous verrons dans la partie suivante), de protéases facilitant cette action (Cathépsine G, protéinase 3 PR3 et neutrophile élastase NE) (Weinrauch *et al.* 2002; Castanheira *et al.* 2019), de défensines ou encore du lysozyme (Rørvig *et al.* 2013; Feuk-Lagerstedt *et al.* 2007). Ces protéines sont présentes en proportions variées selon les granules et le moment de leur production lors du stade promyélocyte (Faurschou *et al.* 2002). Dans tous les cas, la présence de ces nombreuses protéines permet d'assurer une lutte efficace contre des pathogènes variés, virus inclus (Spitznagel 1990; Elsbach *et al.* 1998; Ganz *et al.* 1985; Wilson *et al.* 2013). Ces granules peuvent être exocytés mais la majorité fusionne avec un phagosome pour lyser son contenu.

II.6.1.2.2 Les granules secondaires ou spécifiques

Les granules spécifiques ont un rôle plus diversifié par rapport aux granules azurophiles. Ils contiennent des molécules antimicrobiennes complémentaires du contenu des granules primaires, mais ils sont également essentiels pour la migration du neutrophile et pour

transformer l'environnement du neutrophile, le rendant moins hospitalier aux microbes (Figure 19).

Les granules spécifiques sont ainsi les premiers granules à être produits qui possèdent des protéines transmembranaires qui seront sécrétées au niveau de la membrane plasmique après activation du neutrophile (Elstak *et al.* 2012; Brochetta *et al.* 2008). On peut par exemple citer les β2-intégrines CD11b et CD18, dont les déficiences provoquent les maladies LAD (Leucocyte adhesion deficiency) où les neutrophiles perdent en partie leurs capacités d'extravasation (Häger *et al.* 2010).

Les granules spécifiques peuvent également apporter les sous-unités gp91^{phox} (NOX2) et p22^{phox} de la NAPDH oxydase, nécessaire pour la production de ROS (Figure 18) (Ambruso *et al.* 2004), et le récepteur TNFR1 qui augmente la réponse du neutrophile aux signaux pro-inflammatoires (Porteu *et al.* 1992).

En parallèle de ces protéines membranaires, des protéines assurant différents rôles sont contenues dans les granules secondaires, comme la collagénase pour le remodelage tissulaire ou encore la lactoferrine et les cathélicidines (hCAP-18 clivée en LL-37 chez l'Homme, CRAMP-1/2 chez la souris) pour l'activité antimicrobienne (Cowland *et al.* 1995).

Membrane proteins			
Azurophil granules	**Specific granules**	**Gelatinase granules**	**Secretory vesicles**
N.a.	CD11b/CD18, CD66, CD67	CD11b/CD18, CD67	CD11b/CD18, CD67
N.a.	Gp91phox/p22phox	Gp91phox/p22phox	Gp91phox/p22phox
N.a.		MMP25	MMP25
N.a.	TNFR[c], uPAR	TNFR[c]	LIR1–4,-6,-7,-9[c]; CD35; CD16; C1q-R; IFN-αR1 and IFN-αR2[c];IFN-γR1 and IFN-γR2[c]; TNFR1 and TNFR2[c]; IL-(1,4,6,10,13,17,18)R[c]; TGF-βR2[c]; CXCR-1[c]; CXCR-2[c]; CXCR-4[c]; CCR-1, -2, -3[c]; Ig(G,A,E)FcR[c]; TLR-1, -2, -4, -6, -8[c]; CD14; MyD88[c]; MD-2[c]; fMLPR; TREM1[c]
CD63, CD68, presenilin	SNAP-23, VAMP-2, Stomatin, PGLYRP[c]	SNAP-23, VAMP-2, Nramp1	SNAP-23, VAMP-2, Nramp1, alkaline phosphatase, DAF, CD10, CD13
Matrix Proteins			
Elastase, cathepsin G, proteinase 3	Collagenase, Gelatinase, uPA, cystatin C[c], cystatin F[c]	Gelatinase, arginase 1	Plasma proteins
Defensins, BPI, MPO, lysozyme	hCAP18, NGAL, B12BP, lysozyme, lactoferrin, haptoglobin, pentraxin 3, prodefensin	Lysozyme	N.a.
Sialidase, Azurocidin, β-glucoronidase, azurocidin	α1-anti-trypsin[c], SLPI, orosomucoid, heparanase, β2-microglobulin, CRISP3	β2-microglobulin, CRISP3	N.a.

[a]Abbreviations: B_{12}BP, vitamin B12 binding protein; CRISP, cysteine-rich secretory protein; DAF, decay-accelerating factor; Gp, granule protein; LIR, immunoglobulin-like receptor; n.a., not applicable; uPA, urokinase plasminogen activator.
[b]Localization of proteins in the matrix and the membrane of neutrophil granules and secretory vesicles. The list is not completely exhaustive but illustrates the major classes of proteins found in the various types of neutrophil granules. Yellow, adhesion molecules; blue, receptors; orange, antibacterial proteins; green, proteases; colorless, other functional classes of proteins.
[c]The localization is inferred from the gene expression profile according to the targeting-by-timing hypothesis but has not been confirmed at the protein level.

Figure 19 : Composition des différentes granules du neutrophile. (Borregaard et al. 2007)

II.6.1.2.3 Les granules tertiaires ou à gélatinase

Comme leur nom l'indique, ces granules se caractérisent par une forte concentration en gélatinase B (collagénase IV ou MMP9). Ces granules sont libérés avant les granules secondaires dont ils partagent en partie la composition (Figure 19) (Borregaard *et al.* 2007), permettant vraisemblablement l'extravasation des neutrophiles avant de libérer les molécules antimicrobiennes (Benarafa *et al.* 2017).

II.6.1.2.4 Les vésicules de sécrétion

Seuls granules produits tout au long de la vie du neutrophile mature, les vésicules de sécrétion semblent être exocytées en parallèle de l'endocytose réalisée par le neutrophile (N. Borregaard *et al.* 1987). En dehors de composants présents également dans les granules secondaires et tertiaires comme les intégrines ou les sous-unités de NOX2, la particularité des vésicules de sécrétion est d'apporter un nombre varié de récepteurs à la membrane plasmique (Figure 19).

Ainsi, une grande partie des récepteurs aux médiateurs inflammatoires que peut exprimer le neutrophile est apportée par ces vésicules, permettant une activation innée de la cellule et la mise en place d'une réponse adaptée à un pathogène spécifique via sa reconnaissance directe (FPR, TLRs etc.) (Rørvig *et al.* 2013).

II.6.1.3 Les ROS et RNS

L'une des fonctions du neutrophile les mieux étudiées actuellement est sa capacité à générer un nombre important d'espèces oxydatives, lors de « l'explosion oxydative » ou « respiratory burst ». Cette production est majoritairement assumée par NOX, une enzyme multimérique transmembranaire contenue dans les granules. NOX est composée des sous-unités transmembranaires NOX2 et $p22^{phox}$, en association avec les protéines solubles $p40^{phox}$, $p47^{phox}$, $p67^{phox}$ et rac (El-Benna *et al.* 2016) (Figure 20).

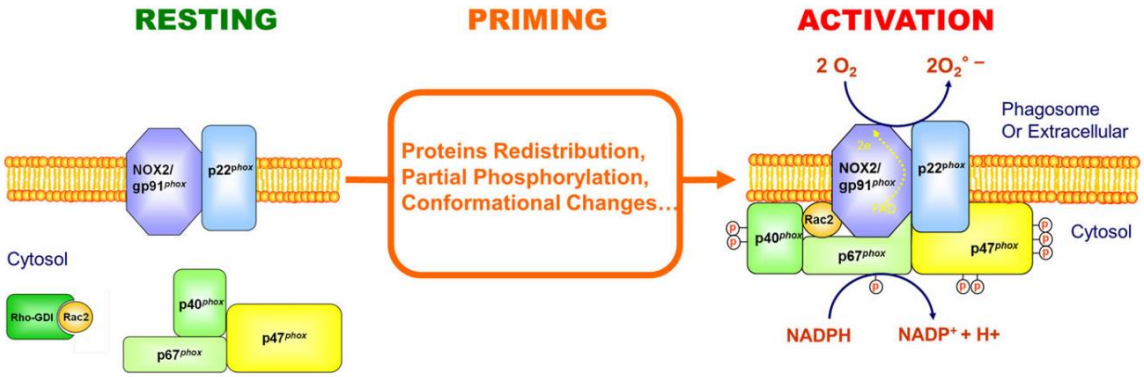


Figure 20 : Mécanismes de production des ROS par l'enzyme multimérique NOX. (El-Benna et al. 2016)

L'enzyme fonctionnelle NOX oxyde les molécules de NADPH en $NADP^+$ avec formation d'ion O_2^-. L'ion superoxyde peut ensuite réagir avec des protons H^+ (avec ou sans catalyse enzymatique par la SuperOxyde Dismutase ou SOD) pour donner du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 ou des radicaux hydroxyl HO^-, au fort pouvoir oxydant. Cette réaction peut aussi bien se produire dans le phagosome que dans le milieu extracellulaire, après dégranulation et mise en place de NOX2 dans la membrane plasmique (Dupré-Crochet *et al.* 2013). Les déficiences en NOX2 sont la cause de la granulomatose septique chronique, une maladie génétique récessive mais pouvant être liée au chromosome X. Cette maladie se caractérise par de nombreuses infections graves qui peuvent être létales (Stasia *et al.* 2008).

L'une des enzymes les plus importantes et les plus associées au neutrophile est la MPO (van der Veen *et al.* 2009). Cette enzyme, présente dans les granules primaires, catalyse la production d'acide hypochloreux HOCl (ou autre acide halogéné) et d'autres intermédiaires à partir de l'H_2O_2 produit par NOX. Les cibles de ces intermédiaires létaux sont très variées (lipides, protéines, ADN etc.) mais certains pathogènes sont plus résistants que d'autres à l'action de la MPO. En effet, grâce à des modèles de souris KO pour le gène de la MPO, une forte susceptibilité aux infections à *Candida albicans* (Aratani *et al.* 1999) ou à *Pseudomonas aeruginosa* de ces souris a été montrée par rapport aux souris sauvages. En revanche, les souris déficientes en MPO ne montrent aucune exacerbation de leur susceptibilité aux infections à *Streptococcus pneumoniae* par exemple (Aratani *et al.* 2002).

Une étude chez des patients déficients en MPO a par ailleurs confirmé une prédisposition à des maladies inflammatoires chroniques et aux infections (Kutter *et al.* 2000). Toutefois, les symptômes d'une déficience en MPO ne sont pas aussi grave qu'une déficience en NOX2, et il semble y avoir des mécanismes qui compensent la perte de réactifs oxydatifs. Les molécules d'H_2O_2 peuvent réagir avec du Fer contenu dans d'autres enzymes selon la réaction de Fenton, produisant des ions HO^- très oxydants (Staerck *et al.* 2017).

Les souris déficientes en MPO montrent également une expression plus élevée de l'enzyme iNOS (inducible nitric oxide synthase), une enzyme du neutrophile qui produit de l'oxyde nitrique NO à partir d'arginine (Brovkovych *et al.* 2008). Ce NO est par la suite transformé en présence d'O_2^- en différents intermédiaires nitrés appelés RNS (Reactive Nitrogen Species) comme la peroxynitrite $ONOO^-$ (Guzik *et al.* 2003; Channon *et al.* 2002), qui montrent également une activité bactéricide (Ischiropoulos *et al.* 1995).

II.6.1.4 Les Neutrophil Extracellular Traps

En dehors de leur activité de phagocytose et d'exocytose pour lutter contre les pathogènes, les neutrophiles disposent d'une arme unique et très particulière : les NETs. Ce sont des structures en forme de toiles composées de protéines et de chromatine, expulsées lors de la NETose, mécanisme longtemps considéré comme létal pour le neutrophile. Cette mort cellulaire est remise en question depuis peu et l'hypothèse d'une NETose laissant le neutrophile en vie a été posée. Ainsi, plusieurs travaux menés par Paul Kubes ou encore Hans Uwe Simon ont démontré une production de NETs non associée à la nécrose des neutrophiles (Yipp *et al.* 2012; Yousefi *et al.* 2016, 2019; Malachowa *et al.* 2016). L'implication d'ADN mitochondrial expliquerait ainsi la production non létale de NETs (Amini *et al.* 2018), même si la libération d'ADN nucléaire par des neutrophiles conservant leurs fonctions a été reportée (Yipp *et al.* 2012). Il convient d'ailleurs de préciser ici que la plupart des études réalisées pour mieux comprendre les NETs ont utilisé des modèles *in vitro*, qui peuvent se contredire selon le type de stimulation par exemple. De plus, il reste compliqué de distinguer clairement les NETs d'autres molécules contenant de l'ADN, et les mécanismes liés à leur production restent encore peu compris *in vivo* (Malachowa *et al.* 2016; Boeltz *et al.* 2019).

Les NETs sont composés de protéines des granules azurophiles comme la MPO et l'élastase, mais également d'autres protéines comme la cathélicidine des granules spécifiques et la calprotectine, protéine majoritaire du cytosol des neutrophiles (Stříž *et al.* 2004).

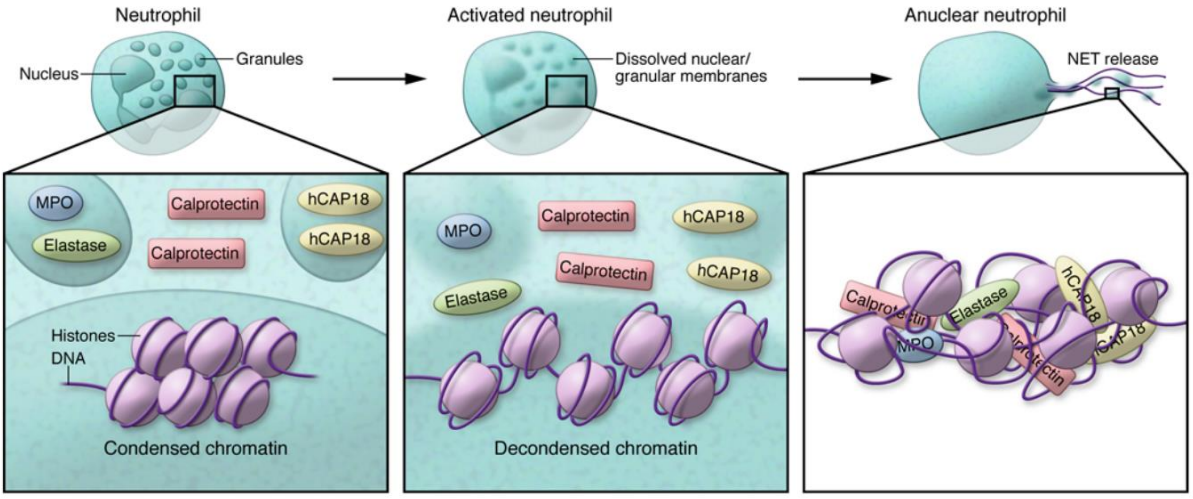


Figure 21 : Composition et assemblage des NETs après activation du neutrophile. (Sørensen et al. 2016)

Cet ensemble de protéines s'encastre dans une structure de chromatine où les nucléosomes sont décondensés, notamment via la citrullination des arginines de leurs histones par PAD4 (peptidyl arginine deiminase 4). Cette désimination affaiblit la charge positive des histones, ce qui diminue la force de leur liaison à l'ADN et permet la formation des NETs (Figure 21) (Sørensen *et al.* 2016).

La formation des NETs semble être induite par des signaux provenant de TLR ou d'intégrine (comme CD62L), par les ROS issus de NOX2, mais aussi par des cristaux de cholestérol ou d'urée (Kolaczkowska *et al.* 2015; Warnatsch *et al.* 2015). Un rôle central semble être joué par les ROS en tant que médiateurs du signal des autres activateurs et de la modification du cytosquelette permettant la libération d'ADN (Stojkov *et al.* 2017), mais cela reste débattu et des études *in vivo* indiquent un mécanisme NOX-indépendant (Kolaczkowska *et al.* 2015).

Les composants des NETs semblent également participer à leur formation. Par exemple, lors d'une NETose après stimulation par PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate), des études ont montré que PAD4 n'était pas essentielle à la formation des NETs, au contraire de HOCl produit par la MPO. Toutefois, ce rôle de la MPO n'a été montré que chez les neutrophiles humains, la NETose murine semblant être MPO-indépendante (Akong-Moore *et al.* 2012). L'élastase semble également jouer un rôle en clivant les histones, participant à la mise en place de la structure du NET.

En plus de ces protéines, les NETs semblent posséder un fort pouvoir antimicrobien grâce à la cathélicidine et à la calprotectine. La cathélicidine hCAP-18 chez l'Homme est clivée par la PR3 en un peptide antimicrobien, LL-37. La calprotectine est un complexe hétérodimérique composé de MRP8 et MRP14 (Migration inhibitory factor-Related Protein 8 et 14) qui possède un fort pouvoir antimicrobien après chélation de métaux (fer ou manganèse par exemple). Pourtant, le rôle antimicrobien des NETs reste débattu et de nombreuses études ont conclu à un rôle peu significatif dans des modèles divers (Menegazzi *et al.* 2012), alors que d'autres montrent une efficacité antimicrobienne de ces structures (V. Brinkmann 2004; Volker Brinkmann *et al.* 2012).

De plus en plus, le modèle admis est que les NETs jouent un rôle bactériostatique de piège pour permettre ensuite à d'autres mécanismes de tuer les pathogènes, qu'ils soient bactériens ou viraux (Azzouz *et al.* 2018; Saitoh *et al.* 2012; Jenne *et al.* 2013).

II.6.2 Fonctions immunomodulatrices : le neutrophile au carrefour de l'immunité

Bien que présentant de grandes capacités antimicrobiennes, les neutrophiles se sont révélés être à l'interface de beaucoup de mécanismes immunitaires en communiquant avec différents types cellulaires pour les activer, ou les réguler. Ils produisent notamment une grande quantité de médiateurs solubles et expriment des protéines membranaires à l'interface de nombreuses cellules immunitaires, leurs outils antimicrobiens pouvant également jouer un rôle immunomodulateur (Figure 22) (Mantovani *et al.* 2011).

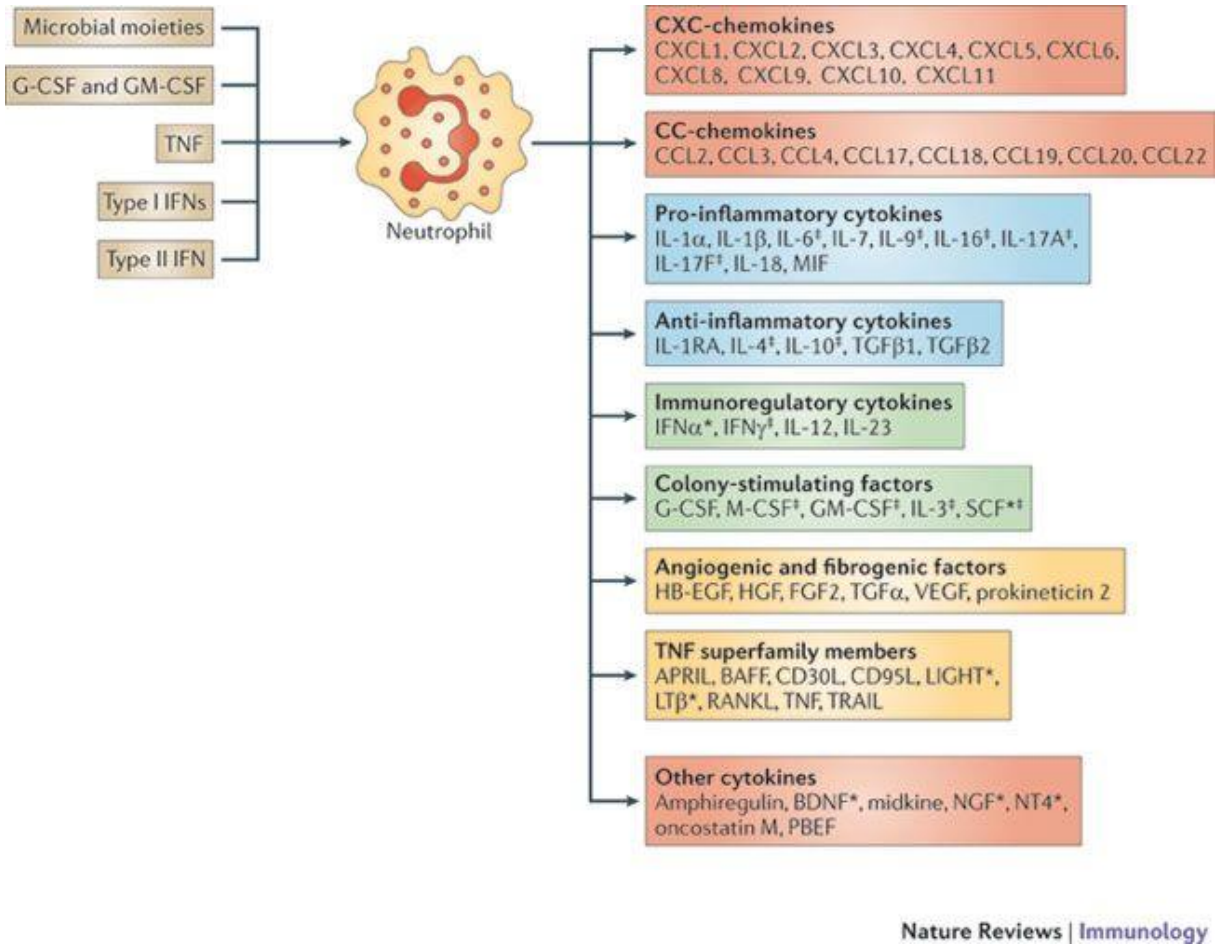


Figure 22 : Les neutrophiles expriment une grande variété de médiateurs solubles impliqués dans de nombreux mécanismes physiologiques et immunitaires. (Mantovani et al. 2011)

Ici, nous verrons le potentiel de ces cellules en termes d'activation et de régulation de l'immunité, de l'initiation de l'inflammation à sa résolution. Les différents mécanismes du neutrophile peuvent être activés par un grand nombre de signaux spécifiques ou non d'une voie. Du fait de la redondance de certaines voies, nous nous concentrerons donc sur l'impact du neutrophile et nous ne listerons pas exhaustivement les contextes dans lesquels ces neutrophiles acquièrent ces compétences.

II.6.2.1 Inflammation et activation de l'immunité par les neutrophiles

II.6.2.1.1 Rôle des médiateurs libérés par le neutrophile

II.6.2.1.1.1 Les chimiokines : le neutrophile à l'interface du recrutement des cellules immunitaires

Les neutrophiles activés produisent différents types de chimiokines qui ont le potentiel d'attirer l'ensemble des acteurs-clés de l'immunité innée ou adaptative (Tecchio *et al.* 2016).

L'une des fonctions les mieux étudiées est la production de médiateurs qui provoquent le recrutement d'autres neutrophiles, comme LTB_4 (Oyoshi *et al.* 2012), CXCL1 et 2 (Nguyen-Jackson *et al.* 2012) ou CXCL8 (chez l'Homme) (Riedel *et al.* 1997; Blidberg *et al.* 2012).

Ainsi, de nombreuses études ont démontré la production de ces chimiokines par les neutrophiles selon différents contextes, provoquant le recrutement de davantage de neutrophiles sur le lieu de l'inflammation. Cette boucle s'auto-alimente et permet notamment d'amplifier les différents signaux émis par les neutrophiles.

Les neutrophiles sont les premières cellules à être recrutées sur le lieu d'une agression, suivis des monocytes (Serhan *et al.* 2005). Les neutrophiles participent au recrutement de ces derniers via la production de différentes chimiokines comme CCL2, CCL3 (Blidberg *et al.* 2012; Hilda *et al.* 2014) et CCL4 (Bennouna *et al.* 2003b; Trellakis *et al.* 2011; Dumitru *et al.* 2012). En complément de CCL2 et CCL4 qui sont également reconnues par les récepteurs des cellules dendritiques immatures (Bennouna *et al.* 2003b), les neutrophiles produisent CCL19 et CCL20 qui induisent le recrutement de DC matures et de macrophages, l'ensemble des phagocytes étant ainsi recruté sur le lieu d'agression (Patrizia Scapini *et al.* 2001; Akahoshi *et al.* 2003). Les DC pourront ensuite activer les lymphocytes dans les ganglions et amorcer la réponse adaptative.

Les neutrophiles sont de plus capables d'attirer les LT $CD4^+$ sur le lieu de l'inflammation, via CCL2, CXCL9 et CXCL10 pour les Th1 et CCL2 et CCL20 pour les Th17 (Pelletier *et al.* 2010). Les neutrophiles peuvent également guider les LT $CD8^+$ vers les poumons de souris grippées en produisant la chimiokine CXCL12 (Lim *et al.* 2015), qui maintient aussi dans les poumons les neutrophiles âgés ayant augmenté leur expression de CXCR4. Enfin, les neutrophiles sont capables de produire CCL2 et CCL17 et de recruter les LT régulateurs ou Treg en contexte cancéreux (Zhou *et al.* 2016).

Les neutrophiles semblent aussi avoir le potentiel de recruter les LB via l'expression de CXCL13, mais pour l'instant seules des données transcriptomiques ont été réalisées (Fridlender *et al.* 2012).

En parallèle du recrutement des lymphocytes de l'immunité adaptative, les neutrophiles sont capables de recruter les cellules NK via CXCL10 par exemple dans l'infection paludique (Ioannidis *et al.* 2016) et CCL4 (Dumitru *et al.* 2012).

Par l'ensemble de leur production de chimiokines, les neutrophiles sont donc à l'interface de différents volets de l'immunité en recrutant les acteurs-clés lors d'agressions variées, de l'infection au cancer en passant par les maladies auto-immunes (Figure 23).

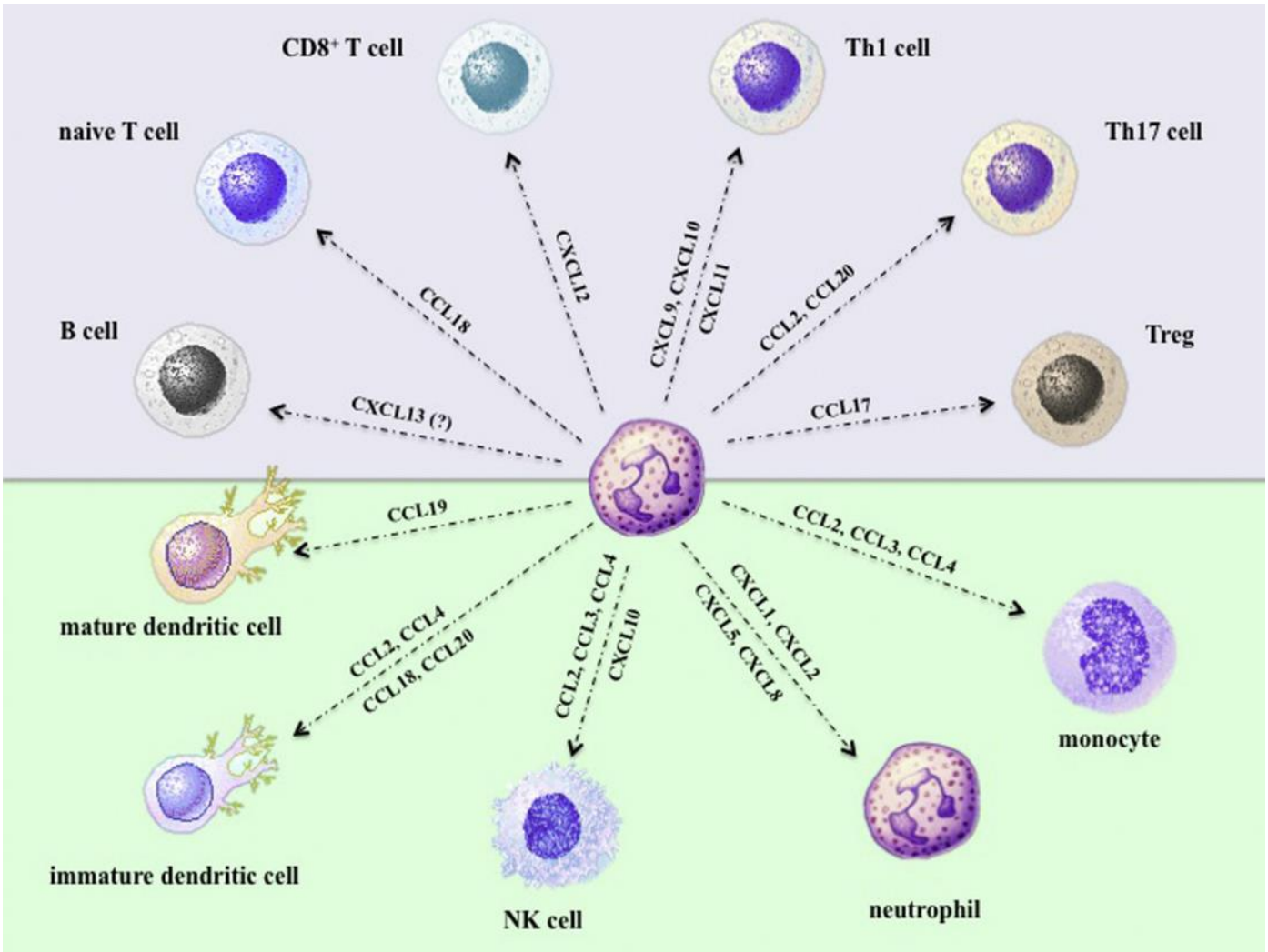


Figure 23 : Le neutrophile est capable de recruter un grand nombre de cellules immunitaires parsa production de chimiokines. (Tecchio et al. 2016)

II.6.2.1.1.2 L'activation des cellules par les cytokines

En plus de la libération de chimiokines, le neutrophile est capable de produire différentes cytokines qui permettent la communication entre le neutrophile et les cellules de l'immunité, mais également avec des cellules non immunitaires. L'un des acteurs majeurs dans la production de cytokines inflammatoires par le neutrophile est l'inflammasome.

IL-1β est une des cytokines libérées au plus tôt de l'inflammation, via l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans le neutrophile qui produit également de l'IL-18. L'IL-1β peut également être produit par le neutrophile via des voies non dépendantes de l'inflammasome et impliquant les protéines RIPK (receptor-interacting protein kinase) et l'action de protéases à sérine, comme par exemple en réponse à une infection à *Staphylococcus aureus* (Tourneur et al. 2019; Kremserova et al. 2018). Cette cytokine pro-inflammatoire induit de nombreuses voies d'activation dans différentes cellules menant à différents mécanismes inflammatoires ou antimicrobiens.

L'IL-1β produit par les neutrophiles peut induire une réponse par les neutrophiles eux-mêmes. Il a par exemple été montré dans des neutrophiles humains que l'IL-1β peut activer la NETose *in vitro*, qui est inhibée par l'ajout dans le milieu de l'antagoniste IL-1RA (Meher *et al.* 2018). On peut également citer un rôle indirect d'IL-1β dans la migration des neutrophiles, induisant notamment la production d'eicosanoïdes comme LTB_4 par les macrophages et mastocytes dans la cavité péritonéale de rats (Oliveira *et al.* 2008). Un aspect très intéressant de l'IL-1β est l'induction, avec IL-23, de la production d'IL-17 par les LTγδ dans les poumons de souris infectées par *Streptococcus pneumoniae*. Le rôle de l'IL-1β est ici essentiel dans la lutte contre le pathogène en induisant indirectement le recrutement des neutrophiles dans les poumons (M. Hassane *et al.* 2017). En parallèle de l'activation des LT « innés », le couple IL-1β/IL-23 stimule également la production d'IL-17 par les lymphocytes Th17 « primés ».

La seconde cytokine produite après activation de l'inflammasome NLRP3, l'IL-18, est très importante dans l'activation des cellules NK (Chaix *et al.* 2008; Srivastava *et al.* 2013; Senju *et al.* 2018) et l'induction de la production d'IFN-γ par les lymphocytes Th1 (Dinarello 1999). La production d'IL-18 par les neutrophiles a ainsi été démontrée dans un modèle d'infection à *Legionella pneumophila*, où les souris déplétées en neutrophiles ou déficientes pour le récepteur à l'IL-18 montrent un défaut de production d'IFN-γ (Spörri *et al.* 2008). Dans ce modèle, les neutrophiles travaillent de concert avec les DC qui produisent de l'IL-12, la

production d'IFN-γ nécessitant une stimulation par IL-12/IL-18. D'autres études ont d'ailleurs démontré que des neutrophiles pouvaient produire de l'IL-12, dans le cas d'une infection à Toxoplasma gondii par exemple ou plus récemment *in vitro* après stimulation (Susan K. Bliss *et al.* 2000; Glowacka *et al.* 2010; S K Bliss *et al.* 1999).

Les neutrophiles sont également capables de produire du TNF-α (Dubravec *et al.* 1990; Djeu *et al.* 1990; Finsterbusch *et al.* 2014), un facteur pouvant activer la voie de NF-κB et induire l'apoptose dans de nombreuses cellules (Karin *et al.* 2002). En addition de cette cytokine pro-inflammatoire, les neutrophiles peuvent produire de l'IL-6, notamment après infection à *Mycobacterium tuberculosis* (Dorhoi *et al.* 2013; Wolters *et al.* 2009). L'IL-6 permet d'activer la voie de signalisation des STAT via l'activation de JAK (Zegeye *et al.* 2018).

Récemment, des études ont également montré que les neutrophiles pouvaient produire de l'IL-17 lors d'infections fongiques par exemple, participant à leur propre activation autocrine (Taylor *et al.* 2014; F. Chen *et al.* 2016; Werner *et al.* 2011). Ces résultats restent contestés, et l'équipe de Marco Cassatella a démontré l'incapacité des neutrophiles humains à produire de l'IL-17 (Tamassia *et al.* 2018) et suggéré la présence de cellules contaminantes expliquant les résultats d'autres équipes, comme la présence d'ARNm codant pour l'IL-17 retrouvés dans des échantillons de neutrophiles dont la pureté n'est pas excellente (92%).

II.6.2.1.1.3 Protéines des granules et composés antimicrobiens, médiateurs de l'inflammation ?

Lors de la lutte contre une infection, le neutrophile produit une large gamme de composés antimicrobiens qui agissent directement sur les pathogènes. Certains de ces composés ont en complément une activité immunomodulatrice qui va notamment stimuler la réponse immunitaire spécifique du pathogène, mais également entrainer des dégâts liés à l'inflammation.

Le rôle des ROS comme médiateurs de l'inflammation a particulièrement été étudié, ces composés étant hautement réactifs et oxydants. Les ROS ont principalement un rôle pro-inflammatoire à l'intérieur du neutrophile en médiant l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Mittal *et al.* 2014; Naik *et al.* 2011). Cette action est menée principalement par les ROS produits par les mitochondries mais également par ceux produits par NOX2 (Mittal *et al.* 2014). Par exemple, H_2O_2 peut passer la membrane cellulaire et activer la voie NF-κB et stimuler la production de cytokines comme TNF-α (Chandel *et al.* 2000; Meyer *et al.* 1993). Enfin, une fois formé grâce à une surproduction d'O_2^- en association avec NO, $ONOO^-$ active

différentes protéines dans des voies variées (JAK, STAT, NF-κB ...) (Bogdan 2001; Paige *et al.* 2018). Comme nous l'avons vu précédemment, les ROS peuvent également médier la NETose dans le neutrophile et donc augmenter son état inflammatoire.

Les NETs ont en effet montré, en addition de leur activité antimicrobienne, des capacités pro-inflammatoires, par exemple en activant la production d'IFN-α par les DCs par un signal dépendant de TLR9 qui reconnait l'ADN contenu dans les NETs (Garcia-Romo *et al.* 2011).

Ceci a été particulièrement étudié dans le cas du lupus érythémateux disséminé, où les neutrophiles humains sont stimulés par des auto-anticorps dirigés contre LL-37 et par la reconnaissance via CD32 d'auto-anticorps dirigés contre des RNPs (RiboNucleoProteins). Ils produisent des NETs qui activent les DCs, et l'IFN-α produit stimule les neutrophiles eux-mêmes et la production d'anticorps par les LB menant à un cercle vicieux pro-inflammatoire (Garcia-Romo *et al.* 2011; Lande *et al.* 2011).

Les NETs semblent également jouer un rôle indirect dans le recrutement des neutrophiles. Ceci a pour l'instant été démontré *in vitro* avec des macrophages issus de donneurs sains ou de patients atteints de mucoviscidose (Gray *et al.* 2018), les NETs activant les macrophages et notamment leur production de la chimiokine IL-8 et de la cytokine pro-inflammatoire TNF-α. Un même mécanisme s'opère lors de l'athérosclérose. Warnatsch et al ont utilisé un modèle de souris déficiente pour l'apolipoprotéine E (ApoE) et soumise à un régime riche en graisse pour induire une hypercholestérolémie. Ce modèle permet d'étudier l'athérosclérose chez la souris, et les souris $ApoE^{-/-}$ déficientes en PR3 et NE (enzymes nécessaires à la NETose) montrent une réduction de la taille des plaques et des lésions vasculaires en comparaison des souris $ApoE^{-/-}$ $PR3^{+}$ NE^{+}. Les monocytes circulants semblent en effet reconnaitre les NETs qui, en synergie avec le cholestérol, induisent l'activation de l'inflammasome et la production d'IL-1β. Cette cytokine induit ensuite la production d'IL-17 par les lymphocytes Th17 qui induit à son tour la production de CXCL1 et CXCL2 par les cellules endothéliales, participant au recrutement des neutrophiles (Warnatsch *et al.* 2015).

Les neutrophiles peuvent également pré-activer les LT via les NETs. Ce « priming » permet d'abaisser le niveau de signal nécessaire pour activer le lymphocyte (Tillack *et al.* 2012), par un mécanisme encore peu connu qui semble faire intervenir le TCR (Sanjuan *et al.* 2006; Lindau *et al.* 2011).

Les LT dits « non conventionnels » peuvent également être activés par les neutrophiles. L'élastase produite par les neutrophiles humains peut ainsi activer les LTγδ en clivant PAR1 (Protease Activated Receptor 1) et stimule la production d'IFN-γ et de TNF-α par les LTγδ *in vitro* (Towstyka *et al.* 2018).

II.6.2.1.2 Protéines membranaires et interactions cellule/cellule

La présentation d'antigène aux LT est une fonction qui est longtemps restée cloisonnée aux cellules dendritiques et autres macrophages. Pourtant, des études dans le milieu des années 2000 ont montré les capacités des neutrophiles à exprimer le CMH II et à activer les LT $CD8^+$ dans un modèle OT1 (Beauvillain *et al.* 2007), et les $CD4^+$ Th1 et Th17 en modèle OT2 (Abdallah *et al.* 2011). Cette compétence de cellule présentatrice d'antigène (Antigen Presenting cell, APC) est complétée par la capacité des neutrophiles à produire des chimiokines attirant les lymphocytes sur le lieu de l'inflammation (Cf.II.6.2.1.1.1).

Les neutrophiles ont aussi montré une activité stimulatrice des DC, opérant par des interactions cellule/cellule via leurs intégrines CD11b/CD18 (Van Gisbergen *et al.* 2005; Megiovanni Maria *et al.* 2006). Les DC ainsi exposées sont plus potentes pour l'activation antigène-dépendante des lymphocytes, via l'induction de l'expression de protéines comme CMH II ou CD80 (Bennouna *et al.* 2003a).

Les neutrophiles sont également capables de rejoindre les organes lymphoïdes comme les ganglions ou la rate pour moduler la réponse des LT. Après une infection, les neutrophiles migrent dans les ganglions via l'expression de CCR7 (Beauvillain *et al.* 2011; Chtanova *et al.* 2008), à la manière des cellules dendritiques. Ils peuvent y apporter et présenter des bactéries phagocytées (Abadie *et al.* 2005), mais surtout réguler négativement la réponse immune des LT $CD4^+$ (Yang *et al.* 2010). L'équipe d'Emil Unanue a ainsi démontré une activité suppressive des neutrophiles sur les LT $CD4^+$ présents dans les ganglions après immunisation contre différents antigènes. Cette dualité des rôles du neutrophile illustre un concept particulier : dans un même contexte, ces cellules peuvent avoir un profil pro-inflammatoire et antimicrobien mais aussi réguler l'inflammation.

II.6.2.2 De l'activation à la régulation

II.6.2.2.1 Les médiateurs anti-inflammatoires

Les neutrophiles produisent des cytokines et des médiateurs anti-inflammatoires comme l'IL-10, certains ROS et RNS, et l'arginase I qui agissent en régulant l'inflammation, contrebalançant l'action pro-inflammatoire des neutrophiles vue précédemment.

L'IL-10 est une cytokine produite par plusieurs cellules de l'immunité comme les cellules dendritiques, les macrophages ou les Treg (Couper *et al.* 2008). Sa production par les neutrophiles n'a été que récemment démontrée chez la souris (Kasten *et al.* 2010), et reste débattue chez les neutrophiles humains (De Santo et al. 2010; Davey et al. 2011). L'IL-10 est impliquée dans de nombreuses pathologies où elle supprime notamment l'activité des APC, et des LT $CD4^+$ Th1 et Th2. La neutralisation de L'IL-10 conduit d'ailleurs dans la quasi-totalité des modèles à une augmentation de l'inflammation. Une étude récente a également démontré qu'en plus d'inhiber la production de cytokines (via notamment l'induction de protéines comme SOCS3) (Schülke 2018), l'IL-10 diminuerait la capacité des TCR des LT $CD8^+$ à reconnaitre un antigène (L. K. Smith *et al.* 2018). Cette modification s'opère par l'induction de l'expression de Mgat5, une glycosyltranférase qui augmente les branchements de N-glycanes sur les glycoprotéines, dont les TCR.

D'autres études ont démontré des fonctions suppressives des ROS produit par les neutrophiles contre les LT (Leliefeld *et al.* 2015). Les ROS suppriment par exemple l'activation des LT par inactivation de la coffiline, une protéine remodelant l'actine, ce qui provoque un défaut dans la formation de la synapse immunologique (Klemke *et al.* 2008). De plus, les ROS ont une action pro-apoptotique sur les LT classiques tandis que les LT régulateurs y sont moins sensibles (Mougiakakos *et al.* 2009).

Un autre type de dérivé oxydatif est l'oxyde nitrique NO qui a une action de régulation lorsqu'il est produit par l'oxyde nitrique synthase constitutive (cNOS). Il va alors agir à faible dose et pendant un court délai pour inhiber la prolifération et l'activation des cellules immunitaires, notamment celle des neutrophiles (Figure 24) (Guzik *et al.* 2003).

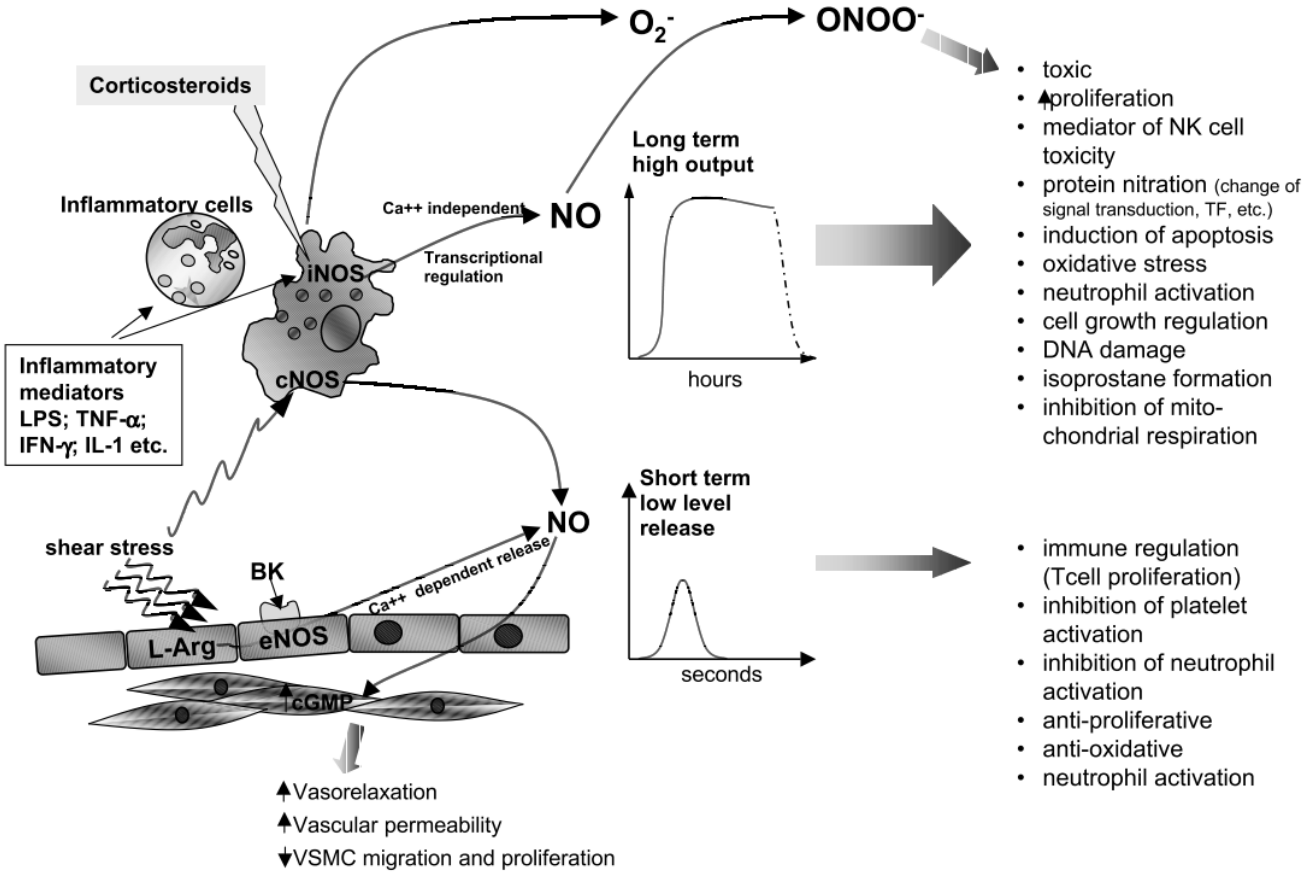


Figure 24 : Le rôle immunorégulateur de NO est dépendant des condtions inflammatoires. (Guzik et al. 2003)

L'action de NO peut en revanche être perturbé par sa réaction avec O_2^-, ROS produit par NOX2 dans les cellules inflammatoires. L'interaction de ces composés donne de l'$ONOO^-$, un médiateur pro-inflammatoire et provoquant des dégâts tissulaires (Figure 24) (Cf.II.6.2.1.1.3).

L'arginase I est une enzyme contenue dans les granules à gélatinase, qui déplète la L-arginine présente dans le milieu, empêchant les LT d'y accéder pour leur prolifération et production de cytokines (Munder *et al.* 2006). Cette inhibition semble être dépendante des pathologies, ainsi l'inhibition de l'arginase I dans un modèle d'infection à *Pseudomonas aeruginosa* ne provoque aucune hausse de cytokines pro-inflammatoires (Mehl *et al.* 2014). En revanche, l'arginase I semble liée à une expression plus faible de CD3ζ et NF-κB par les LT de patients atteints de tuberculose (Zea *et al.* 2006).

II.6.2.2.2 La régulation par contact

Les neutrophiles expriment des protéines membranaires capables de réguler l'activité d'autres cellules, via des interactions cellule/cellule nécessitant un contact entre les deux cellules.

Parmi les protéines membranaires régulatrices du neutrophile, la principale est PD-L1 (Programmed death-ligand 1, CD274). PD-L1 se lie à son récepteur PD-1 (Programmed death receptor) exprimé par les LT et réprime leur activation. Cette reconnaissance se fait parallèlement à la liaison du TCR et de la molécule de CMH (Figure 25) (Bardhan *et al.* 2016). PD-L1 est particulièrement étudié dans le cancer où il joue un rôle très important dans la répression de la réponse T et donc dans la progression de la tumeur (X. Zhang *et al.* 2017; Luo *et al.* 2016). Dans le cas du neutrophile, le rôle de PD-L1 a également été démontré dans différentes pathologies comme le lupus, l'infection au VIH ou encore le SDRA (Bowers *et al.* 2014; Lomas-Neira *et al.* 2018).

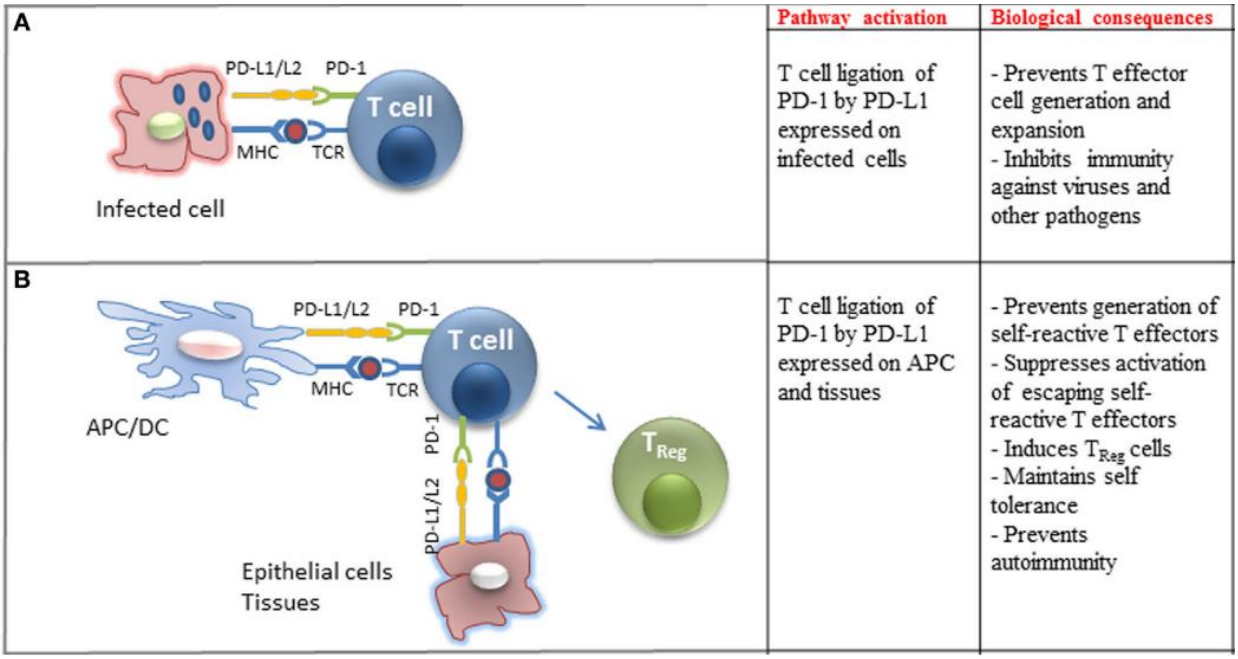


Figure 25 : Rôle du couple PD-1/PD-L1 sur la régulation des lymphocytes T. (Bardhan et al. 2016)

L'équipe de Leo Koenderman a aussi démontré un rôle de CD11b/CD18 (Mac-1) dans la suppression de l'activation des LT en synergie avec le peroxyde d'hydrogène produit par les neutrophiles (Tak *et al.* 2018). Ainsi, l'utilisation d'un anticorps anti-CD11b couplé à la catalase diminue grandement l'inhibition des LT dans une co-culture LT/ neutrophiles. Le couple CD11b/CD18 permettrait ainsi le relargage d'H_2O_2 dans la synapse immunologique pour inhiber les LT (Pillay *et al.* 2012).

Les neutrophiles peuvent également réguler des LT non conventionnels comme les iNKT (invariant Natural Killer T cell) (Wingender *et al.* 2012) et les LTγδ (Sabbione *et al.* 2014). Ainsi, une diminution de l'expression de t-bet et GATA3 a été observée chez les iNKT de souris présentant une neutrophilie. Les mécanismes de cette régulation n'ont pas encore été démontrés, mais il semble qu'un contact cellulaire soit nécessaire.

II.6.3 Remodelage tissulaire : dégâts et réparation

II.6.3.1 Le neutrophile, une source de dégâts pour l'organisme ?

De plus en plus d'études montrent une association entre l'importance de certaines pathologies liées aux dégâts tissulaires et la concentration en neutrophiles au niveau des tissus affectés. C'est par exemple le cas pour le SDRA (Syndrome de Déficience Respiratoire Aiguë), où la gravité de la pathologie semble directement liée à la quantité de neutrophiles retrouvés dans les lavages bronchoalvéolaires (LBA) des patients (Short *et al.* 2014).

Les dégâts tissulaires provoqués par les neutrophiles résultent de l'action du très grand nombre de protéines de remodelage tissulaires que les neutrophiles produisent pour faciliter leur passage dans les tissus, mais aussi de l'action de molécules antimicrobiennes.

Les protéases de remodelage tissulaire les plus connues chez le neutrophile sont la NE et les MMP (Kaynar *et al.* 2008; Delclaux *et al.* 1996; Kolaczkowska *et al.* 2006). Notamment, la MMP-8 ou collagénase des neutrophiles et la MMP-9 ou gélatinase B lysent la matrice extracellulaire et facilitent l'infiltration des neutrophiles tout en induisant la production de chimiokines.

Le rôle de ces protéases dans la migration des neutrophiles reste toutefois débattu car leur déficience semble avoir un faible impact sur l'infiltration des neutrophiles (Kolaczkowska *et al.* 2009; Rowe *et al.* 2008). Ainsi, l'utilisation de souris $MMP9^{-/-}$ pour une étude de plusieurs laboratoires menée par Ghislain Opdenakker (Kolaczkowska *et al.* 2009) a montré que l'influx des neutrophiles lors d'une péritonite chez des souris était plus faible chez les KO au début de l'inflammation. Ils ont toutefois montré que le recrutement de neutrophiles augmentait en période plus tardive jusqu'à dépasser celui des WT, ceci étant associé à une forte production de NE. La neutrophilie observée chez les $MMP9^{-/-}$ est réduite par l'injection d'un inhibiteur de la NE, mais reste supérieure à celle observée chez les WT et suggère une grande complémentarité des MMP produites par les cellules immunitaires.

Ces protéases contribuent aux dégâts tissulaires en provoquant notamment des changements dans la barrière épithéliale, via l'induction de l'apoptose des cellules par activation de la voie de la caspase 3 ou le clivage des cadhérines des jonctions adhérentes (Boxio *et al.* 2016; Preston *et al.* 2002; Ginzberg *et al.* 2004).

Certains produits des neutrophiles ont également un effet délétère sur l'intégrité de la barrière épithéliale, les ROS/RNS étant par exemple particulièrement toxiques pour les cellules (Suntres *et al.* 2002; Davis *et al.* 2002; Adler *et al.* 1997; Akaike *et al.* 1996). Ils provoquent des dégâts multiples sur les cellules, affectant les lipides, protéines et lipoprotéines et sur l'ADN (Hui *et al.* 1997; Rasheed 2008; Nitto *et al.* 2002).

II.6.3.2 Le neutrophile contribue à la réparation tissulaire et à la résolution de l'inflammation

Depuis une dizaine d'année, de nombreuses études font état de capacités réparatrices du neutrophile, notamment via l'initiation de l'angiogenèse. Ainsi, les souris neutropéniques montrent une réparation tissulaire plus lente que les souris classiques (Nishio *et al.* 2008). Les neutrophiles peuvent produire les molécules proangiogéniques VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) après stimulation au fMLP ou de la prokinéticine 2 (Bv8) après stimulation au G-CSF (Shojaei *et al.* 2008), contribuant à la réparation tissulaire.

MMP9, impliquée dans les dégâts tissulaires par son action de dégradation de la matrice cellulaire, a également un rôle pro-angiogénique via le recrutement de progéniteurs hématopoïétiques. MMP9 facilite aussi la pénétration des vaisseaux sanguins dans le tissu, les souris $MMP9^{-/-}$ n'étant pas capables de revasculariser des transplants d'ilots pancréatiques (Christoffersson *et al.* 2012).

Enfin, l'apoptose des neutrophiles joue un rôle dans la production d'IL-10 et de TGF-β par les macrophages qui les phagocytent, et la production de médiateurs comme CX_3Cl1 ou la lactoferrine induit le recrutement de monocytes ce qui augmente le nombre de phagocytes présents pour la résolution de l'inflammation. Les neutrophiles apoptotiques produisent également des médiateurs lipidiques qui réduisent le recrutement de nouveaux neutrophiles (Figure 26) (Soehnlein *et al.* 2010).

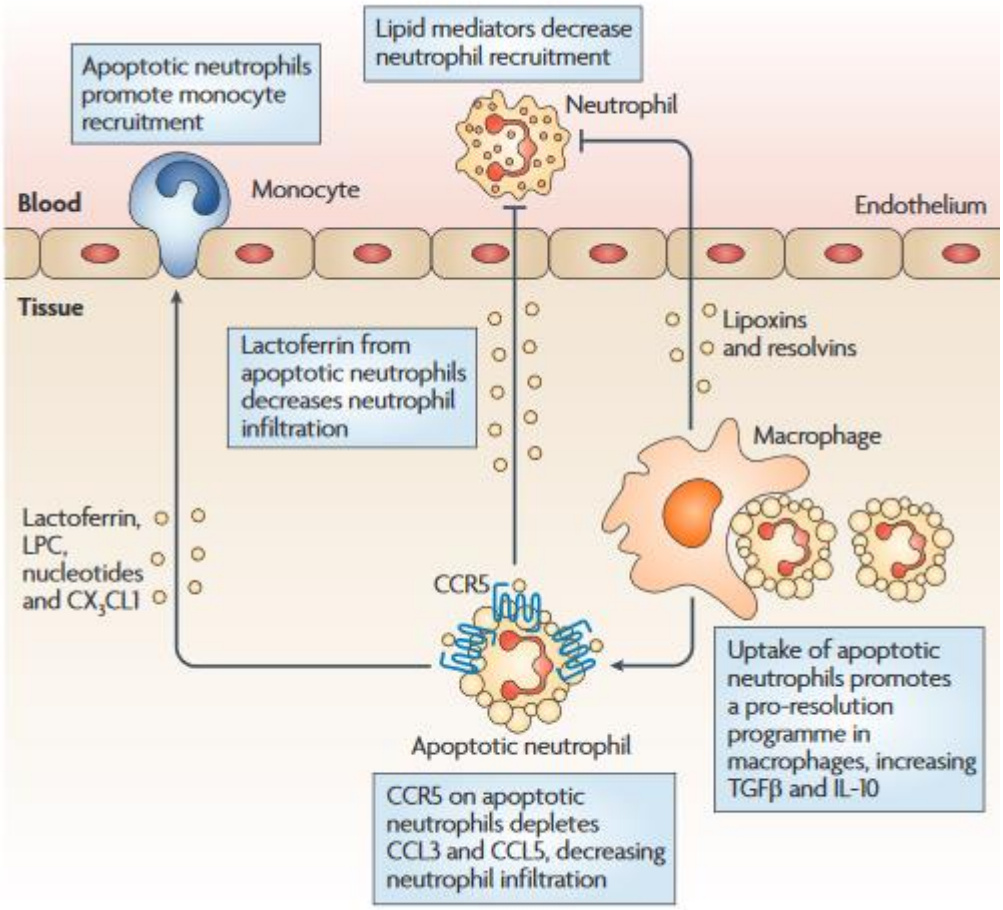


Figure 26 : Les neutrophiles participent à la résolution de l'inflammation via leur apoptose. (Soehnlein et al. 2010)

II.7 Pathologies associées au neutrophile

Le neutrophile est une cellule au carrefour de l'immunité, possédant de nombreuses compétences en complément de la phagocytose. Dans la partie précédente, nous avons vu des fonctions multiples apparaissant dans des contextes variables. Cette pluralité s'illustre dans les poumons, où les neutrophiles interviennent dans une gamme variée de pathologies.

II.7.1 Infections bactériennes : un rôle central du neutrophile

Le neutrophile ayant été décrits premièrement comme un phagocyte, il a un rôle central dans le contrôle des populations bactériennes pathogènes. La pneumonie bactérienne est l'une des plus grandes menaces pour l'organisme et cause des millions de morts chaque année dans le monde (C. Troeger *et al.* 2018). *Streptococcus pneumoniae* est l'une des principales causes de la pneumonie acquise en milieu communautaire. L'infection à Sp est suivie d'un

recrutement massif de neutrophiles dans les voies aériennes supérieures (Bergeron *et al.* 1998), et par la production rapide de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1β (Mohler *et al.* 2003). Le neutrophile est la principale source d'IL-1β dans l'infection à Sp sous l'impulsion de TNF-α et de la pneumolysine, activant notamment les LTγδ producteurs d'IL-17 (M. Hassane *et al.* 2017). L'IL-17 participe ensuite au recrutement des neutrophiles, alimentant une boucle de recrutement/activation. Ce recrutement massif permet de contenir rapidement l'infection avec les armes du neutrophile (protéases, ROS, peptides antimicrobiens, phagocytose).

Toutefois, il arrive que l'infection ne soit pas contrôlée et mène à une pneumonie voire à un sepsis. Pour contrer la mort rapide des neutrophiles chargés de contrôler les bactéries, un mécanisme appelé granulopoïèse d'urgence se met en place. Des neutrophiles immatures $Ly6G^{int}$ sont libérés de la moelle sous l'effet du G-CSF, de l'IL-1β, de TNF-α et des produits bactériens (Manz *et al.* 2014). Ils participent à la clairance bactérienne et peuvent continuer leur maturation en dehors de la moelle (Deniset *et al.* 2017).

II.7.2 Maladies inflammatoires : le neutrophile acteur et médiateur

Les neutrophiles jouent un rôle important dans de nombreuses pathologies inflammatoires comme la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) (Meijer *et al.* 2013). Cette pathologie, causée par la fumée de cigarette, fait partie des premières causes de mortalité notamment dans les pays développés. On estime ainsi qu'environ 3 millions de personnes décèdent de BPCO chaque année (Roth *et al.* 2018b).

Si le neutrophile est la principale cellule à agir contre les infections bactériennes avec les macrophages, des pistes tendent à montrer que la fumée de cigarette diminue les fonctions des phagocytes (Prieto *et al.* 2001; Drannik *et al.* 2004; Stringer *et al.* 2007). Dans cet environnement, les infections bactériennes sont peu contrôlées et on retrouve une neutrophilie et des cytokines pro-inflammatoires (IL-8/IL-6/TNF-α/IFN-γ) dans le sang et les expectorations de patients atteints de BPCO.

Ceci provoque des dommages inflammatoires et des exacerbations des infections bactériennes. Bien que le rôle du neutrophile dans ce phénomène soit encore à l'étude, il semble que l'action de la fumée de cigarette sur cette cellule altère ses fonctions et mène à une inflammation chronique destructrice et à une hypoxie des tissus (Figure 27) (J. Liu *et al.* 2017).

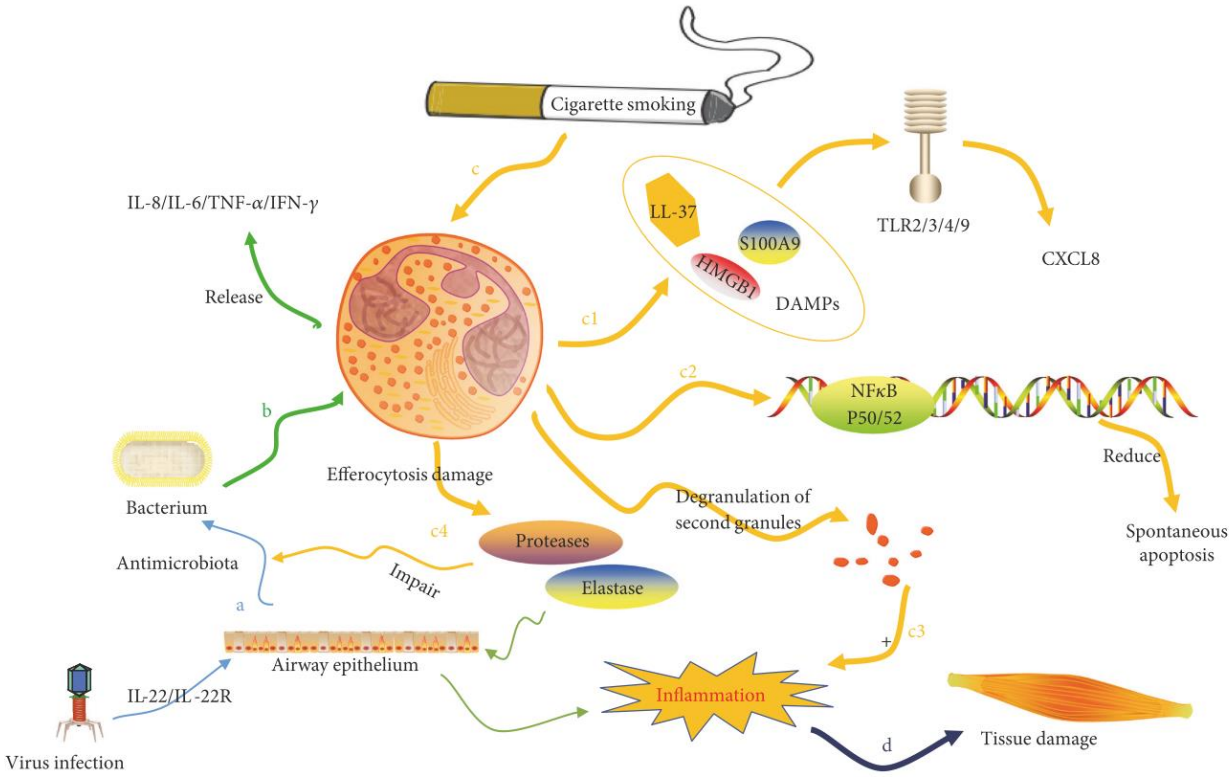


Figure 27 : Le neutrophile au centre du processus inflammatoire dans la BPCO. (Liu et al. 2017)

Ainsi, la fumée de cigarette perturbe la réponse immunitaire classique antivirale et antibactérienne de l'hôte (a,b) via son action sur les neutrophiles (c1, c2, c3, c4). Ceci provoquerait des défauts dans le contrôle de l'infection menant à une surinflammation, causant des dégâts tissulaires potentiellement mortels.

II.7.3 Cancer : neutrophiles anti-tumoraux vs pro-tumoraux ?

L'étude du rôle des neutrophiles dans le contrôle des tumeurs connait un regain d'intérêt depuis une dizaine d'années grâce à l'accumulation de données montrant un rôle significatif des neutrophiles dans la biologie des tumeurs.

La définition des neutrophiles dans l'environnement tumoral s'est rapprochée de celle des macrophages. On parle ainsi de neutrophile associé à la tumeur (ou TAN, Tumour-Associated Neutrophil) en miroir des TAM (Tumour-Associated Macrophages) et on dissocie des neutrophiles « N1 » et « N2 » à l'image des macrophages M1 et M2. Ces deux profils se caractérisent par une action respectivement anti- et pro-tumorale.

Les neutrophiles antitumoraux N1 sont pro-inflammatoires, et induisent le recrutement et l'activation des LT $CD8^+$ via la production de chimiokines (CCL3, CXCL9, and CXCL10) et de cytokines (IL-12, TNF-α) (Shaul *et al.* 2017; P. Scapini *et al.* 2000). Ils semblent également avoir des capacités cytotoxiques envers les cellules tumorales via la production de ROS et

l'expression de Fas, bien que le rôle de ce dernier soit encore débattu (Y.-L. Chen *et al.* 2003; Arai *et al.* 1997).

Les neutrophiles pro-tumoraux et anti-inflammatoires N2 ne produisent pas ces médiateurs inflammatoires, et produisent de grandes quantités d'arginase I qui semble avoir un rôle d'inhibition des LT $CD8^+$. Ce profil semble progressivement induit chez les neutrophiles par le TGF-β au sein de l'environnement tumoral (Mishalian *et al.* 2013; Fridlender *et al.* 2009). En addition d'un rôle anti-inflammatoire, les neutrophiles N2 produisent des molécules pro-angiogéniques comme le VEGF qui participent à la vascularisation de la tumeur.

En dehors de ces sous-populations, un phénotype de TAN hybride avec celui d'une APC a été étudié chez des patients au premier stade d'un cancer des poumons. Cette population, exprimant notamment le CMH II et CD14, un marqueur plutôt monocytaire, est retrouvée dans les tumeurs positives au GM-CSF et à l'IFN-γ. Ces neutrophiles hybrides montrent une morphologie différente des neutrophiles matures avec un noyau plus ovale, mais conservent toutes les caractéristiques phénotypiques de neutrophiles (Singhal *et al.* 2016). Ils semblent provenir de progéniteurs de la moelle osseuse soumis au GM-CSF et à une faible concentration en IFN-γ, et ne sont présents qu'au début de la progression tumorale (<3 cm).

Le neutrophile est une cellule encore mystérieuse, qui possèdent de très nombreuses compétences au service aussi bien de la clairance microbienne que de la modulation de la réponse immunitaire. Cette pluralité de fonctions s'illustre particulièrement bien dans le cas du cancer, où les neutrophiles forment en réalité plusieurs populations aux fonctions propres.

III Le virus *Influenza* A

III.1 Les virus *Influenza* : présentation et enjeux

Les virus *Influenza* font partie de la famille des orthomyxoviridae, c'est à dire des virus à ARN simple brin négatif et segmenté capables de dégrader les mucines et de provoquer une hémagglutination. Cette famille regroupe les virus *Influenza* et les virus *Thogotovirus*, *Isavirus*, et *Quaranjavirus* (Shao *et al.* 2017). Au sein même des virus *Influenza*, 4 types ont pour l'instant été décrits : A, B, C et D. Ces trois derniers types sont issus de l'ancestral A, et sont clairement identifiés et différenciés génétiquement (Figure 28) (Hutchinson *et al.* 2018; Pleschka 2012; Hause *et al.* 2013).

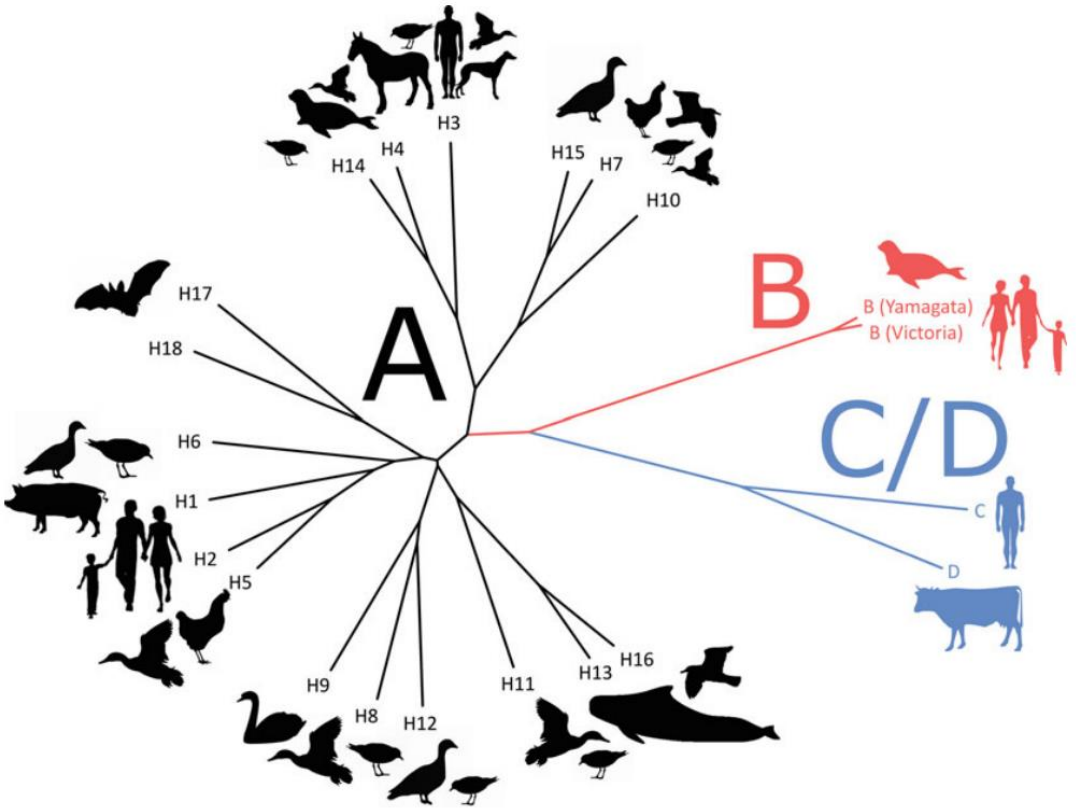


Figure 28 : Evolution des virus Influenza et espèces concernées. (Hutchinson et al. 2018)

Par exemple, si les virus *Influenza* A (IAV) et B possèdent un ARN à 8 segments, les virus C et D n'en possèdent que 7 (Petrova *et al.* 2018). Les virus A et B sont d'ailleurs les seuls à montrer une pathogénicité chez l'Homme (W. C. Li *et al.* 2008; Yoon *et al.* 2014), bien que l'on puisse retrouver une séropositivité à chaque type chez les patients qui peut être due à une infection ou à une exposition prolongée aux virus (chez les éleveurs par exemple).

Les virus *Influenza* sont en effet très versatiles dans leur choix d'hôte. Il est admis par exemple que les virus A sont majoritairement présents dans les oiseaux aquatiques comme le canard, les échassiers ou encore les oiseaux marins (Hinshaw *et al.* 1980). Le dernier type de virus *Influenza* à avoir été découvert, le type D, a ainsi été observé chez la vache où il peut causer des infections légères à modérées (S. Su, Fu, *et al.* 2017). Les Hommes peuvent donc souvent rentrer en contact avec ces virus, et la capacité de ces derniers à passer d'une espèce à l'autres les rend particulièrement dangereux. Ainsi, le type A provoque des infections entériques chez les oiseaux qui, en le disséminant notamment via leurs excréments, peuvent contaminer d'autres vertébrés comme l'Homme.

Chez l'Homme, le virus va alors causer une infection respiratoire le plus souvent modérée mais qui peut devenir mortelle, notamment lors de pandémie comme la grippe espagnole de 1918 où entre 20 et 40 millions de personnes auraient péries à cause du virus (Taubenberger *et al.* 2000; Webster 1999).

Cette létalité est notamment due au caractère immunopathologique du virus, qui induit une inflammation très importante et dangereuse pour l'hôte, menant à une pneumonie voire à un SDRA. Du fait de la forte variabilité génétique du virus et de la multitude de sous-types, les vaccins contre le virus sont réalisés d'année en année sur des prédictions épidémiques, grâce à une surveillance internationale de l'OMS. Cette méthode peut être défaillante et, même si la vaccination a toujours un effet bénéfique, elle peut ne pas être suffisante pour prémunir des infections grippales.

Le virus *Influenza* de type A reste donc un enjeu de santé majeur, dont il est nécessaire de mieux comprendre les mécanismes d'actions pour pouvoir mettre en place des thérapies innovantes.

III.2 Le virus *Influenza* A : structure et cycle

III.2.1 Structure

III.2.1.1 Nomenclature

Le virus *Influenza* A est décliné en de nombreux sous-types nommés selon leur expression de deux glycoprotéines de surface, l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA), formant la terminologie HxNy (Hutchinson *et al.* 2018). On dénombre 18 différentes hémagglutinines et 11 différentes neuraminidases, mais seules trois combinaisons sont connues pour circuler majoritairement chez l'homme : H1N1, H2N2 et H3N2 (Hay *et al.* 2001; Matrosovich *et al.* 2000). En dehors de ces 3 combinaisons, H5N1, un virus aviaire détecté pour la première fois à Hong Kong en 1997 sur des oies, a également été détecté chez quelques êtres humains. Il infecte quelques dizaines de personnes en Asie chaque année depuis 2003 (OMS) (Harfoot *et al.* 2017). Plus récemment, une cinquième combinaison a été détectée chez l'Homme : H7N9 (S. Su, Gu, *et al.* 2017). Découvert sur des dindes aux Etats-Unis en 1988, le virus est responsable de plus en plus de décès chaque année depuis le premier cas recensé à Shangai en 2013 (S. Su, Gu, *et al.* 2017). Les infections liées à ce virus restent toutefois sporadiques et, tout comme pour d'autres combinaisons, nécessitent un contact avec l'animal (Wu *et al.* 2017).

Selon la nomenclature en vigueur, un virus *Influenza* est désigné par son type, son lieu d'isolement, son numéro et son année d'isolement. En ce qui concerne les IAV, le sous-type peut être précisé entre parenthèses. Par exemple, le virus *Influenza* A/Scotland/20/74 (H3N2) est un IAV de sous-type H3N2 isolé en Ecosse en 1974.

III.2.1.2 Structure du virion

Le virion grippal est une particule enveloppée et sphérique d'un diamètre compris entre 84 et 170 nm (Figure 29) (Calder *et al.* 2010; Harris *et al.* 2006). Le virion est composé d'une enveloppe formée d'une bicouche lipidique provenant de la cellule hôte d'où émergent les glycoprotéines transmembranaires HA et NA. HA est un trimère dont la principale fonction est la reconnaissance de récepteurs sous forme d'acides sialiques pour la fusion membranaire, tandis que NA est un tétramère dont l'activité enzymatique sialidase permet la libération du virion à l'extérieur de la cellule infectée.

M2 est la troisième protéine transmembranaire du virion. Il s'agit d'un canal à ion tétramérique dépendant du pH faisant partie des « Matrix Proteins » encodé par le même segment d'ARN que M1, une protéine formant une couche interne à la bicouche lipidique (Noton *et al.* 2007; Bui *et al.* 1996; K. Martin *et al.* 1991).

La particule virale renferme 8 segments d'ARN simple brin du virus encapsidés par la nucléoprotéine (NP) sous la forme de structures ribonucléoprotéiques hélicoïdales virales (vRNP). Les extrémités de chacun des segments d'ARN sont associées au RdRp (RNA-dependent RNA-polymerase complex), complexe de transcription/réplication du virus composé des protéines PB1, PB2 (Protéine Basique 1 et 2) et PA (Protéine Acide). Les vRNPs interagissent avec M1 pour maintenir l'intégrité du virion et sa stabilité (Ruigrok *et al.* 2000; Baudin *et al.* 2001; Ye *et al.* 1999).

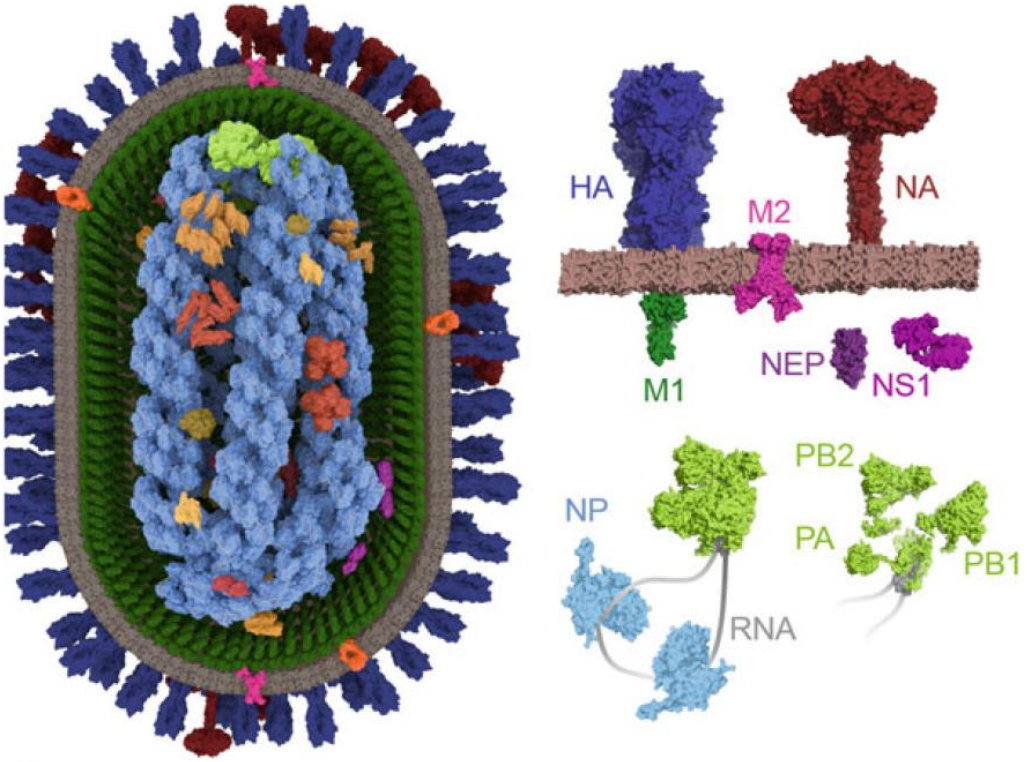


Figure 29 : Structure du virion Influenza A. (Hutchinson et al. 2018)

M1 est associée à NS2 (Protéine Non Structurale 2 ou NEP, Nuclear Export Protein), qui est une protéine permettant la translocation des vRNPs du noyau vers le cytoplasme (O'neill *et al.* 1998). Ces deux protéines permettent ainsi l'assemblage du futur virion qui enveloppe des composés de la cellule hôte et NS1, protéine virale inhibant la synthèse cellulaire et la réponse IFN-dépendante (Weber-Gerlach *et al.* 2016).

En addition de ces 10 protéines virales, des protéines supplémentaires peuvent être codées par les 8 fragments d'ARN, comme PB1-F2. Cette protéine est codée par un cadre de lecture en $^{+}1$ sur le segment codant pour PB1. Elle est présente chez certaines souches dont des souches pandémiques et contribuerait à la pathogénicité du virus, sans doute via des capacités pro-apoptotiques. Elle n'est toutefois pas présente dans le virion, mais plutôt dans le cytoplasme, le noyau et les mitochondries de la cellule hôte (Varga *et al.* 2011). Ainsi, selon les souches, jusqu'à 17 protéines peuvent être codées par le génome viral via un épissage de l'ARNm ou une initiation alternative de la traduction (Muramoto et al. 2013; H. M. Wise et al. 2009; Helen M. Wise et al. 2012; Nogales et al. 2018).

III.2.2 Cycle viral

III.2.2.1 L'entrée de la particule virale

Pour infecter les cellules, le virion doit au préalable se frayer un chemin à travers le mucus qui protège les cellules épithéliales. Ceci est facilité par les NA à sa surface qui ont une activité sialidase et clivent les acides sialiques des mucines. Une fois au contact de la partie apicale d'une cellule épithéliale, le virion peut reconnaitre sa cible.

III.2.2.1.1 Fixation au récepteur et spécificité de l'hôte

Une fois au niveau de la partie apicale de la cellule épithéliale, le virion reconnait un acide sialique présent à la partie terminale des glycans de glycoprotéines à la surface de la cellule, qui est généralement l'acide N-acetylneuraminique. Cette reconnaissance s'opère grâce à HA et permet l'endocytose de la particule virale par la cellule épithéliale (Lakadamyali *et al.* 2003).

La reconnaissance des acides sialiques par HA est considérée comme le premier facteur de spécificité des virus pour une espèce donnée. En effet, les acides sialiques sont des dérivés d'un sucre à 11 carbones possédant un groupement amine (en C5) et un groupement carboxyle (en C1). Ces sucres se lient à la partie terminale de glycoprotéines en α2-6 au niveau de la muqueuse naso-pharyngée et bronchique chez l'Homme, et en α2-3 au niveau des voies digestives et respiratoires chez les oiseaux (Rogers *et al.* 1983; Shinya *et al.* 2006). La liaison en α2-3 se retrouve également chez l'Homme mais au niveau des voies aériennes inférieures (bronches et alvéoles). Chez le porc, on retrouve les deux types de liaison réparties sur l'ensemble des voies respiratoires, sans compartimentation (T. Ito *et al.* 1998).

Ceci peut expliquer la spécificité des virus pour leur hôte, et la plus grande sensibilité des porcs à une cross-contamination. Les virus aviaires, plus spécifiques des liaisons en α2-6, peuvent provoquer des infections chez l'Homme mais de manière profonde et très peu transmissibles. Les virus humains vont en revanche provoquer des infections plus légères mais hautement transmissibles du fait de leur position dans la partie supérieure des voies respiratoires. En revanche, les porcs peuvent être infectés globalement à tous les niveaux des voies respiratoires, et serviraient de plate-forme de transmission pour les virus aviaires vers l'Homme (T. Ito *et al.* 1998; Rajao *et al.* 2019).

Ainsi, l'adaptation d'un virus d'une autre espèce à l'Homme semble avoir été la source de pandémies, comme les virus aviaires H2N2 et H3N2 en 1957 et 1968 respectivement ou le virus porcin H1N1 en 2009 (Byrd-Leotis *et al.* 2017).

Cette hypothèse peut être remise en question par des études montrant que les HA des virus réassortis présentent un nombre très restreints de substitutions à des positions clés par rapport à leurs précurseurs aviaires (Matrosovich *et al.* 2000; Vines *et al.* 1998). Cependant, il a été montré qu'un virus aviaire de type H7 possédant le segment NS (codant pour NS1 et NS2) d'un virus H5 transmissible à l'Homme peut se répliquer dans les cellules de mammifère *in vitro* de manière plus efficace que le virus WT. Il a de plus été montré qu'au contraire du virus WT, il peut également infecter des souris de manière pathologique voire létale (W. Ma *et al.* 2010).

III.2.2.1.2 Endocytose et fusion

Après fixation de HA sur son ligand, le virion est endocyté et va opérer une maturation en même temps que l'endosome. Ainsi, plus l'endosome se transforme en lysosome plus son pH devient acide et sa concentration en ion potassium est élevée (Stauffer *et al.* 2014). L'afflux d'ions K^+ et H^+ par le canal à ion M2 affaiblit les interactions entre M1 et les vRNPs, ce qui déstabilise l'intégrité du virion. Cela serait dû à un changement conformationnel de M1 au niveau d'une séquence reliant sa partie N-terminale à sa partie C-terminale, passant d'une conformation « dépliée » à une hélice alpha.

La baisse du pH conduit également à la protonation de HA (White *et al.* 1982), ce qui déstabilise sa structure tertiaire et entraine un changement conformationnel irréversible dévoilant le peptide de fusion. Ce peptide est une région du trimère qui permet la fusion de la membrane du virion avec la membrane endosomale. Cette fusion est permise par la

désorganisation de la matrice de M1 et par le repliement de HA sur elle-même (Skehel *et al.* 2000). Le contenu viral est ensuite libéré et le matériel génétique se retrouve ainsi dans le cytoplasme de la cellule (W. C. Su *et al.* 2013; Banerjee *et al.* 2014).

Les vRNPs vont ensuite se fixer à des facteurs d'imports nucléaires de la cellule hôte pour commencer leur réplication (Eisfeld *et al.* 2015).

III.2.2.2 Réplication et mécanismes de variation génétique

III.2.2.2.1 Réplication de l'ARN viral

Comme nous l'avons vu précédemment, IAV possède un génome composé de 8 segments d'ARN simple brin négatif. Cet encodage en sens négatif empêche une traduction directe, et nécessite donc l'action d'une polymérase virale pour assurer la transcription en ARN messager (ARNm) viral et la réplication en ARN complémentaire (Fodor 2013).

Ce rôle est assuré par le RdRp, qui permet à la fois la transcription et la réplication. Dans le cas de la transcription, le complexe polymérase utilise un fragment clivé d'un ARNm de la cellule hôte coiffé en 5' pour la formation de son propre ARNm. La reconnaissance et la fixation de la coiffe en 5' est assurée par PB2, tandis que PA clive le brin une dizaine de nucléotides après la coiffe selon un mécanisme appelé « cap-snatching » (Y. Li *et al.* 2001; De Vlugt *et al.* 2018; Plotch *et al.* 1981; Hale *et al.* 2010). Ce mécanisme permet également de cliver des ARNm de l'hôte et de diminuer l'activité traductionnelle des protéines de l'hôte au profit de celles du virus.

PB1 commence ensuite la transcription et l'élongation de l'ARNm viral, terminant sur une queue poly-A grâce à un encombrement stérique sur la partie poly-U en 5' de l'ARN viral. Cet encombrement provoque ainsi la répétition de la synthèse du motif poly-A sur l'ARNm par la polymérase qui « glisse » et recopie le motif pour former un queue poly-A, nécessaire à l'export nucléaire (L. L. Poon et al. 1998, 1999; L. L. M. Poon et al. 2000).

Une des particularités des virus *Influenza* (et des Orthomyxovirus en général) est de réaliser cette transcription dans le noyau de la cellule hôte, ce qui permet un éventuel épissage de l'ARNm (Dubois *et al.* 2014).

Les ARNm viraux sont ensuite traduits par les ribosomes de l'hôte et les protéines PB1, PB2, PA et NP transloquent dans le noyau pour encapsider de l'ARN génomique non coiffé en 5' pour initier la réplication. Cette réplication débute par la formation d'un ARN

complémentaire en sens positif puis se termine par la formation d'un brin d'ARN viral en sens négatif.

Après formation des vRNPs, ceux-ci interagissent avec M1 et NEP et sont exportés du noyau vers le cytoplasme via l'action de l'exportine 1 (XPO1 ou chromosomal maintenance 1, Crm1), un facteur d'export nucléaire (Eisfeld *et al.* 2015).

III.2.2.2.2 Mécanismes de variation génétique

Du fait de la nature de son génome, le virus *Influenza* est un virus qui évolue rapidement, empêchant par ses mécanismes de variation génétique la création d'un vaccin stable d'une année à l'autre. Cette évolution repose sur deux grands mécanismes d'évolution que sont la dérive antigénique et l'échange de matériels génétiques entre plusieurs virus.

Cette variabilité génétique permet au virus d'échapper au système immunitaire ou d'augmenter le nombre de ses cibles, principalement par modification de ses protéines de surface. La dérive antigénique est constante et résulte de l'accumulation de petites mutations au cours de la réplication virale. Ceci s'explique par une fréquence élevée des erreurs de l'ARN polymérase virale, comprise entre 2.0×10^{-6} et 2.0×10^{-4} mutations par site par cycle de réplication du génome (R. Chen *et al.* 2006; Fitch *et al.* 1991), ce qui se traduit par une fréquence de 10^{-3} à 10^{-4} substitutions nucléotidiques par site et par an selon les gènes et les virus (Parvin *et al.* 1986; Nobusawa *et al.* 2006; Kirkegaard *et al.* 2017). Cette fréquence très élevée se traduit par un fort renouvellement des séquences protéiques, celles-ci pouvant être modifiées en moins de 20 ans selon les sérotypes (R. Chen *et al.* 2006).

La pression de sélection induite par l'hôte permet par la suite l'émergence de nouvelles souches pathogènes. Celle-ci est notamment causée par un phénomène appelé « séniorité antigénique », c'est à dire le fait d'avoir une plus grande concentration en anticorps dirigés contre des virus rencontrés dans les premières années de vie que contre les virus récents (Lessler *et al.* 2012; Petrova *et al.* 2018). Ainsi, une infection avec un virus similaire à celui rencontré lors d'une primo-infection va shunter la réponse innée au profit de la réponse adaptative (notamment humorale) spécifique d'un type particulier. Si un autre type de virus est présent dans la charge virale initiale, celui-ci rencontrera donc une réponse immunitaire affaiblie par rapport à celle rencontrée en primo-infection (Lessler *et al.* 2012; M. S. Miller *et al.* 2013; Davenport *et al.* 1956).

D'autre part, la nature segmentée du génome des IAV favorise l'échange de matériel génétique entre deux virus lors de la co-infection d'une même cellule. Ainsi de tel réassortiments se produisent assez régulièrement entre virus humains comme en témoigne l'émergence de virus H1N2 en 1988 et 2001 ayant acquis la HA de virus H1N1 et la NA de virus H3N2 (Xu *et al.* 2002; R. Chen *et al.* 2006; Al Faress *et al.* 2008; Y. Guo *et al.* 1992; Gregory *et al.* 2002). Par ailleurs, plus sporadiquement, les réassortiments sont susceptibles de se produire entre virus d'hôtes différents en particulier entre virus aviaire et mammalien. Par exemple, la grippe pandémique H1N1 de 2009 est issue d'un réarrangement entre des virus aviaire, porcin et humain au sein de l'hôte porcin (Garten *et al.* 2009; G. J. D. Smith *et al.* 2009).

Ces phénomènes sont ainsi responsables de cassures antigéniques (« antigenic shift ») correspondant à l'introduction dans la population humaine de virus porteurs d'un nouveau segment, par exemple un sous-type d'HA et NA et pouvant donner lieu à des pandémies.

III.2.2.3 Assemblage et libération des particules virales

Nous avons vu dans une partie précédente qu'une fois traduites, les protéines PB1, PB2, PA et NP transloquent dans le noyau afin de former avec l'ARN viral des vRNPs prêts à être exportés hors du noyau. La translocation de ces protéines se fait en parallèle de M1 et NEP, qui sont présentes dans le noyau de la cellule hôte et interagissent avec les vRNPs pour permettre leur export (Figure 30).

Dans le cytoplasme, le complexe vRNP-M1-NEP se fixe ensuite sur les membranes exprimant Rab11, une protéine régulant l'exocytose et le recyclage cellulaire. L'interaction avec Rab11 permet au complexe viral d'être amené au niveau de la membrane plasmique apicale de la cellule hôte (Bruce *et al.* 2010; Amorim *et al.* 2011).

En parallèle, les protéines HA, NA et M2 traduites dans le cytoplasme subissent ensuite des modifications post-traductionnelles dans le réticulum endoplasmique et dans l'appareil de Golgi pour être exocytés à la surface de la cellule sous forme de protéines transmembranaires (Figure 30) (Hutchinson *et al.* 2014).

Une fois au niveau de la surface de la membrane cellulaire, le complexe vRNP-M1-NEP est exocyté, emportant avec lui la bicouche lipidique et les protéines transmembranaires, piégeant des protéines du cytoplasme comme NS1, très abondante dans le cytoplasme de la cellule hôte (Figure 30). La libération du virion est assurée par NA qui clive les acides sialiques

de la membranes fixés par HA. Cette étape est ciblée par l'un des antiviraux les plus connus contre la grippe, l'analogue des acides sialiques et inhibiteur de NA oseltamivir (Tamiflu).

Après sa libération, le virion est capable de transiter dans le mucus et d'infecter de nouvelles cellules.

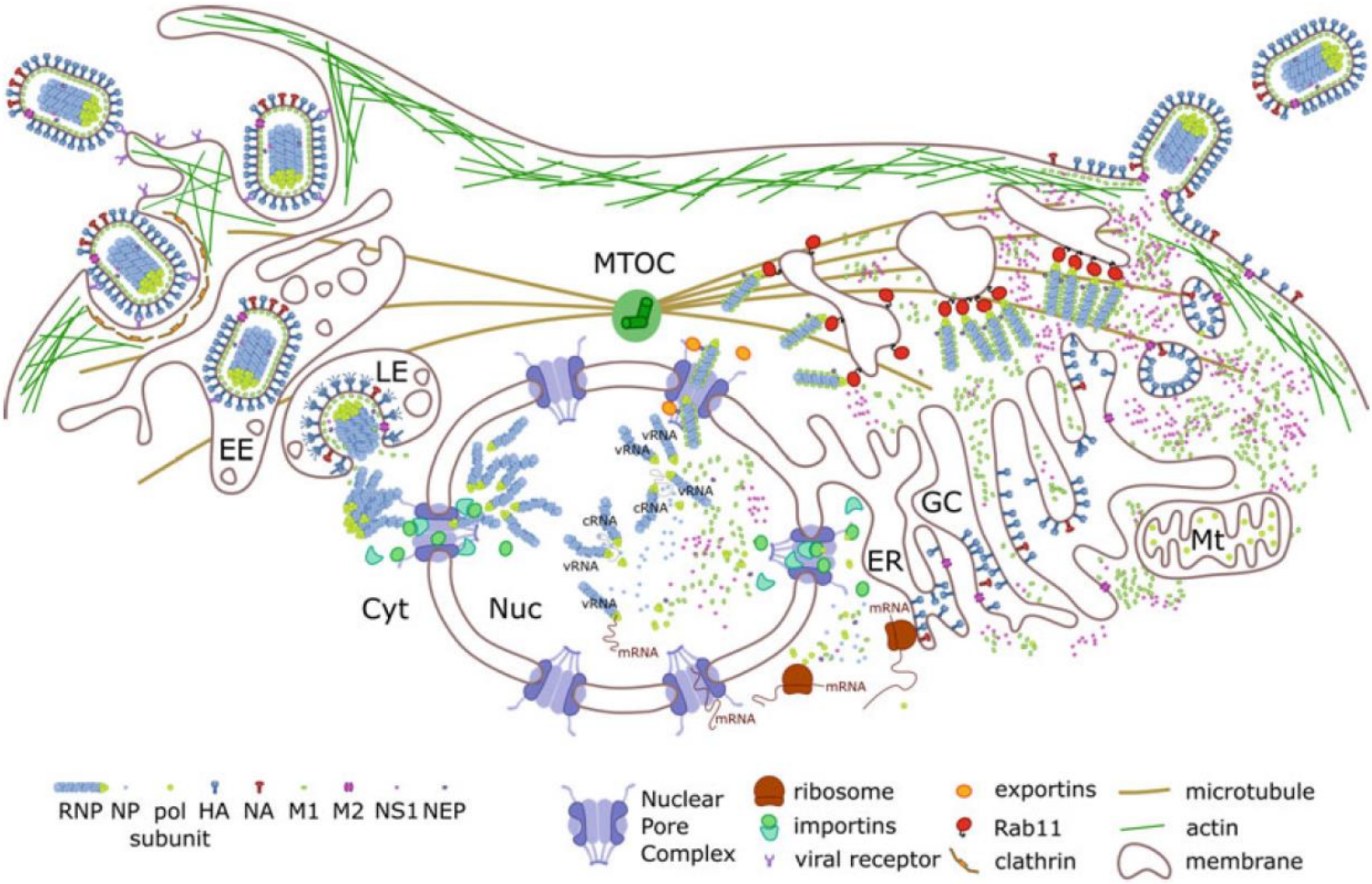


Figure 30 : Infection d'une cellule de l'hôte par IAV. (Hutchinson et al. 2018)

III.3 Généralités sur la grippe

La grippe est une maladie très commune aux multiples visages, provoquant souvent des symptômes ne nécessitant pas d'hospitalisation mais qui peuvent s'aggraver rapidement selon les personnes (jeunes ou âgées, immunodéprimés, femmes enceintes etc.). La maladie est généralement épidémique d'une année à l'autre mais des pandémies meurtrières se sont déjà déclarées et malgré la présence d'un vaccin, la grippe reste un enjeu de santé majeur dans le monde.

III.3.1 La grippe épidémique saisonnière

III.3.1.1 Les symptômes grippaux et modes de transmission

La grippe clinique se traduit par des symptômes regroupés sous le terme de « syndrome grippal », à savoir une toux, des rhinorrhées claires, des frissons et de la fièvre, des céphalées associées à des myalgies (Rewar *et al.* 2016). L'intensité de ces symptômes et leur durée est très variable selon les individus, une grippe moyenne présentant des symptômes modérés sur une période de 4 à 5 jours. Dans les cas les plus sévères, une pneumonie peut apparaitre et nécessiter une hospitalisation.

La transmission du virus d'Homme à Homme se fait via différents mécanismes. La principale voie de transmission consiste en des gouttelettes aéroportées produites lors de la toux ou d'un éternuement du patient. Ces gouttelettes peuvent être d'un diamètre faible (<5 µm) ou plus important (>5 µm) (Sooryanarain *et al.* 2015). Les gouttelettes de faible diamètre sont essentielles dans la dissémination aéroportée du virus (Morawska 2006; R. J. Thomas 2013), tandis que les grosses gouttelettes se déposent sur des objets et permettent une transmission par contact (Tellier 2009; Milton *et al.* 2013).

III.3.1.2 Epidémiologie et dynamique du virus

La grippe fait partie des infections des voies respiratoires inférieures (Low Respiratory Tract Infection, LRTI), sixième cause de mortalité dans le monde avec environ 2,55 millions de morts en 2017 selon le consortium GBD (Global Burden of Disease) (Roth *et al.* 2018a; Naghavi *et al.* 2017). Les LRTI sont notamment causées par 4 grands acteurs avec, dans l'ordre croissant du nombre d'épisodes annuels : *Streptococcus pneumoniae*, *Influenza*, virus respiratoire syncytial et *Haemophilus Influenzae* type b. La grippe représente 5.6% des morts causées par les LRTI en 2017 soit environ 145 000 morts, mais le virus serait toutefois associé

à davantage de décès et un rapport estime à entre 290 000 et 650 000 le nombre de décès imputables en partie à la grippe dans le monde (Iuliano *et al.* 2018; C. E. Troeger *et al.* 2018).

Les personnes âgées de plus de 70 ans forment la population la plus menacée par la grippe, comptant pour près de la moitié des décès avec environ 71000 morts en 2017. Cette population montre également le taux de mortalité le plus élevé avec une moyenne de 16.7 pour 100 000, cette valeur explosant en approchant des centenaires. Le second groupe le plus touché est composé des enfants de moins de 5 ans, qui est plus sensible aux infections malgré un taux de mortalité inférieur.

En France, le GBD estime à entre 1000 et 2000 le nombre de décès imputables à la grippe pour environ 36000 hospitalisations. Son coût est évalué à environ 3 milliards d'euros chaque année, notamment du fait des arrêts de travail en plus du coût hospitalier (Peasah *et al.* 2013). Le nombre de consultations pour une grippe est en effet élevé en France où près de 3.3 millions de personnes ont consulté un médecin généraliste ou un pédiatre pendant la période épidémique de 2013/2014 (GROG Réseau).

Un phénomène très intéressant dans l'épidémie annuelle de la grippe est sa dynamique de propagation. Ainsi, des études ont démontré un déplacement progressif des infections grippales au cours de la période épidémique de l'Asie vers l'Ouest, débutant en automne pour terminer au début du printemps. La Chine est souvent perçue comme étant le point de lancement et de propagation des épidémies saisonnières, mais les données récentes indiquent également un rôle important de l'Inde dans cette dynamique (Petrova *et al.* 2018).

III.3.2 Les complications de la grippe

Souvent bénigne et résolue en moins d'une semaine, la grippe peut mener à des complications sévères qui peuvent être liées directement au virus ou à l'environnement.

III.3.2.1 Les surinfections bactériennes

Nous avons vu dans la partie précédente que la majorité des décès liés à la grippe n'étaient pas causés directement par le virus. Cette mortalité supplémentaire est due en particulier à des surinfections bactériennes qui sont présentes fréquemment lors d'une infection grippale. Ainsi, une étude menée par Andrea Dugas a mis au jour que, dans la littérature et auprès de 27 études comprenant plus de 3000 patients, le virus de la grippe était présent en co-infection avec une bactérie dans 23% des cas en moyenne (Klein *et al.* 2016).

Cette valeur varie fortement selon les études (de 1.9% à 65.4%) qui regroupent des patients extrêmement différents (zone géographique, âge, type du virus et année etc.)

Cette revue de la littérature montre également la prépondérance de deux bactéries responsables de coinfections : *Streptococcus pneumoniae* (première cause de décès dans les LRTI) et *Staphylococcus aureus*. Ces deux bactéries résident dans les voies aériennes supérieures et peuvent profiter des dégâts tissulaires (notamment du tapis muco-ciliaire) lors de l'infection grippale pour envahir les parties inférieures.

III.3.2.2 Pneumonie et SDRA

Le virus *Influenza* provoque de sévères dommages tissulaires dans les poumons mais également une forte inflammation générée par l'hôte pour contrer l'infection. Dans les cas extrêmes, l'infection virale mène à la mort du patient. Ceci est notamment le cas lors de pandémies mortelles que nous aborderons dans le point suivant.

L'autopsie de patients morts de la grippe révèle des dégâts alvéolaires diffus associés à des hémorragies et des bronchiolites nécrosantes (Gill *et al.* 2010). Ces dégâts associés à la pneumonie peuvent être liés au virus lui-même, à l'inflammation provoquée ou aux deux (Short *et al.* 2014). De plus, la pneumonie virale peut être accompagnée ou suivie de pneumonies bactériennes (Palacios *et al.* 2009; Morens *et al.* 2008).

La plus grande menace au cours d'une infection grippale est le SDRA, syndrome de détresse respiratoire aiguë qui peut survenir lors d'une atteinte grave aux poumons (Ramsey *et al.* 2011). Un consortium, The ARDS Definition Task Force, a posé la définition de Berlin pour identifier clairement ce syndrome qui reste mortel dans 40% des cas (Definition 2012).

Ce syndrome est particulièrement bien associé à la grippe car cette dernière est l'exemple-type d'une immunopathologie, maladie dont les symptômes sont majoritairement provoqués par la réponse de l'hôte lui-même et non par le pathogène. Nous verrons dans les parties suivantes comment ceci peut se produire, et le rôle important du neutrophile dans cette pathogenèse.

III.3.3 Les pandémies de grippe

A la différence des épidémies qui touchent, pendant une même période de temps, une région donnée, les pandémies affectent en un temps très court une grande zone géographique et se caractérisent par leur très grande vitesse de propagation.

Si les premières descriptions d'épidémies de grippe sont retrouvées dès l'Antiquité (Potter *et al.* 2011), la pandémie de grippe décrite en 1510 (Morens, North, *et al.* 2010) semble être le premier épisode à l'origine de « périodes pandémiques » (Morens and Taubenberger 2010). Plusieurs pandémies sont apparues par exemple au XIX^{ème} siècle, notamment en 1889 avec l'apparition d'un virus qui serait du type H3N8 (Valleron *et al.* 2010).

Toutefois, la pandémie sans doute la plus mortelle de l'histoire de l'humanité et la plus ancienne qui soit bien documentée est la pandémie de grippe de 1918 ou grippe espagnole. Cette pandémie reste exceptionnelle par le nombre de décès qu'elle a engendré (entre 20 et 40 millions de personnes) et par la mortalité accrue des jeunes adultes (Taubenberger *et al.* 2000; Webster 1999). Cette sensibilité des jeunes adultes et la relative protection des plus âgés est restée une source d'interrogation et plusieurs études ont tenté d'interpréter cette situation. L'hypothèse la plus communément admise aujourd'hui est la protection de la population âgée par une exposition à un virus similaire lors de l'enfance (Worobey *et al.* 2014a). Ce phénomène de séniorité antigénique aurait donc contribué à la survie des plus âgés, la population des 20-40 étant particulièrement touchée (Figure 31).

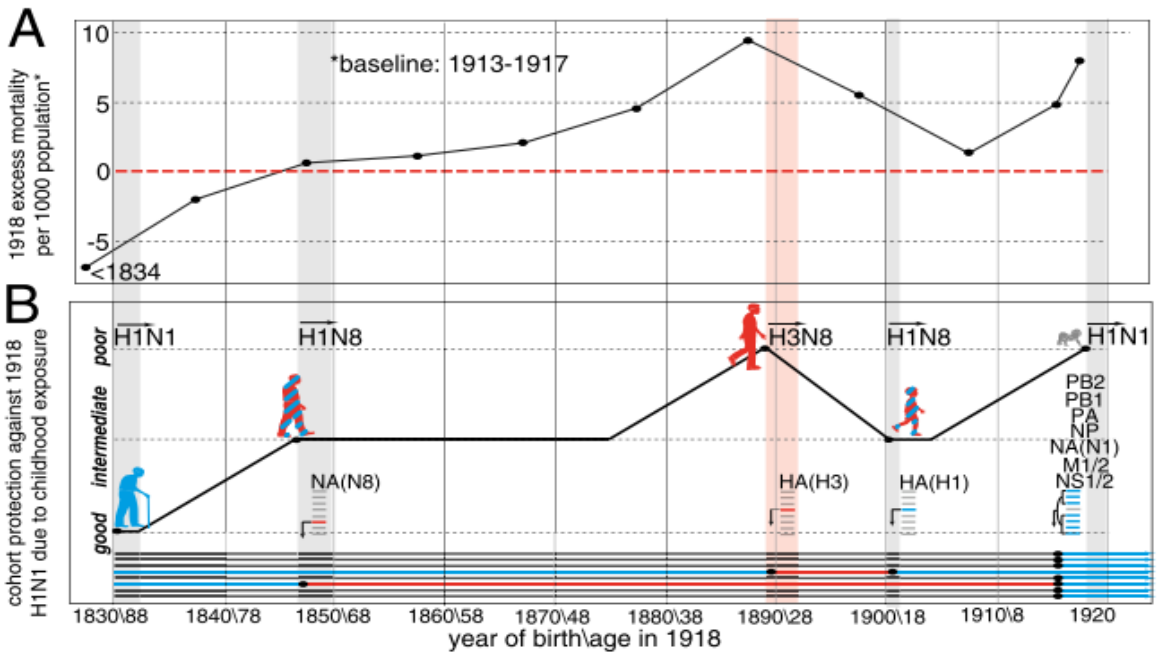


Figure 31 : Protection et vulnérabilité à la pandémie de virus Influenza A de 1918. (Worobey et al. 2014)

A) Mortalité excédentaire liée à Influenza en 1918 selon l'âge des personnes.
B) Niveau de protection des personnes selon leur date de naissance et les épisodes d'Influenza rencontrés pendant l'enfance. Bleu : correspondance de HA et NA avec ceux du virus de 1918. Bleu/Rouge : Correspondance HA ou NA. Rouge : Aucune correspondance avec le virus de 1918. Les indications de protéines virales montrent les recombinaisons.

De plus en plus de preuves, notamment séroarchéologiques (Reid *et al.* 1999), semblent ainsi indiquer un réarrangement du virus H1N1 au cours du temps. La présence d'une HA de type H1 serait ainsi attestée entre 1830 et 1889 avant de laisser la place à une H3 (Figure 31). De même, une NA de type N8 aurait succédé à N1. Les personnes ayant été en contact avec un virus H1N1 voire H1N8 auraient donc été mieux protégées que ceux ayant été en contact avec un H3N8 lors de leur enfance (Figure 31).

En dehors de cet évènement exceptionnel, deux autres grandes pandémies sont apparues au XX^{ème} siècle, la grippe « asiatique » en 1957 (H2N2) et de « Hong-Kong » en 1968 (H3N2). Ces pandémies, beaucoup moins meutrières, se caractérisent par une origine aviaire de certains de leurs segments, tout comme le virus H1N1 de 1918. On peut ainsi citer les segments PB1, HA et NA pour le virus de 1957 ou PB1 et HA pour celui de 1968 tandis que la quasi-totalité des segments du virus de 1918 sont d'origine aviaire, sauf HA (Worobey *et al.* 2014b; Kawaoka *et al.* 1989; Scholtissek *et al.* 1978).

Enfin, si une recrudescence de cas d'infection par un virus H1N1 a été observée en 1977, sous la forme d'une pandémie légère et peu mortelle, un nouveau virus H1N1 est apparu en 2009. Ce virus, issu d'un réarrangement de segments humains, porcins et aviaires, a été responsable de moins de 300 000 décès à travers le monde mais a eu un très fort impact au niveau économique (Viboud *et al.* 2012). A présent, les nouvelles combinaisons H5N1 et H7N9 font craindre le retour de pandémies meutrières.

III.4 La réponse immunitaire dirigée contre IAV

III.4.1 Reconnaissance du virus et activation de la réponse innée

Le virus *Influenza* infecte initialement les cellules épithéliales tapissant l'arbre respiratoire et engendre une réponse immunitaire localement au niveau des poumons.

III.4.1.1 Reconnaissance du virus par les récepteurs innés

Les particules virales forment des antigènes reconnus par les PRR des cellules « sentinelles » des poumons, à savoir les cellules épithéliales elles-mêmes, les cellules dendritiques et les macrophages alvéolaires. Ces cellules sont constamment à la recherche de menaces dans la lumière des poumons, ce qui permet une reconnaissance rapide des pathogènes et l'activation de la réponse immunitaire (Tripathi *et al.* 2015). Cette activation

s'opère via la production de cytokines (IFN de type I notamment) et de chimiokines permettant le recrutement des leucocytes.

Trois mécanismes différents sont à l'origine de la reconnaissance du virus et font intervenir trois familles de récepteurs (Figure 32) :

-La protéine cytoplasmique de reconnaissance de l'ARN RIG-1

-Les récepteurs TLR3 et 7

-Le récepteur lié à l'inflammasome NLRP3

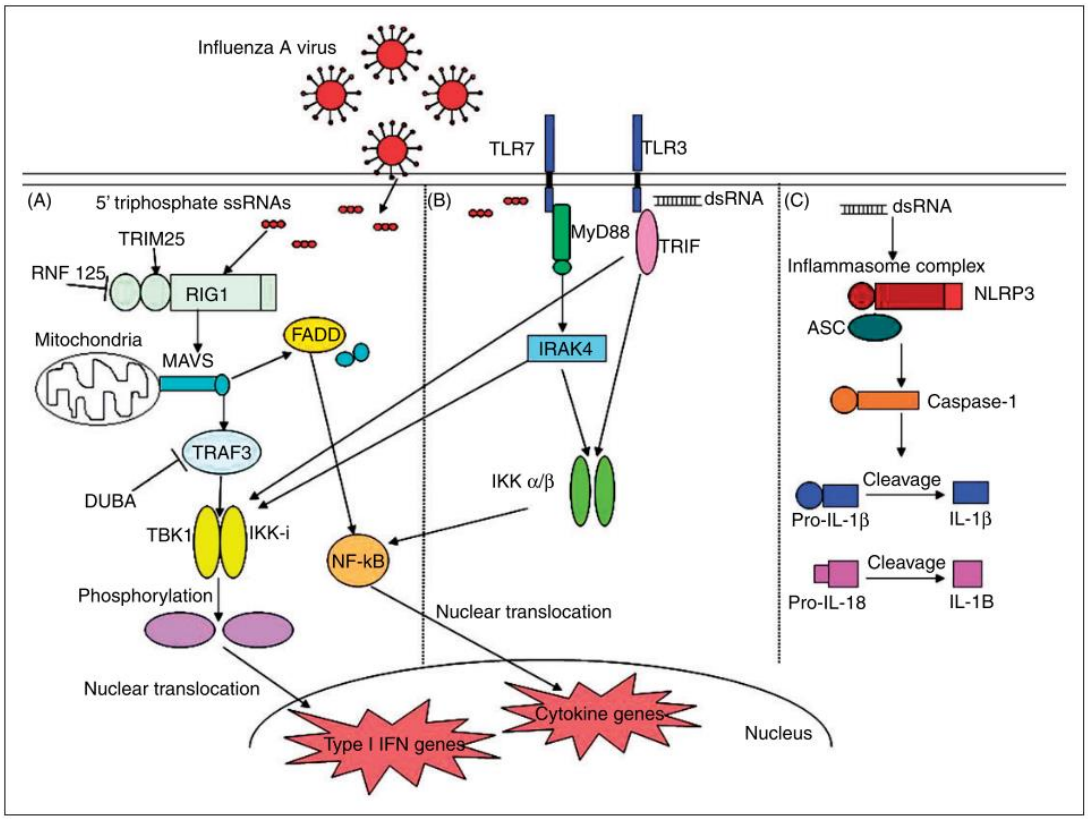


Figure 32 : Reconnaissance de IAV par les PRR. (Tripathi et al. 2015)

Les deux premières familles de récepteurs induisent la production des IFN de type I pour l'induction de la réponse antivirale et la voie NF-κB pour l'induction de l'inflammation. L'inflammasome est responsable de la production d'IL-1β et d'IL-18, deux cytokines extrêmement importantes dans l'inflammation. L'activation de ces voies est détaillée dans la partie II.5.1.

Chaque famille est plus ou moins spécifique d'un type cellulaire et on retrouvera préférentiellement les signaux de RIG-1 et TLR3 chez les cellules épithéliales, TLR7 chez les DC et NLRP3 chez les macrophages, DC et neutrophiles (Guillot *et al.* 2005; Le Goffic *et al.* 2006, 2007; Pichlmair *et al.* 2006; Diebold *et al.* 2004).

Cette pluralité permet également de contrer les adaptations du virus dont les protéines ont des capacités immunomodulatrices surprenantes. On peut ainsi citer la capacité de NS1 à supprimer l'activation de RIG-1 ou de la voie NF-κB, et à inhiber la maturation de la pro-caspase-1 (Diebold *et al.* 2004; Cheong *et al.* 2015). Dans le cas de RIG-1, NS1 cible le complexe de trancription/élongation PAF1 qui se lie à l'ubiquitine ligase TRIM25 (Tripartite Motif 25 ubiquitin ligase) et inhibe l'activation de RIG-1 par celle-ci (Gack *et al.* 2009; Marazzi *et al.* 2012).

III.4.1.2 Mise en place de la réponse immunitaire innée

Lors d'une infection pulmonaire, le premier acteur de la réponse immunitaire innée est la cellule épithéliale. Il a ainsi été démontré qu'en plus de son rôle dans la reconnaissance du virus, la cellule épithéliale peut produire une gamme de médiateurs permettant entre autres le recrutement et l'activation de cellules innées. Un rôle essentiel dans la production des interférons par les cellules épithéliales en réponse au virus Sendai a notamment été identifié (Shornick *et al.* 2008). La production de GM-CSF a également été démontrée chez des souris infectées au virus *Influenza*, permettant le recrutement de DC sur le lieu d'infection (Unkel *et al.* 2012). Le GM-CSF joue également un rôle dans le recrutement des macrophages et neutrophiles. Il est intéressant de remarquer que, si les cellules épithéliales produisent des interférons de type I, ce sont les DC plasmacytoïde et les macrophages alvéolaires qui produisent la majorité de ces cytokines après infection (Kumagai *et al.* 2007).

Les interférons de type I sont les principaux médiateurs de la réponse antivirale, IFN-α et IFN-β étant les mieux étudiés dans la réponse anti-IAV. Ils agissent via leur récepteur IFNAR1/2 et le facteur de transcription STAT1 pour induire l'expression d'ISG (Interferon-stimulated genes) qui vont stimuler la production d'interférons ou de composés à action antivirale comme la PKR (Protein Kinase R) qui induit l'apoptose chez les cellules infectées (Gibbert *et al.* 2013; Pinto *et al.* 2000).

Ils peuvent également stimuler la production de cytokines et chimiokines par les cellules immunitaires comme l'IL-6, l'IL-1β, l'IL-18 et le TNF-α, ou encore CXCL10 et CCL8 (Pirhonen *et al.* 1999; Chan *et al.* 2005). Ces cytokines et chimiokines participent ensuite à l'inflammation via le recrutement et l'activation des cellules immunitaires, notamment des monocytes, des NK ou des neutrophiles.

Le rôle des monocytes/ macrophages dans l'infection grippale est notamment la production des cytokines pro-inflammatoires citées précédemment, en plus de leur activité de phagocytose des virions et débris cellulaires.

Les cellules NK activées ciblent en revanche directement les cellules épithéliales infectées grâce à la reconnaissance de la protéine virale HA via NKp46 (Mandelboim *et al.* 2001; Arnon *et al.* 2004; Gazit *et al.* 2006; Glasner *et al.* 2012). Elles participent également à la production d'IFN-γ qui est une cytokine immunomodulatrice majeure de l'immunité (Schoenborn *et al.* 2007). L'injection d'IFN-γ à des souris avant une infection à *Influenza* est en effet bénéfique et les souris *Ifng*$^{-/-}$ sont plus sensibles à l'infection que les souris WT (Weiss *et al.* 2010; Wiley *et al.* 2001).

Les DC recrutées sur le lieu d'infection jouent également un rôle de producteur de cytokines, mais vont surtout amorcer la réponse immunitaire adaptative en présentant les déterminants antigéniques du virus aux lymphocytes dans les ganglions lymphatiques. Ainsi, si leur rôle de cellule sentinelle dans les poumons à l'homéostasie les conduit régulièrement aux ganglions (Hintzen *et al.* 2006), les DC ne sont pas complètement matures et ne sont que faiblement potentes pour l'initiation d'une réponse adaptative. Après « priming » via notamment les IFN de type I, les DC matures augmentent leur expression de protéines liées à la présentation antigénique comme le CMH II, CD80, CD86 et CD40. Après être rentré en contact avec le virus, les DC migrent vers les ganglions (via CCR7 (T. S. Kim *et al.* 2009)) et initient la réponse adaptative (Legge *et al.* 2003). Le rôle des DC dépend alors du type de sous-population présente, chacune présentant des affinités et compétences différentes pour initier la réponse adaptative.

III.4.2 La réponse immunitaire adaptative

La réponse immunitaire adaptative apparait tardivement en comparaison de la réponse innée, mais elle est spécifique du virus *Influenza*. Cette réponse regroupe la réponse cellulaire ou T spécifique et la réponse humorale B spécifiques, toutes deux ciblées par les vaccins antigrippaux.

III.4.2.1 La réponse T spécifique

La réponse T spécifique est initiée par les DC au sein des ganglions drainants des poumons 72h après le début de l'infection. La pré-activation des LT s'opère par la reconnaissance de déterminants antigéniques présentés par les DC via leur CMH de type I ou

II grâce au TCR des lymphocytes et leurs molécules de co-stimulation dont CD8 et CD4. L'activation des LT est fortement dépendante de la DC rencontrée, et on peut citer le rôle important des DC CD103$^+$ dans l'activation des LT CD8$^+$ cytotoxiques et des LT CD4$^+$ effecteurs (GeurtsvanKessel *et al.* 2008; Helft *et al.* 2012), tandis que les DC CD11b$^+$ activent uniquement les LT CD4$^+$ (Nakano *et al.* 2009).

Les DC stimulent également l'expression de CCR4 sur les LT, induisant leur migration vers les poumons en suivant un gradient de CCL17 et CCL22 (Mikhak *et al.* 2013). Les LT répondent également à d'autres chimiokines permettant le recrutement massif de LT pré-activés dans les poumons.

Une fois sur le lieu de l'infection, les LT participent à la clairance virale via leurs mécanismes spécifiques. Ils sont ainsi nécessaires dans la lutte contre l'infection à *Influenza* (Hufford *et al.* 2014).

III.4.2.1.1 La réponse cytotoxique : le rôle exclusif des LT CD8$^+$

Un des mécanismes les plus répandus dans la lutte contre une infection virale est l'induction de la mort des cellules infectées par celui-ci. Si les NK jouent ce rôle en tant que première ligne de l'immunité innée, les LT CD8$^+$ sont plus spécifiques dans leur action. Ils reconnaissent ainsi les antigènes présentés par le CMH I des cellules épithéliales infectées et les tuent grâce à deux mécanismes distincts qui opèrent en synergie. Après reconnaissance CMH I/ TCR, les LT CD8$^+$ peuvent ainsi soit libérer des granules composés d'enzymes provoquant l'apoptose des cellules, soit fixer des protéines membranaires et induire un signal pro-apoptotique.

Les granules contiennent des molécules pro-apoptotiques qui passent dans le cytoplasme de la cellule-cible via les pores créés par la perforine. Le plus connu de ces facteurs pro-apoptotiques est le granzyme B, qui induit l'apoptose de la cellule via deux mécanismes distincts (Cullen *et al.* 2007; Kaiserman *et al.* 2006; Waterhouse *et al.* 2005). Chez la souris, la voie privilégiée est le clivage des pro-caspases (notamment la pro-caspase 8) en leur forme active, qui induit l'apoptose de la cellule. Chez l'Homme, le granzyme B clive Bid (Bcl-2 homology 3-interacting domain death agonist), qui initie les voies d'apoptose liées aux mitochondries. L'action de la perforine est dans les deux cas essentielle, l'activité cytotoxique ne pouvant se réaliser sans elle (Kägi *et al.* 1994). La sécrétion de vésicules lysosomales par

les LT est non létale pour ceux-ci, une cellule peut donc provoquer successivement l'apoptose de plusieurs cellules infectées.

L'engagement du TCR augmente aussi l'expression par le LT du Fas Ligand, qui reconnait son récepteur Fas exprimé par la cellule cible (Rouvier *et al.* 1993). La liaison de FasL à Fas active le domaine FADD de celui-ci et entraine le recrutement de la pro-caspase 8, qui une fois clivée provoque la cascade des caspases et la mort cellulaire (Dockrell 2003). La reconnaissance de TRAIL par son récepteur TRAIL-DR provoque une réaction similaire pour aboutir à la mort cellulaire.

III.4.2.1.2 La production de médiateurs solubles

Lors de l'infection, les LT $CD4^+$ en particulier mais aussi les $CD8^+$ produisent des cytokines, dont deux principales : l'IFN-γ et le TNF-α. L'IFN-γ est l'une des cytokines les plus produites, et possède un large éventail de cibles cellulaires et d'actions. On peut ainsi citer un rôle dans le recrutement des leucocytes, dans la réponse humorale, dans l'activation des cellules ou encore dans l'immunopathologie liée au virus *Influenza* (Graham *et al.* 1993; S. J. Turner *et al.* 2007; Bot *et al.* 1998; Wiley *et al.* 2001).

Tout comme l'IFN-γ, le TNF-α est produit par les LT $CD4^+$ et $CD8^+$. Il s'agit d'une cytokine avec une large gamme de cibles (son récepteur TNFR1 est ubiquitaire, et son récepteur TNFR2 est présent sur les cellules immunitaires) et possède des compétences différentes selon la cible et le contexte. Le TNF-α peut ainsi promouvoir une réponse pro- ou anti-inflammatoire, en stimulant ou inhibant la production de certaines cytokines par exemple ou en induisant soit la prolifération cellulaire, soit l'apoptose (Damjanovic *et al.* 2011; Peper *et al.* 1995; Belisle *et al.* 2010).

Les LT $CD4^+$ produisent aussi de l'IL-2 qui augmente les capacités cytotoxiques et de l'IL-10 qui est une cytokine immunorégulatrice majeure dans l'infection à *Influenza*. Ainsi, la fixation de cette cytokine sur son récepteur IL-10R inhibe l'expression du CMH et des molécules de co-stimulation, module l'expression de cytokines pro-inflammatoires et supprime la prolifération cellulaire (Couper *et al.* 2008). Le rôle de l'IL-10 dans la grippe est toutefois complexe et semble bénéfique ou délétère, selon le moment de l'infection et le tissu affecté (J. Sun *et al.* 2009; McKinstry *et al.* 2009; K. Sun *et al.* 2010).

III.4.2.2 La réponse B spécifique

Les LB et leur production d'anticorps sont essentiels dans la lutte contre l'infection à *Influenza*. Leur rôle dans la phase tardive de l'infection a été clairement démontré, et des souris déficientes en LB montrent un défaut de contrôle du virus et une mortalité plus importante que les souris WT (Rangel-Moreno *et al.* 2008; Graham *et al.* 1997; Lee *et al.* 2005).

Les LB produisent différents isotypes d'anticorps pendant l'infection grippale, et on peut citer le rôle important des IgM dans le contrôle de la charge virale et des IgA dans l'inhibition de la transmission du virus (Seibert *et al.* 2013; Mazanec *et al.* 1992; Nicole Baumgarth *et al.* 2000; Kopf *et al.* 2002). Ultérieurement, les IgG sont produites et réduisent notamment la pathogenèse liée au virus. Ces anticorps jouent un rôle dans la cytotoxicité liée aux anticorps (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) et dans la capture des virions (Jegaskanda *et al.* 2014). On distingue ainsi les anticorps neutralisants le virus des anticorps non neutralisants mais nécessaires pour médier les actions antivirales.

III.4.3 Immunopathologie

L'infection au virus *Influenza* se caractérise par des dégâts tissulaires liés à l'inflammation censée lutter contre le virus. L'immunopathologie est causée par un phénomène appelé « tempête cytokinique » (ou "cytokine storm") (X. J. zhi J. Guo *et al.* 2017; Q. Liu *et al.* 2016), c'est à dire une boucle inflammatoire auto-alimentée par les cytokines produites pour lutter contre l'infection.

Ainsi, un grand nombre de molécules retrouvées dans les lavages bronchoalvéolaires de patients sont corrélées avec la sévérité de la pathologie. La majeure partie de ces molécules sont des cytokines nécessaires au contrôle de l'infection comme les IFN, TNF, IL-1β ou encore l'IL-6 (Hayden *et al.* 1998; Van Reeth 2000; Szretter *et al.* 2007; Kaiser *et al.* 2001).

Cette tempête de cytokine provoque notamment un recrutement abusif de cellules immunitaires comme les neutrophiles et la surproduction de composés létaux pour la paroi pulmonaire comme les ROS ou des protéines de remodelage tissulaire (Oda *et al.* 1989; Snelgrove *et al.* 2006). Si elle n'est pas contrôlée à temps par l'organisme, la surinflammation mène à des pathologies graves comme la pneumonie voire le SDRA (Ramsey *et al.* 2011).

III.5 Rôle du neutrophile dans l'infection à IAV

Longtemps laissés de côté dans l'étude des pathologies virales du fait de leurs propriétés antibactériennes, les neutrophiles sont de plus en plus étudiés et montrent un rôle établi dans de nombreuses infections virales. Les neutrophiles forment ainsi la première vague de cellules recrutées via leurs PRR lors de l'infection à *Influenza*, avant de participer à la seconde vague de leucocytes recrutés par les chimiokines (via CXCR2) (Wareing *et al.* 2007).

On retrouve ainsi de nombreux composés dérivés des neutrophiles dans les lavages bronchoalvéolaires de patients atteints de grippe et de SDRA. Le rôle des neutrophiles dans cette infection est toutefois encore soumis à débat, avec des études montrant un effet bénéfique ou délétère résumant le caractère paradoxal du neutrophile dans la grippe.

III.5.1 Le neutrophile, un acteur essentiel dans la lutte contre le virus

Plusieurs études ont mis au jour le caractère bénéfique du neutrophile en utilisant des modèles murins infectés à la grippe et déplétés en neutrophiles (Fujisawa *et al.* 1987). Les travaux de Tate et al sur différentes souches virales montrent par exemple un effet délétère de la suppression des neutrophiles avant infection par injection d'anticorps anti-Ly6G (clone 1A8) (Tate *et al.* 2011, 2009).

Les neutrophiles semblent par exemple capables de phagocyter des virions *in vitro* (Yamamoto *et al.* 1989). *In vivo*, les neutrophiles phagocytent les cellules infectées en apoptose à la manière des macrophages et stimulent la phagocytose de ces derniers, limitant ainsi la propagation du virus (Hashimoto *et al.* 2007; Fujimoto *et al.* 2000; Iyoda *et al.* 2005). Cette phagocytose peut être complétée par la capacité du neutrophile à agir en tant qu'APC pour promouvoir la réponse des LT face au virus, et particulièrement celle des LT $CD8^+$ (Tate *et al.* 2012; Vono *et al.* 2017; Hufford *et al.* 2012).

En plus de cette activité, les neutrophiles produisent de nombreux composés qui ont des actions antivirales. La production de ROS semble par exemple avoir un effet antiviral du fait des dommages provoqués sur l'ADN, et le virus de la grippe semble induire la production de ROS par les neutrophiles (Akaike *et al.* 1996; Maeda *et al.* 1991). Les α-défensines comme HNP-1 et HNP-2 (Human Neutrophil Peptide 1 et 2) montrent un rôle dans l'inhibition de l'infectivité du virion et dans la stimulation de la prise en charge de celui-ci par les neutrophiles *in vitro* (Tecle *et al.* 2007). En association avec ces défensines ou seule, la cathélicidine LL-37

produite par les neutrophiles montre également une activité antivirale envers le virus *Influenza* (Tripathi *et al.* 2013).

En addition des molécules antivirales qu'ils produisent, les neutrophiles peuvent attirer et activer différents leucocytes comme nous avons pu le voir dans les parties précédentes. Ainsi, ils officient en tant que support pour les LT $CD8^+$, les menant sur le lieu de l'infection grâce à CXCL12 et les activant grâce à leur compétence acquise d'APC (Tate *et al.* 2012).

Les neutrophiles ont également la capacité de réguler l'inflammation grâce à la production de ROS comme NO, d'Arginase I et d'IL-10 dont nous avons revu les capacités anti-inflammatoires. Ceci pourrait par exemple permettre de limiter les effets d'une éventuelle tempête cytokinique en supprimant la réponse des principaux acteurs de l'inflammation.

III.5.2 Les dégâts liés au neutrophile : un excès de zèle ?

En contradiction avec la partie précédente, un certain nombre d'études ont démontré un rôle délétère du neutrophile lors de l'infection au virus *Influenza*. Par exemple, l'équipe de Ronald Germain a montré que la déplétion des neutrophiles avec une faible dose d'anticorps 1A8 lors d'une infection létale à la souche PR8 était bénéfique pour la survie des souris (Brandes *et al.* 2013). L'étude révèle également un circuit inflammatoire auto-alimenté par les neutrophiles, qui participent à leur propre recrutement via la production de CXCL1 par exemple.

En dehors de ce circuit, le neutrophile semble activement participer aux dégâts tissulaires menant à des injures fortes au niveau des poumons (pneumonie, SDRA) via la production de différents médiateurs. Ainsi, le rôle des protéases à sérine sur l'intégrité de l'épithélium est bien connu, celles-ci inactivant la protéine de surfactant D (SP-D) et causant des dommages irréversibles aux jonctions entre cellules épithéliales (Boxio *et al.* 2016; Hirche *et al.* 2004).

Des protéines bénéfiques dans la lutte contre le virus montrent également un côté sombre, comme les défensines qui interagissent avec SP-D (Hartshorn *et al.* 2006) ou les ROS qui induisent des dégâts tissulaires directs ou indirectement via l'inflammation qu'ils induisent (Snelgrove *et al.* 2006).

Il est intéressant de noter que le virus peut directement induire l'influx de neutrophiles dans les poumons, augmentant fortement l'inflammation chez l'hôte. Ainsi, les travaux de

Vidy *et al.* montrent le rôle de PB1-F2 dans le recrutement des neutrophiles chez la souris infectée à IAV. Ce recrutement induit notamment l'activation de NF-κB, menant à une surinflammation et à une mortalité accrue des souris en comparaison de souris déplétées en neutrophiles ou de souris infectées par un virus n'exprimant pas PB1-F2 (Vidy *et al.* 2016).

Enfin, le virus *Influenza* induit la production de NETs par les neutrophiles, et bien que ces motifs n'aient pas démontré d'action antivirale (Hemmers *et al.* 2011), leur action délétère envers le tissu est bien documentée (Porto *et al.* 2016; Narasaraju *et al.* 2011).

Le virus *Influenza* semble donc capable d'influencer le développement de la réponse immunitaire, non seulement en provoquant une réaction antivirale classique mais également en agissant directement ou indirectement sur les cellules immunitaires. L'immunopathologie qui en résulte reste encore à ce jour la plus grande menace présentée par le virus, et ses mécanismes nécessitent une meilleure compréhension pour espérer la prévenir.

Contexte et objectifs de l'étude

La grippe épidémique est encore aujourd'hui un problème de santé majeur en France et dans le monde, provoquant des milliers de morts chaque année. De plus, l'émergence de souches de virus réassortis fait planer la menace de nouvelles pandémies qui peuvent être désastreuses. La forte variabilité du virus complique la recherche de vaccin efficace d'une année à l'autre et les traitements antiviraux nécessitent d'agir rapidement après l'infection, ce qui est généralement trop tard lorsque les patients sont hospitalisés.

La caractéristique principale de l'infection au virus *Influenza* est l'immunopathologie qu'il induit, à savoir une inflammation non contrôlée liée à des dégâts tissulaires au niveau local voire généralisé. Dans ce cas, cibler les cellules immunorégulatrices dans une visée thérapeutique ou diagnostique peut donc se révéler très intéressant. Si des travaux existent sur les populations de LT régulateurs (Sell *et al.* 2019), ils montrent aussi que la déplétion de ces populations ne diminue pas le taux de survie de souris infectées. Cela suggère que d'autres populations contribuent à la régulation de l'inflammation.

L'ensemble des données sur les neutrophiles et leur comportement au cours de différentes pathologies semble indiquer une adaptabilité exceptionnelle de ces cellules. Cette capacité peut être influencée par le virus *Influenza*, via les mécanismes inflammatoires qu'il déclenche et ses propres capacités de modulation de la réponse immunitaire. Le rôle paradoxal du neutrophile dans l'infection à *Influenza* pose donc une question simple amenant une réponse inconnue et complexe : y a-t-il plusieurs populations de neutrophiles qui officient en réponse à l'infection grippale ?

Le premier objectif de notre projet a donc été d'étudier la réponse immunitaire liée aux neutrophiles lors de l'infection par le virus *Influenza* et d'identifier l'existence d'éventuelles sous-populations de neutrophiles régulateurs.

Par la suite, nous ne connaissions pas les mécanismes liés à l'origine des sous-populations de neutrophiles lors de l'infection grippale. Si les neutrophiles sont capables d'être polarisés vers un profil régulateur dans l'environnement tumoral, il n'existait pas de données dans des contextes infectieux.

Notre deuxième objectif visait à mieux comprendre l'origine des populations de neutrophiles régulateurs pendant une infection par le virus *Influenza*.

Notre travail sur la sous-population de neutrophiles régulateurs, induite par l'infection grippale, a révélé qu'elle était présente également à l'homéostasie. Ceci est d'une grande originalité car les sous-populations de neutrophiles sont généralement induites par un stimulus et ne sont pas présentes chez des individus naïfs.

Notre troisième objectif a donc été de mieux cerner la population de neutrophiles régulateurs à l'homéostasie en étudiant leur répartition dans l'organisme et d'observer l'influence de l'environnement.

Résultats

Article : L'infection par le virus *Influenza* A programme la différenciation de neutrophiles vers des fonctions régulatrices via un mécanisme dépendant de l'IFN-γ.

Introduction à l'article

Les polynucléaires neutrophiles sont des cellules effectrices clés durant l'infection, souvent considérés comme des cellules mono-tâches spécialisées dans l'élimination des pathogènes via différents mécanismes.

Toutefois, de plus en plus de recherches semblent repositionner le neutrophile comme une cellule pouvant réguler les réponses immunitaires dans de nombreux contextes (cancer, auto-immunité, infection). A titre d'exemple, le neutrophile peut présenter un profil pro- ou anti-inflammatoire au cours de l'infection grippale au niveau de la muqueuse respiratoire. Ainsi, le neutrophile a été proposé comme jouant en effet soit bénéfique, soit délétère selon les études. Bien que la différence des modèles utilisés puisse expliquer en partie ces résultats, nous émettons l'hypothèse qu'un tel phénotype pourrait être également dû à l'existence de différentes sous-populations fonctionnelles ou à une reprogrammation fonctionnelle de ces cellules liée à l'infection virale.

Nous avons établi un modèle d'infection grippale avec une dose faiblement létale du virus A/Scotland/20/74 (H3N2) afin d'étudier le comportement des neutrophiles. En réalisant un phénotypage avec différents marqueurs, nous avons pu discriminer une population de neutrophile exprimant le marqueur Ly6A (Stem cells antigen-1, Sca-1). Nous avons mis en évidence que cette population présentait un profil phénotypique et fonctionnel immunorégulateur comparativement à la population Sca-1^-. Nous avons notamment étudié, en réalisant des tris cellulaires, les capacités régulatrices de cette population via des co-cultures avec des LT; et sa capacité à produire des médiateurs anti-inflammatoires.

En parallèle, nous avons démontré que l'utilisation d'IFN-γ induisait le phénotype Sca-1^+ chez les neutrophiles dans un modèle de différenciation ex vivo de neutrophiles à partir de progéniteurs issus de moelle osseuse. Le rôle de l'IFN-γ a également été étudié *in vivo* grâce à des souris *Ifng*$^{-/-}$ et IFNGR$^{-/-}$. Ces travaux ont permis également d'établir que l'IFN-γ induisait

le phénotype régulateur dans la moelle, en association avec d'autres facteurs pour l'instant inconnus.

Enfin, nous avons mis en évidence que les neutrophiles exprimant le phénotype régulateur étaient également présents à l'homéostasie et que leur répartition était inégale selon les organes, peuplant préférentiellement les organes non lymphoïdes.

Nos travaux révèlent l'existence d'une population de neutrophiles régulateurs existant à l'homéostasie qui est induite par la grippe via un mécanisme dépendant de l'IFN-γ. Notre projet ouvre donc des perspectives intéressantes dans la compréhension du rôle paradoxal des neutrophiles dans certaines réponses immunitaires. Ce travail pourrait également conduire, à terme, à l'identification d'une population régulatrice chez l'Homme à visée thérapeutique ou diagnostique.

Influenza A virus infection programs neutrophils for regulatory functions in an IFN-γ-dependent manner

Florent Creusat[1,2], Youenn Jouan[1,2,3], Loïc Gonzalez[1,2], Chloé Boisseau[1,2], Qiaochu Lin[4], Valentin Sencio[5], Daphnée Soulard[5], François Trottein[5], Thierry Mallevaey[4,6], Mustapha Si-Tahar[1,2], Thomas Baranek[1,2], Christelle Faveeuw[5], and Christophe Paget[1,2,*]

[1]INSERM, Centre d'Etude des Pathologies Respiratoires (CEPR), UMR 1100, Tours, France.
[2]Université de Tours, Faculté de Médecine de Tours, France.
[3]Service de Médecine Intensive et Réanimation, Centre Hospitalier Régional Universitaire, Tours, France.
[4]Department of Immunology, University of Toronto, Toronto, Ontario M5S 1A8, Canada.
[5]Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, Inserm U1019, CNRS UMR 8204, University of Lille, CHU Lille- Institut Pasteur de Lille, 59000 Lille, France.
[6]Institute of Biomaterials & Biomedical Engineering, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada.

*Correspondence: christophe.paget@inserm.fr.

Running title: IFN-γ programs regulatory functions of neutrophils

Keywords: neutrophil, influenza A virus, immunoregulation, Sca-1, lung, IFN-γ, bone marrow.

Number of words: 4339

Abbreviations: BM, bone marrow; dpi, days post-infection; IAV, influenza A virus; IFN, interferon; IFNγR, interferon-γ receptor; MHC, major histocompatibility; NET, neutrophil extracellular trap; ROS, reactive oxygen species; Sca-1, Stem cell antigen-1; WT, wild-type.

Abstract

Although neutrophils play pivotal role in bacterial and fungal infections, their functions during viral infections are less characterized. However, neutrophils are largely recruited following viral infections suggesting an important contribution in host anti-viral responses. During severe influenza A virus (IAV) infection, neutrophils have been mostly associated with detrimental functions by mediating tissue damages that can culminate in acute respiratory failure. Recent evidence have highlighted an underestimated functional heterogeneity - including regulatory subsets - in the neutrophil compartment under pathophysiological conditions such as cancer. The existence and relevance of functional neutrophil subsets in the context of acute infection is far less understood. Here, we describe in IAV-infected mice, a subset of mature neutrophils endowed with regulatory/suppressive functions distinguishable by its expression of the stem cell antigen-1 (also known as Ly6A). Sca-1^{+} neutrophils acquire their "regulatory" effector program within the bone marrow, prior to their migration to inflammatory sites. Thus, we suggest a new immunological concept in which systemic inflammation during viral infection can shape the developmental program of neutrophils to dictate their effector functions.

Introduction

Influenza A virus (IAV) is a major cause of respiratory infections leading to up to 500,000 annual deaths worldwide(C. E. Troeger *et al.* 2018). IAV infection is characterized by a robust inflammatory response in the lung that first enables virus containment but can also culminate in extensive tissue damages, lung failure and ultimately death(de Jong *et al.* 2006; Tavares *et al.* 2017). IAV infection triggers complex and multifaceted host responses involving discrete immune cell population that exert protective or deleterious functions according to the severity of infection and the kinetics of the ongoing IAV infection. This can be partly explained by the existence of discrete subsets endowed with specific effector functions. For instance, cells from the monocyte/macrophage lineage have been shown to play opposite functions during mucosal inflammation(Askenase *et al.* 2015; Zigmond *et al.* 2012; Tamoutounour *et al.* 2013; Bain *et al.* 2013) ranging from pathogen killing to immune modulation. Such a functional diversity in neutrophils during infection at barrier sites has been so far overlooked. However, emerging evidences indicate that neutrophils can acquire effector regulatory functions during cancer(Lecot *et al.* 2019), an effect likely due to the local environment(Coffelt *et al.* 2016).

The presence of neutrophils has been mainly associated with severe cases of influenza in clinic and experimental models(Brandes *et al.* 2013; Hornick *et al.* 2018b; Vidy *et al.* 2016). Using various pathogenic strains of IAV, neutrophil depletion resulted in reduced viral replication, tissue damages and mortality(Brandes *et al.* 2013; Vidy *et al.* 2016). In line, using transcriptional and biological assays, a study elegantly identified neutrophils and neutrophil-recruiting factors as the major predictive factors associated with mortality during IAV infection(Brandes *et al.* 2013). This deleterious effect depends on the release of neutrophilic factors such as reactive oxygen species (ROS) and neutrophil extracellular traps (NETs)(Yipp *et al.* 2013; Pillai *et al.* 2016; Narasaraju *et al.* 2011). Conversely, neutrophils were associated with a protective phenotype during mild IAV infection(Tate *et al.* 2011, 2012). Mechanistically, neutrophils were shown to control the magnitude of the IAV-specific $CD8^+$ T cell response, viral titers and pulmonary inflammation(Tate *et al.* 2012). These conflicting results are likely dependent on the virulence potential of the different IAV strains used and the intensity of the host immune response. Thus, the versatility of neutrophil functions during IAV infection may be driven by environmental signals received and/or pre-existing discrete functional subsets.

The large influx of neutrophils in the lung parenchyma and airways following IAV infection has been shown to rely on both the recruitment of circulating neutrophils and on neutrophil egress from the bone marrow (BM), a process referred to as “emergency granulopoeisis”(Manz *et al.* 2014). This “on-demand” mechanism relies on enhanced proliferation of myeloid

precursors triggered by systemic soluble factors (*e.g.* cytokines and/or growth factors) and/or pathogen-associated molecular patterns(Manz *et al.* 2014). However, whether these factors can influence neutrophil functions in the context of IAV infection to exert relevant biological activities remain so far unknown.

Here, using a model of IAV-induced severe pneumonia, we revealed the existence of neutrophils endowed with regulatory functions. These neutrophils are characterized by the expression of the stem cell antigen-1 (Sca-1). The emergence of this regulatory phenotype appears to be imprinted in the BM prior to their migration to the inflammatory site. Importantly, Sca-1^{+} regulatory neutrophils can be readily detected in steady-state conditions especially in non-lymphoid tissues, a phenomenon that may rely on a tight interplay with the microbiota. Thus, our study reveals that viral infection reprograms neutrophils in the BM to acquire regulatory effector function to control excessive tissue damages.

Results

Elevated proportion of lung Sca-1$^+$ neutrophils during the course of IAV infection

Following intranasal instillation of a highly pathogenic strain of IAV (A/Scotland/20/74, H3N2), we assessed the temporal dynamics of lung neutrophils during the course of infection. An increased proportion of neutrophils was observed as early as 2 days post-infection (dpi) in the airways to peak at 4 dpi (**Fig. 1a**), whereas the relative abundance of neutrophils in the lung interstitium remained largely unchanged throughout the infection (**Fig. 1a**). However, the absolute number of neutrophils was increased in both compartment around day 4 to peak at day 8 (**Fig. 1b**), a critical time point that corresponds to the peak of the inflammatory response and switch towards the resolution phase. Interestingly, a fraction of lung neutrophils expressed the hematopoietic stem cell marker Sca-1 (Ly6A) (**Fig. 1c and Fig. S1**), a marker recently associated to monocytes endowed with potent regulatory functions[4]. Sca-1$^+$ neutrophils transiently accumulated in both the airway and lung tissue over the course of IAV infection, starting around 4 dpi (**Fig. 1d**). Both Sca-1$^-$ and Sca-1$^+$ neutrophils from IAV-infected mice presented a typical morphology of *bona fide* mature neutrophils with limited number of immature forms (**Fig. 1e**). Thus, these data suggest that IAV infection influences lung neutrophil phenotype.

Lung Sca-1$^+$ neutrophils display regulatory features

This unexpected observation prompted us to investigate the putative differential functions of these two phenotypic subsets. Since Sca-1 is expressed by Ly6C^{hi} monocytes with regulatory functions during protozoan and bacterial infections(Askenase *et al.* 2015), we assessed whether Sca-1$^+$ neutrophils from IAV-infected mice had similar functional properties. First, we found that lung Sca-1$^+$ neutrophils from IAV-infected mice co-expressed higher levels of CD49d, MHC II and PD-L1, which are associated with regulatory functions, compared to their Sca-1$^-$ counterparts (**Fig. 2a**). More importantly, a large fraction of these Sca-1$^+$ neutrophils produced IL-10 (**Fig. 2b**) and expressed high levels of arginase-1 (**Fig. 2c**) compared to their Sca-1- counterparts. Conversely, Sca-1$^+$ neutrophils displayed reduced capacity to secrete classical neutrophilic pro-inflammatory mediators such as IL-1β (**Fig. 2d**), myeloperoxidase (**Fig. 2e**)

and free radicals (**Fig. 2f**). Together, IAV infection leads to the emergence of a subset of neutrophils with potential regulatory functions in the lung tissue.

Homeostasis of Sca-1$^+$ neutrophils is tissue-specific but is minimally influenced by sex or age

Since Sca-1$^+$ neutrophils are yet present in the lung of naive mice (**Fig. 1a,b**), we assessed the representation of this peculiar subset in various tissues at steady-state. In addition to the lungs, Sca-1$^+$ neutrophils were found in the liver, small intestine and colon of naïve mice, while they were relatively scarce in lymphoid tissues such as the spleen and BM (**Fig. 3a**). Importantly, Sca-1$^+$ neutrophils preferentially co-expressed PD-L1 and MHC II in these tissues (**Fig. S2**). Comparison of male vs female mice indicated that the presence of Sca-1$^+$ neutrophils was not gender-specific (**Fig. 3b**). Age did not significantly influenced the proportion of Sca-1$^+$ neutrophils between juvenile and adult mice although a small increase could be observed in 20-week-old mice (**Fig. 3c**). In addition, lung Sca-1$^+$ neutrophils could be detected in BALB/c mice albeit in lower proportion (**Fig. 3d**). Altogether, Sca-1$^+$ neutrophils mainly populate non-lymphoid tissues under steady-state.

Regulatory functions of neutrophils are pre-determined in the bone marrow

Severe IAV infection results in systemic inflammation(de Jong *et al.* 2006) that can lead to a characteristic "on-demand" haematopoietic response program referred to as "emergency granulopoiesis"(Manz *et al.* 2014). Thus, we investigated the phenotype of BM neutrophils during IAV infection. While we did not observe significant modulation of total neutrophil frequency during IAV infection (**Fig. 4a**), absolute number of BM neutrophils dropped after 4 dpi suggesting their egress towards the periphery (**Fig. 4a**). In contrast, the absolute number of BM Sca-1$^+$ neutrophils increased as soon as 2 dpi indicating an IAV infection-dependent mechanism that favours this subset (**Fig. 4b**).

Interestingly, the relative proportion, but not the count of circulating neutrophils increased in infected mice (**Fig. 4c**). However, the relative proportion and count of Sca-1$^+$ neutrophils were increased in the blood of infected mice (**Fig. 4d**). In addition, we observed expression of the nuclear marker Ki67 in a large fraction of lung neutrophils from IAV-infected mice (**Fig. 4e**), a phenotype associated to recent BM emigrants. More importantly, the frequency of Ki67$^+$ cells was significantly increased within Sca-1$^+$ neutrophils (**Fig. 4f**). Overall, IAV infection alters differentiation/development of neutrophils in BM to favour the generation of Sca-1$^+$ neutrophils endowed with putative regulatory functions.

IFN-γ programs neutrophil progenitors for regulatory functions

To assess whether IAV infection could intrinsically alter the functional differentiation of neutrophils, BM haematopoietic stem cells from mock- or IAV-infected mice were cultured in a medium containing neutrophil-differentiating factors (**Fig. 5a**). Under these conditions, 20 % of the differentiated neutrophils from naive mice expressed Sca-1 (**Fig. 5b**). Importantly, this proportion was unchanged using precursors from IAV-infected mice (**Fig. 5b**) suggesting an extrinsic mechanism. Of note, we were unable to detect IAV transcripts in BM of infected mice (**Fig. S3a**). Therefore, we hypothesized for that a pro-inflammatory cytokines may drive the differentiation of Sca-1$^+$ neutrophils during IAV infection. Since IFN-γ has been shown to trigger regulatory functions on multiple immune cells(Askenase *et al.* 2015; Gallina *et al.* 2006), we evaluated the role of IFN-γ in the generation of Sca-1$^+$ neutrophils. Of note, *Ifng* transcripts were enriched in BM of IAV-infected mice (**Fig. S3b**). Compared to control mice, IAV-infected *Ifng*$^{-/-}$ mice displayed a striking decrease in BM Sca-1$^+$ neutrophils as well as in the blood and lungs (**Fig. 5c**). To validate a selective role for IFN-γ in the BM, mice received by i.p. route an anti-IFN-γ mAb during IAV infection. Upon this strategy, the neutralizing mAb could reach the lungs but was undetectable in the BM (**Fig. S3c**). In line with our hypothesis, this treatment did not recapitulated the data obtained with *Ifng*$^{-/-}$ mice (**Fig. 5d**).

To directly evaluate whether IFN-γ promoted the generation of Sca-1$^+$ regulatory neutrophils, we performed an *ex vivo* neutrophil differentiation assay in the presence of recombinant IFN-γ. It is worth mentioning that BM Sca-1$^+$ neutrophils expressed a higher level of IFN-γR1 (CD119) compared to their Sca-1$^-$ counterparts (**Fig. 5e**). Strikingly, differentiation in presence of recombinant IFN-γ culminated in a strong bias towards a Sca-1$^+$ profile (85 %) (**Fig. 5f**) with co-expression of PD-L1 and MHC II (**Fig. 5g**), an effect that was fully reverted using *Ifngr*$^{-/-}$ BM precursors (**Fig. S3d**). Importantly, incubation of mature lung Sca-1$^-$ neutrophils with recombinant IFN-γ failed to induce Sca-1, PD-L1 or MHC II expression (**Fig. S3e** and not shown), which does not support a local conversion of Sca-1$^-$ to Sca-1$^+$ neutrophils. Altogether, this findings show that IAV-induced IFN-γ promotes the generation of Sca-1$^+$ neutrophils in the BM as of the emergency hematopoietic response.

Presence of Sca-1$^+$ neutrophils correlates with protection during IAV infection

Using various strains, neutrophils have been largely described as deleterious cells in experimental models of IAV(Brandes *et al.* 2013; Hornick *et al.* 2018a; Vidy *et al.* 2016). In agreement with this, neutrophil depletion during the entire course of infection led to an almost

complete protection (**Fig. 6a**) associated with limited weight loss (**Fig. 6b**). In order to decipher the role of Sca-1$^+$ neutrophils during IAV infection, we depleted neutrophils starting at 4 dpi, which corresponded to the peak of Sca-1$^+$ neutrophil influx (**Fig. 1d**). Surprisingly, under this regimen, neutrophil-depleted mice displayed showed increased mortality (**Fig. 6c**) and failed to regain weight (**Fig. 6d**). In line with a default in the resolution of inflammation, increased number of inflammatory mononuclear cells (CD11b$^+$ Ly6G$^-$ Ly6C^{high}) were detected upon neutrophil depletion (**Fig. 6e**) while conventional dendritic cells (CD11c$^+$ MHC II$^+$ CD64$^-$) and interstitial macrophages (CD11b^{dim} Siglec F$^-$ F4/80$^+$) were largely unaffected (**Fig. S4**). This was paralleled by a strong decrease in alveolar macrophages (**Fig. 6f**), a population that may contribute in tissue repair and return to homeostasis during IAV infection(Huang *et al.* 2011). Altogether, these data show that temporally-controlled neutrophil depletion during IAV - at the peak Sca-1$^+$ neutrophil accumulation - resulted in higher susceptibility and increased local inflammation.

Discussion

It is generally accepted that innate cells acquire their effector functions during their development/differentiation in the BM. However, a large body of evidence indicate that the microenvironment can fine-tune their functions under both homeostatic and pathophysiological contexts. Here, we propose a new paradigm in which a distant viral infection can rapidly influence neutrophils to acquire regulatory functions during their development in the BM. Specifically, IFN-γ can prime neutrophil precursors to generate a subset of mature Sca-1^+ neutrophils endowed with putative regulatory functions (PD-L1, MHC II, IL-10, arginase-1) prior to their recruitment into the inflamed tissue. This pathway might represent a relevant negative feedback loop to control pathogen-induced immunopathologies and associated tissue damages. In agreement with our findings, a recent study demonstrated the pivotal role of IFN-γ in shaping monocyte precursors for regulatory functions during gastrointestinal infection(Askenase *et al.* 2015). Reminiscent to our observation, these regulatory monocytes are characterized by a strong expression of Sca-1(Askenase *et al.* 2015). Thus, we can speculate that IFN-γ may act as a universal mediator in myeloid cell functional education during infection at barrier sites. In line, we recently demonstrated an increase in Sca-1^+ monocytes in blood and BM of IAV-infected mice(Beshara *et al.* 2018).

While the emergence of neutrophils with regulatory functions likely results in beneficial outcomes for the host by lessening immunopathologies in our model, the mechanisms that drive this IAV-dependent IFN-γ response in the BM have not been explored in our study. The identification of the factors involved in this process may provide novel ways to modulate pathogen-induced tissue damage during inflammation. First, it would be important to assess whether IFN-γ is produced locally or not. Although our data indicate an increase in *Ifng* transcripts in the BM of IAV-infected mice, IFN-γ might be provided by the blood circulation given the high levels of this cytokine in sera of IAV-infected mice(Beshara *et al.* 2018). Recently, BM-resident Natural Killer (NK) cells have emerged as pivotal cells in shaping effector functions during haematopoiesis through IL-12-dependent IFN-γ release(Askenase *et al.* 2015). Thus, NK cells could play similar functions in our model. Among other candidates are innate T cells such as Natural Killer T cells and γδT cells, which are known IFN-γ producers that can populate BM(Godfrey *et al.* 2018). Another possibility is an origin for IFN-γ from the adaptive compartment.

While Sca-1 expression on neutrophils appears as a robust marker to identify regulatory neutrophils, it remained to be determined its functions in neutrophil biology. As a glycosyl phosphatidylinositol-anchored cell surface protein(Yutoku *et al.* 1974), the functions of Sca-1 were believed to regulate cell signalling. However, the precise functions of Sca-1 remain largely unknown. For instance, haematopoiesis in *Sca-1*$^{-/-}$ mice only demonstrated minor lineage skewing(C. Y. Ito *et al.* 2003). Some evidence point towards a role for Sca-1 in controlling the magnitude and duration of T cell proliferation as well as their cytotoxic properties(Stanford *et al.* 1997). It is worth mentioning that Sca-1 expression is highly regulated by type I and II IFNs(DeLong *et al.* 2018).

Our data point towards a certain degree of phenotypic diversity in the Sca-1^{+} neutrophil population. This may suggest additional functional heterogeneity in this subset. Thus, the use of next-generation single cell RNA-sequencing will be of interest to address this question. Of note, a recent study revealed the transcriptome profile of neutrophils during differentiation(Evrard *et al.* 2018). Consistent with our data, *Ly6a* (encoding for Sca-1) transcripts appeared to be repressed during neutrophil maturation(Evrard *et al.* 2018). In addition, the use of this approach at a single-cell level on BM neutrophils will provide some clues about the origin and trajectories that dictate the emergence of this sublineage under both physiological and pathological conditions.

Interestingly, we identified sizeable populations of Sca-1^{+} neutrophils in non-lymphoid tissues at steady-state, such as the lungs, liver and gut. According to their anticipated functions, Sca-1^{+} neutrophils may play pivotal role to maintain immune tolerance and/or tissue remodelling in these sites. The presence of Sca-1^{+} neutrophils in naïve mice in absence of IFN-γ signalling suggest the involvement of other factor(s) in the acquisition of the regulatory program. It is important to mention that *in vitro* differentiation favours the Sca-1^{+} profile compared to the natural setting. Thus, a soluble factor used – or produced - in our assay may be important in this mechanism. Among the candidates, G-CSF has been previously associated to the biology of neutrophils with suppressive activities in various models of cancer(Kowanetz *et al.* 2010; Coffelt *et al.* 2015). However, it remains unclear why only a fraction of neutrophils is able to acquire a regulatory profile during neutrophil differentiation reinforcing the hypothesis of various lineages.

The preferential distribution of Sca-1^{+} neutrophils at barrier sites may also suggest a close interplay with commensals. Depletion of microbiota has been shown to decrease the number of circulating and BM neutrophils(Deshmukh *et al.* 2014). Pointing towards a role for microbiota in controlling homeostasis of regulatory neutrophils, dysbiotic patients displayed alteration in

neutrophil functions resulting in higher inflammatory profile such as NET formation(Dicker *et al.* 2018). Given their regulatory functions, we can speculate that the relationship between Sca-1^+ neutrophils and the microbiota may go both ways. Thus, regulatory neutrophils might control the quantity and the diversity of the commensals.

Further works into the mechanisms leading to neutrophil licencing for regulatory functions in the BM will undoubtedly offer new insights into how signals can be coordinated and integrated, in various tissues, to control the inflammatory balance at distant sites. Moreover, this may pave the way to new and original therapeutic opportunities in neutrophil-driven pathologies such as metabolic disorders, inflammatory bowel diseases or cancer progression.

Methods

Mice

Inbred C57BL/6J mice were purchased from Janvier (Le Genest-St-Isle, France). C57BL/6J *Ifng*$^{-/-}$ and C57BL/6J *Ifngr*$^{-/-}$ mice were bred and maintained in-house either at the Pasteur Institute of Lille and/or at the University of Tours under specific pathogen-free conditions and were sex and age (8-10 wk) matched. All animal work was conformed to the French governmental and committee guidelines for the care and use of animals for scientific purposes; and was approved by the national ethic committee under approval numbers 2015121722376405 and 201611151159949.

Reagents and Abs

Monoclonal antibodies against mouse CD11b (clone M1/70), CD119 (200), CD45 (30-f11), CD49d (R1-2), IL-10 (JES5-16E3), Arginase I (A1exF5), MHC II (NIMR-4), Ly6G (1A8), F4/80 (BM8), Siglec F (E50-2440), Sca-1 (D7), Ly6C (HK1.4), Ki67 (11F6) and appropriated isotype controls were purchased from Ozyme/Biolegend (Saint-Cyr-L'Ecole, France), BD Pharmingen (Le Pont de Claix, France) and Thermo Fisher Scientific/eBioscience (Paris, France). PBS57 glycolipid-loaded and control CD1d tetramers were obtained from the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Tetramer Facility (Emory University, Atlanta, GA). Mouse ELISA kits were from R&D systems (Lille, France) and eBioscience. Lineage Cell Depletion Kit was from Miltenyi-Biotec (Paris, France). Stem Cell Factor (SCF), IL-3 and Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF) were purchased from Miltenyi-Biotec.

IAV infection

The H3N2 IAV strain (A/Scotland/20/74) has been described elsewhere(Paget, Ivanov, Fontaine, Blanc, Pichavant, Renneson, Bialecki, Pothlichet, Vendeville, Barba-Speath, Huerre, Faveeuw, Si-Tahar, and Trottein 2011). Mice were anesthetized and administered intranasally

with 40 µl of PBS containing 150 plate-forming units. Weight and survival were monitored every second day following infection.

Tissue harvest and preparation of cell suspensions

Lung cells were prepared as previously described(Maya Hassane *et al.* 2019). Briefly, lungs were perfused with 10 ml of saline injected into the right ventricle of the heart. Lungs were harvested and minced using a gentleMACS dissociator (Miltenyi Biotec) in a medium containing 125 µg/ml of Liberase (Roche; Meylan, France) and 100 µg/ml of DNase type I (Roche). After washes, lung homogenates were resuspended in PBS and filtered on a 100 µm cell strainer (Dutscher). Pellets were recovered in PBS 2% FCS and erythrocytes were removed using a red blood cell lysis buffer (Sigma-Aldrich; Saint-Quentin-Fallavier, France) before being filtered on a 40 µm cell strainer (Dutscher). Bronchoalveolar lavages (BAL) were performed after tracheal catheterisation by injecting four times 0,5 ml of cold PBS for a total of 2 ml. BAL was then centrifuged at 400g for 5 min and pellets were recovered in PBS 2% FCS. Erythrocytes were removed using a red blood cell lysis buffer (Sigma-Aldrich). Small intestines and colons were excised, washed and the Peyer's patches removed. Tissues were sectioned and incubated in PBS with 5 mM EDTA, 1 mM DTT, 1% FBS and penicillin/streptomycin for removal of IELs. For LPL isolation, stripped tissues were digested twice in RPMI with 2 mg/mL collagenase D (Roche) and 20 µg/mL DNase I (Sigma) and then mashed through a cell strainer. BM was collected as previously described(Paget *et al.* 2007). Femurs and tibias were cut at their extremities and 5 mL of cold RPMI was injected to harvest bone marrow, which was mechanically disrupted on a 100 µm cell strainer (Dutscher). After centrifugation (400g for 5 min), erythrocytes were removed before being filtered on a 40 µm cell strainer.

Blood was collected in microtubes filled with 30 µL of Heparin from the retro-orbital sinus while mice were anesthetized. Erythrocytes were removed upon several washes in a red blood cell lysis buffer.

In vitro neutrophil differentiation.

Progenitors from the BM were enriched using the Lineage Cell Depletion Kit (Miltenyi). The negative fraction was then seeded into a 6-well plate at 1 x 10^5 cell/ml in complete medium. Cells were cultured for 7 days in presence of 50 ng/mL of SCF, 50 ng/ml of IL-3 and 50 ng/ml of G-CSF as previously described(Swamydas *et al.* 2015). In some cases, mouse recombinant IFN-γ (0.5 ng/ml) was added into the culture.

In vivo IFN-γ neutralization

Mice were injected i.p with 200 µg of anti-IFN-γ antibody (clone XMG1.2, Bio X Cell (West Lebanon, NH, USA)) diluted in PBS (Peterson KE, 2000) on day 2 and 4 post-infection. Their weight was monitored every 2 days and mice were euthanized at day 6 post-infection. A rat IgG1 isotype control antibody (clone HRNP; Bio X cell) was used as a control.

Cytospins

FACS-sorted neutrophil subsets (4 x 10^4 cells) were cytospun using an EZ Single Cytofunel (ThermoScientific) and a Shandon Cytospin at 400 rpm for 5 min. Cytospins were next coloured using a fast-acting variation of May-Grünwald Giemsa staining (RAL 555, RAL diagnostics) and observed under an optical microscope.

Flow cytometry

Cells were stained with appropriate dilutions of antibodies (30 min, 4°C) in PBS 2 % FCS. Then, cells were washed, and, in some cases, fixed using Intracellular Fixation Buffer (Thermo Fisher Scientific/eBioscience). Intranuclear staining were performed using the True-Nuclear transcription factor buffer set (BioLegend) according to the manufacturer's information. Dead cells were excluded using the LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Staining kit (Thermofisher Scientific). Cells were acquired on either a LSR Fortessa cytometer (BD Biosciences) or a MACS Quant (Miltenyi Biotec). Analyses were performed using the VenturiOne software (Applied Cytometry; Sheffield, UK).

Cell sorting and in vitro/ex vivo assays.

Lungs were harvested from naıve or IAV-infected mice and cell suspensions were prepared as previously described. To purify neutrophil subsets, lung mononuclear cells were labeled with FITC-conjugated anti-Ly6G mAb, PerCp-Cy5.5-conjugated anti-CD11b mAb and APC-conjugated anti-Sca-1 mAb. After cell surface labeling, cells were sorted using a FACSMelody (BD Biosciences) or a MoFlo Astrios (Beckman-Coulter). This protocol yielded > 98 % cell purity as evaluated by FACS. For *in vitro* stimulation assays, 5 x 10^4 neutrophils were either cultured for 4 h in complete RPMI 5% FCS in absence of any additional stimulation. In some cases, neutrophils were pulsed for a short period with PMA (5 min) or ATP (30 min). Then, supernatants were harvested for further analyses and/or cells were subjected to FACS analysis.

Analysis of virus load and Ifng in BM by quantitative RT-PCR

Total RNAs from whole lungs or BM of naive or IAV-infected mice were extracted, cDNAs were synthesized and quantitative RT-PCR was carried out. Gene expression was analyzed by the incorporation of the fluorescent dye SYBR Premix Ex Taq (Takara Bio Inc.) in the double-stranded DNA by using 1% of cDNA as starting material on a LightCycler 480 (Roche Diagnostics GmbH). Quantitative PCR was carried out using 0.5 mM specific primers for IAV M2 gene (5'-AAGACCAATCCTGTCACCTCTGA-3' and 5'-CAAAGCGTCTACGCTGCAGTCC-3') that complement 20 temporally and spatially divergent influenza A matrix protein gene sequences, as previously described(Paget, Ivanov, Fontaine, Blanc, Pichavant, Renneson, Bialecki, Pothlichet, Vendeville, Barba-Speath, Huerre, Faveeuw, Si-Tahar, and Trottein 2011), and specific primers for mouse *Hprt* (5'-CAGGCCAGACTTTGTTGGAT-3' and 5'-TTGCGCTCATCTTAGGCTTT-3') with melting temperature (Tm) of 60°C and 58°C, , respectively, and QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. IAV and hprt copies for each experimental sample were quantified in duplicate using the standard curves obtained by PCR amplification on serial dilutions of purified PCR products. Viral load is expressed as viral RNA normalized to hprt expression level. Primers specific for *Gapdh* (5′-TCAGATCCACGACGGACACA-3′ and 5′-TGCCCAGAACATCATCCCTG-3′) and *Ifng* (5′-GTGGGTTGTTGACCTCAAACTAGGC-3′ and 5′-GTCTGAATAACTATTTTAACTCAAG-3′) were designed by the Primer Express Program (Applied Biosystems) and used for amplification in triplicate assays. For graphical representation, data were normalized against expression of the *Gapdh* gene and are expressed as a fold-increase over the mean gene expression level in mock-infected mice.

Free radicals production assay

Free radicals (RNS/ROS) production by neutrophils was assessed by flow cytometry using dihydro-rhodamine123 (DHR123). Lung homogenates were incubated with or without 100 nM PMA and with 1 µM DHR123 for 5 min at 37°C before FACS analysis.

Neutrophil depletion

Neutrophil-depleting anti-Ly6G monoclonal antibodies were purified in-house (using protein G columns) from supernatants of the NIMP-R14 hybridoma. Neutrophils were depleted 24 h prior and/or during IAV infection using NIMP-R14 (100 µg per mouse i.p. in 200 µl PBS). A rat IgG2b isotype control antibody (clone LTF2; Bio X cell) was used as a control.

Statistical analysis

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

Acknowledgements

This work was funded with support by French Higher Education and Research ministry under the program “Investissements d’avenir”: LabEx MAbImprove (ANR-10-LABX-53-01). F.C. was the recipient of a doctoral fellowship from the Ministère de l’Education Nationale de la Recherche et Technique. Y.J., C.F., M.S. and C.P. are supported by Inserm. F.T. is supported by CNRS. T.B., L.G. and C.B. are supported by the University of Tours. D.S. is supported by the Pasteur Institute of Lille. Y.J. was the recipient of the “Antoine RABBAT” doctoral fellowship from the “Fonds de Recherche en Santé Respiratoire” under the support of the “Fondation du Souffle”. We also thank the Pasteur Institute of Lille and University of Tours animal facilities for excellent mouse husbanding. Yves Le Vern (INRA, Nouzilly, France) and Roxane Lemoine (BCR, Université de Tours, France) are acknowledged for excellent assistance with cell sorting.

Competing financial interests

The authors declare no competing financial interests.

Author contributions: C.P. designed the study, analyzed the data, and wrote the manuscript with input from all other authors. F.T., T.M., M.S., T.B. and C.F discussed the data and edited the manuscript. F.C., Y.J., D.S., C.B., L.G., V.C., Q.L., C.F, T.B. and C.P. performed the experiments and analyzed the data. Important mice, reagents, experimental and data analysis techniques were provided by F.T., T.M. and C.F.

References

1. Troeger, C. E. *et al.* Mortality, morbidity, and hospitalisations due to influenza lower respiratory tract infections, 2017: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Respir. Med.* **7**, 69–89 (2018).
2. de Jong, M. D. *et al.* Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. *Nat. Med.* **12**, 1203–1207 (2006).
3. Tavares, L. P., Teixeira, M. M. & Garcia, C. C. The inflammatory response triggered by Influenza virus: a two edged sword. *Inflamm. Res.* **66**, 283–302 (2017).
4. Askenase, M. H. *et al.* Bone-Marrow-Resident NK Cells Prime Monocytes for Regulatory Function during Infection. *Immunity* **42**, 1130–1142 (2015).
5. Zigmond, E. *et al.* Ly6C hi Monocytes in the Inflamed Colon Give Rise to Proinflammatory Effector Cells and Migratory Antigen-Presenting Cells. *Immunity* **37**, 1076–1090 (2012).
6. Tamoutounour, S. *et al.* Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin. *Immunity* **39**, 925–938 (2013).
7. Bain, C. C. *et al.* Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6C hi monocyte precursors. *Mucosal Immunol.* **6**, 498–510 (2013).
8. Lecot, P. *et al.* Neutrophil Heterogeneity in Cancer: From Biology to Therapies. *Front. Immunol.* **10**, 1–19 (2019).
9. Coffelt, S. B., Wellenstein, M. D. & De Visser, K. E. Neutrophils in cancer: Neutral no more. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 431–446 (2016).
10. Brandes, M. *et al.* A systems analysis identifies a feedforward inflammatory circuit leading to lethal influenza infection. *Cell* **154**, 197–212 (2013).
11. Hornick, E. E. *et al.* Nlrp12 Mediates Adverse Neutrophil Recruitment during Influenza Virus Infection. *J. Immunol.* **200**, 1188–1197 (2018).
12. Vidy, A. *et al.* The Influenza virus protein PB1-F2 Increases viral pathogenesis through neutrophil recruitment and NK cells inhibition. *PLoS One* **11**, 1–19 (2016).
13. Yipp, B. G. & Kubes, P. NETosis: how vital is it? *Blood* **122**, 2784–2794 (2013).
14. Pillai, P. S. *et al.* Mx1 reveals innate pathways to antiviral resistance and lethal influenza disease. *Science (80-.).* **352**, 463–466 (2016).
15. Narasaraju, T. *et al.* Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps contribute to acute lung injury of influenza pneumonitis. *Am. J. Pathol.* **179**, 199–210 (2011).

16. Tate, M. D. *et al.* The role of neutrophils during mild and severe influenza virus infections of mice. *PLoS One* **6**, 2–11 (2011).
17. Tate, M. D., Brooks, A. G., Reading, P. C. & Mintern, J. D. Neutrophils sustain effective CD8+ T-cell responses in the respiratory tract following influenza infection. *Immunol. Cell Biol.* **90**, 197–205 (2012).
18. Manz, M. G. & Boettcher, S. Emergency granulopoiesis. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 302–314 (2014).
19. Gallina, G. *et al.* Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8+ T cells. *J. Clin. Invest.* **116**, 2777–2790 (2006).
20. Hornick, E. E. *et al.* Nlrp12 Mediates Adverse Neutrophil Recruitment during Influenza Virus Infection. *J. Immunol.* **200**, 1188–1197 (2018).
21. Huang, F. F. *et al.* GM-CSF in the Lung Protects against Lethal Influenza Infection. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **184**, 259–268 (2011).
22. Beshara, R. *et al.* Alteration of Flt3-Ligand-dependent de novo generation of conventional dendritic cells during influenza infection contributes to respiratory bacterial superinfection. *PLoS Pathog.* **14**, 1–28 (2018).
23. Godfrey, D. I., Le Nours, J., Andrews, D. M., Uldrich, A. P. & Rossjohn, J. Unconventional T Cell Targets for Cancer Immunotherapy. *Immunity* **48**, 453–473 (2018).
24. Yutoku, M., Grossberg, A. L. & Pressman, D. A cell surface antigenic determinant present on mouse plasmacytes and only about half of mouse thymocytes. *J. Immunol.* **112**, 1774–81 (1974).
25. Ito, C. Y., Li, C. Y. J., Bernstein, A., Dick, J. E. & Stanford, W. L. Hematopoietic stem cell and progenitor defects in Sca-1/Ly-6A-null mice. *Blood* **101**, 517–523 (2003).
26. Stanford, W. L. *et al.* Altered proliferative response by T lymphocytes of Ly-6A (Sca-1) null mice. *J. Exp. Med.* **186**, 705–717 (1997).
27. DeLong, J. H. *et al.* Cytokine- and TCR-Mediated Regulation of T Cell Expression of Ly6C and Sca-1. *J. Immunol.* ji1701154 (2018). doi:10.4049/jimmunol.1701154
28. Evrard, M. *et al.* Developmental Analysis of Bone Marrow Neutrophils Reveals Populations Specialized in Expansion, Trafficking, and Effector Functions. *Immunity* **48**, 364-379.e8 (2018).
29. Kowanetz, M. *et al.* Granulocyte-colony stimulating factor promotes lung metastasis through mobilization of Ly6G+Ly6C+ granulocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 21248–21255 (2010).

30. Coffelt, S. B. *et al.* IL-17-producing γδ T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. *Nature* **522**, 345–348 (2015).
31. Deshmukh, H. S. *et al.* The microbiota regulates neutrophil homeostasis and host resistance to Escherichia coli K1 sepsis in neonatal mice. *Nat. Med.* **20**, 524–530 (2014).
32. Dicker, A. J. *et al.* Neutrophil extracellular traps are associated with disease severity and microbiota diversity in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* **141**, 117–127 (2018).
33. Paget, C. *et al.* Potential Role of Invariant NKT Cells in the Control of Pulmonary Inflammation and CD8 + T Cell Response during Acute Influenza A Virus H3N2 Pneumonia. *J. Immunol.* **186**, 5590–5602 (2011).
34. Hassane, M. *et al.* Interleukin-7 protects against bacterial respiratory infection by promoting IL-17A-producing innate T-cell response. *Mucosal Immunol.* (2019). doi:10.1038/s41385-019-0212-y
35. Paget, C. *et al.* Activation of Invariant NKT Cells by Toll-like Receptor 9-Stimulated Dendritic Cells Requires Type I Interferon and Charged Glycosphingolipids. *Immunity* **27**, 597–609 (2007).
36. Swamydas, M., Luo, Y., Dorf, M. E. & Lionakis, M. S. Isolation of mouse neutrophils. *Curr. Protoc. Immunol.* **2015**, 3.20.1-3.20.15 (2015).

Figure legends

Figure 1: Dynamics, phenotype and morphology of neutrophils during IAV infection. **(a-e)**, WT C57BL/6J mice were i.n. infected with IAV (150 pfu) A/H3N2/Scotland/20/74 strain. Mice were euthanized at various time following infection and lung tissues were collected for further analysis. **(a)**, Kinetics of the frequencies of neutrophils (live $CD45^+$, Siglec F^-, $CD11b^+$, $Ly6G^+$) in BAL and lung parenchyma of IAV-infected mice were evaluated by flow cytometry. Means ± SEM of neutrophil frequencies pooled from six independent experiments are shown (18-24 mice/group). **(b)**, Kinetics of the absolute number of neutrophils in BAL and lung parenchyma of IAV-infected mice. Means ± SEM pooled from six independent experiments are shown (18-24 mice/group). **(c)**, Representative dot plot of Sca-1 expression in lung neutrophils from IAV-infected mice (day 4 post-infection). **(d)**, Kinetics of the relative proportion of Sca-1^+ neutrophils (in BAL and lung parenchyma) in the total neutrophil population during IAV infection. Means ± SEM of neutrophil frequencies pooled from six independent experiments are shown (18-24 mice/group). **(e)**, Morphology of Sca-1^- *vs* Sca-1^+ neutrophils isolated from IAV-infected mice. Relative proportion of the morphologic subsets are shown in the *right panel*. Individual values and means ± SEM from two independent experiments are shown (4 mice/group). ns, not significant; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

Figure 2: Phenotypic and functional profile of Sca-1^+ neutrophils. (a-f), WT C57BL/6J mice were i.n. infected with IAV (150 pfu) A/H3N2/Scotland/20/74 strain. Mice were euthanized at day 6 p.i. and the entire lungs were collected for further analysis. **(a)**, Expression of CD49d, MHC-II and PD-L1 on neutrophil subsets. Representative histograms are shown in the upper panel. Individual values and means ± SEM from two independent experiments of the intensity of fluorescence for each markers are shown (9-10 mice/group) in the lower panel. **(b)**, Relative proportion of IL-10-producing neutrophil subsets. Representative dot plots are shown in the upper panel. Individual values and means ± SEM from two independent experiments are shown (10 mice/group). (**c**), Relative proportion of arginase-1-producing neutrophil subsets. Representative dot plots are shown in the left panel. Individual values and means ± SEM from two independent experiments are shown (14 mice/group). **(d)**, Levels of bioactive IL-1β produced *ex vivo* by purified neutrophil subsets. Individual values and means ± SEM from two independent experiments performed in duplicate are shown. (**e**), Levels of MPO produced *ex vivo* by purified neutrophil subsets upon PMA stimulation. Individual values and means ± SEM

673 from two independent experiments are shown (3-4 mice/group). (**f**), Levels of ROS in
674 neutrophil subsets measured 5 min after incubation with DHR123. Representative dot plots
675 from one experiment out of two are shown. ns, not significant; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***,
676 $P < 0.001$.
677
678 **Figure 3: Factors influencing Sca-1$^+$ neutrophil distribution. (a)**, Distribution of Sca-1+
679 neutrophils according to tissue. Individual values and means ± SEM of the relative proportion
680 of Sca-1$^+$ neutrophils (within total neutrophils) from one representative experiment out of three
681 are shown (4 mice/group). **(b)**, Influence of the sex on the proportion of lung Sca-1$^+$ neutrophils.
682 Individual values and means ± SEM of the relative proportion of Sca-1$^+$ neutrophils (within
683 total neutrophils) from one representative experiment out of two are shown (4 mice/group). **(c)**,
684 Age-related dynamics of lung Sca-1$^+$ neutrophil proportion. Means ± SEM from one
685 representative experiment out of two are shown (4 mice/group). **(d)**, Comparison of Sca-1$^+$
686 neutrophil proportion in C57BL/6J and BALB/c mice. Means ± SEM from one representative
687 experiment out of two are shown (5 mice/group). ns, not significant; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.
688
689 **Figure 4: Origin of IAV-induced Sca-1$^+$ neutrophils. (a-f)**, WT C57BL/6J mice were i.n.
690 infected with IAV (150 pfu) A/H3N2/Scotland/20/74 strain. Mice were euthanized at indicated
691 time points. **(a)**, Kinetics of the frequencies and absolute number of neutrophils in BM of IAV-
692 infected mice were evaluated by flow cytometry. Means ± SEM from three independent
693 experiments are shown (8-13 mice/group). **(b)**, Kinetics of the frequencies (as % of total
694 neutrophils) and absolute number of Sca-1$^+$ neutrophils in BM of IAV-infected mice were
695 evaluated by flow cytometry. Means ± SEM from three independent experiments are shown (8-
696 13 mice/group). **(c)**, Kinetics of the frequencies and absolute number of neutrophils in blood of
697 IAV-infected mice were evaluated by flow cytometry. Means ± SEM from three independent
698 experiments are shown (8-13 mice/group). (**d**), Kinetics of the frequencies (as % of total
699 neutrophils) and absolute number of Sca-1$^+$ neutrophils in blood of IAV-infected mice were
700 evaluated by flow cytometry. Means ± SEM from three independent experiments are shown (8-
701 13 mice/group). **(e)**, Frequencies of Ki67$^+$ cells in lung neutrophils at day 6 p.i.. Representative
702 dot plots are shown in the upper panel. Individual values and means ± SEM from two
703 representative experiments out of two are shown (6-8 mice/group). (**f**), Frequencies of Ki67$^+$
704 cells in lung neutrophil subsets at day 6 p.i.. Representative dot plots are shown in the upper
705 panel. Individual values and means ± SEM from two representative experiments out of two are

shown (6-8 mice/group) in the lower panel. ns, not significant; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

Figure 5: IFN-γ primes BM neutrophils for regulatory functions. (a), Protocol of BM-derived neutrophil differentiation. **(b)**, Relative proportion of Sca-1^+ neutrophils on differentiated neutrophils from stem cells isolated from BM of mock-treated or IAV-infected mice. Representative dot plots of Sca-1 expression on differentiated mature neutrophils ($CD11b^+$ $Ly6G^{high}$) at day 7 are shown in the left panel. Means ± SEM of the relative proportion of Sca-1^+ cells within mature neutrophils at indicated time points from three independent experiments are shown in the right panel. (**c)**, Relative proportions of Sca-1^+ cells with the neutrophil population of mock and IAV-treated (6 dpi) mice in WT and *Ifng*$^{-/-}$ mice. Individual values and means ± SEM from two independent experiments are shown (6 mice/group). **(d)**, Relative proportions of Sca-1^+ cells with the neutrophil population of mock and IAV-treated (6 dpi) mice in Ig control- and anti-IFN-γ-treated mice. Individual values and means ± SEM from two independent experiments are shown (4-8 mice/group). **(e)**, Expression of CD119 on BM neutrophil subsets from naïve mice. A representative histogram is shown in the left panel. Individual values and means ± SEM of the relative proportion of $CD119^+$ cells within neutrophil subsets from one representative experiment out of two are shown in the right panel (4 mice/group). **(f)**, Relative proportion of Sca-1^+ neutrophils on differentiated neutrophils from stem cells isolated from naïve mice in presence or absence of recombinant mouse IFN-γ. Means ± SEM of the relative proportion of Sca-1^+ cells within mature neutrophils at indicated time points from two independent experiments are shown. **(g)**, Representative dot plots of PD-L1 and MHC II expression on BM-differentiated Sca-1^+ neutrophils in presence or absence of recombinant mouse IFN-γ. ns, not significant; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

Figure 6: Late neutrophils control inflammatory response during IAV infection. (a-f), WT C57BL/6J mice were i.n. infected with IAV (150 pfu) A/H3N2/Scotland/20/74 strain. (**a**), Protocol for early neutrophil depletion is shown in the upper panel. Survival was monitored daily (12 mice/group) and depicted in the lower panel. (**b**), Mice were treated as in panel a. Weight was measured every second day. (**c**), Protocol for late neutrophil depletion is shown in the upper panel. Survival was monitored daily (11 mice/group) and depicted in the lower panel. (**d**), Mice were treated as in panel c. Weight was measured every second day. (**e-f**) Control or neutrophil-depleted (protocol panel c) mice were euthanized on day 10 and immune cells were analyzed in the whole lungs. (**e**) Representative dot plots of inflammatory mononuclear cells

(CD11b^{+} Ly6C^{+}) gated on CD11b^{+} Siglec F^{-} Ly6G^{-} cells are shown in the upper panel. Individual values and means ± SEM from two independent experiments are shown (5 mice/group). (**f**) Representative dot plots of alveolar macrophages (CD11b$^{+/-}$ Siglec F^{+}) are shown in the upper panel. Individual values and means ± SEM from two independent experiments are shown (5 mice/group). ns, not significant; *, $P < 0.05$.

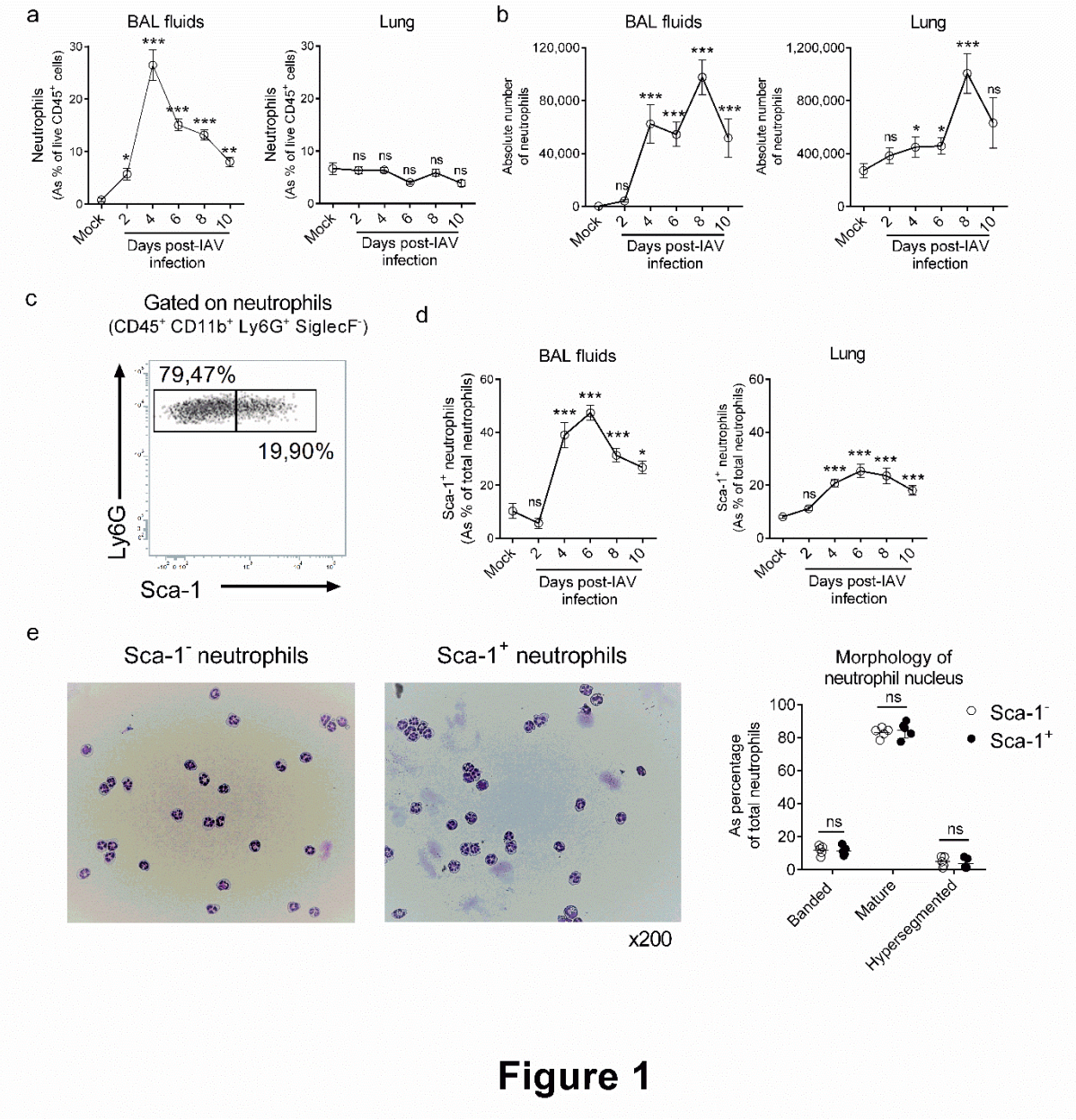

a
BAL fluids
Lung
Neutrophils (As % of live CD45+ cells)
Mock
Days post-IAV infection
b
BAL fluids
Lung
Absolute number of neutrophils
c
Gated on neutrophils
(CD45+ CD11b+ Ly6G+ SiglecF-)
79,47%
19,90%
Ly6G
Sca-1
d
BAL fluids
Lung
Sca-1+ neutrophils (As % of total neutrophils)
e
Sca-1- neutrophils
Sca-1+ neutrophils
x200
Morphology of neutrophil nucleus
As percentage of total neutrophils
Sca-1-
Sca-1+
Banded
Mature
Hypersegmented

Figure 1

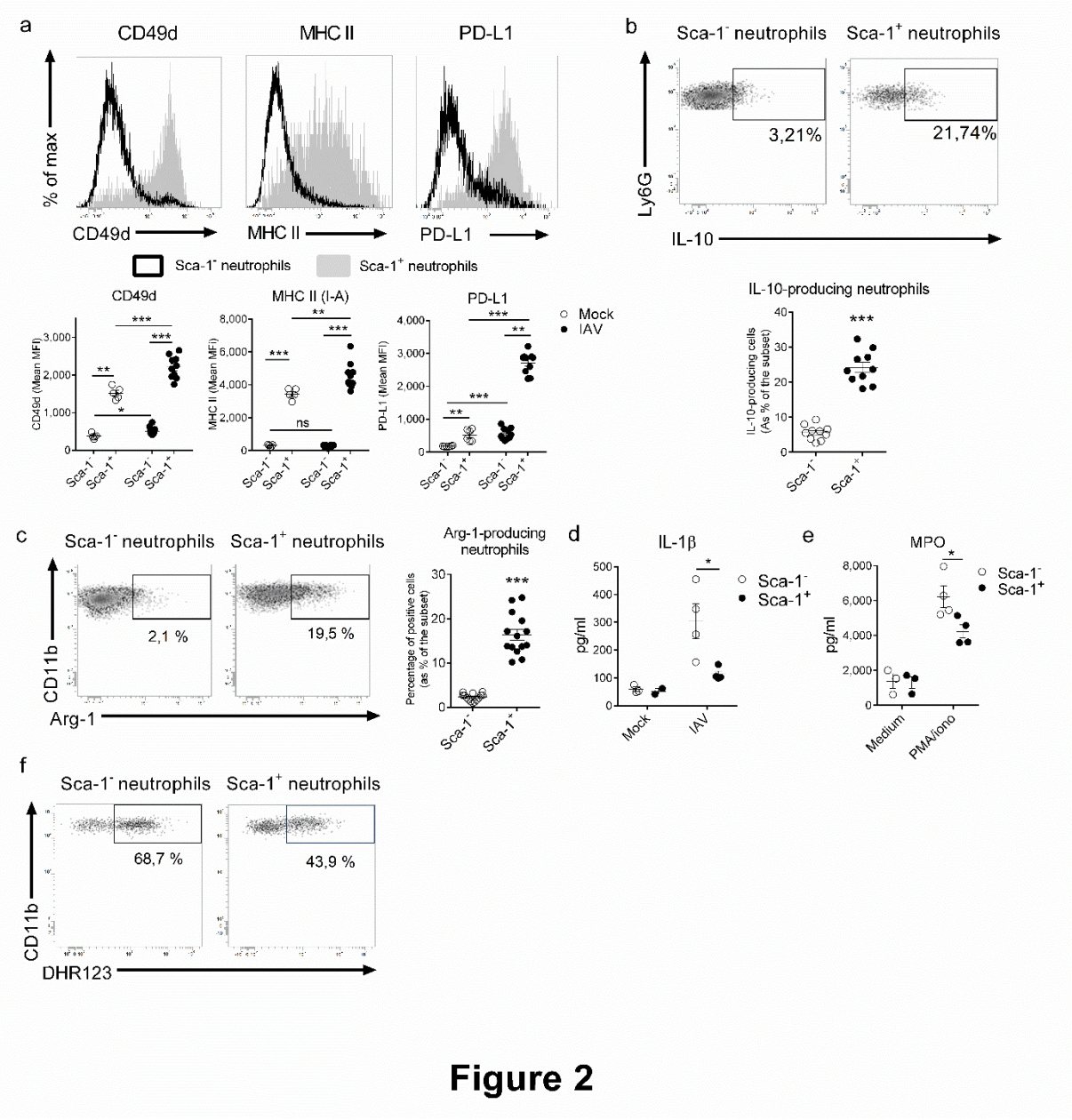

a
CD49d
MHC II
PD-L1
% of max
Sca-1- neutrophils
Sca-1+ neutrophils
CD49d (Mean MFI)
MHC II (Mean MFI)
PD-L1 (Mean MFI)
Mock
IAV
b
Sca-1- neutrophils
Sca-1+ neutrophils
3,21%
21,74%
Ly6G
IL-10
IL-10-producing neutrophils
IL-10-producing cells (As % of the subset)
c
Sca-1- neutrophils
Sca-1+ neutrophils
2,1 %
19,5 %
CD11b
Arg-1
Arg-1-producing neutrophils
Percentage of positive cells (as % of the subset)
d
IL-1β
pg/ml
Mock
IAV
e
MPO
pg/ml
Medium
PMA/iono
f
Sca-1- neutrophils
Sca-1+ neutrophils
68,7 %
43,9 %
CD11b
DHR123

Figure 2

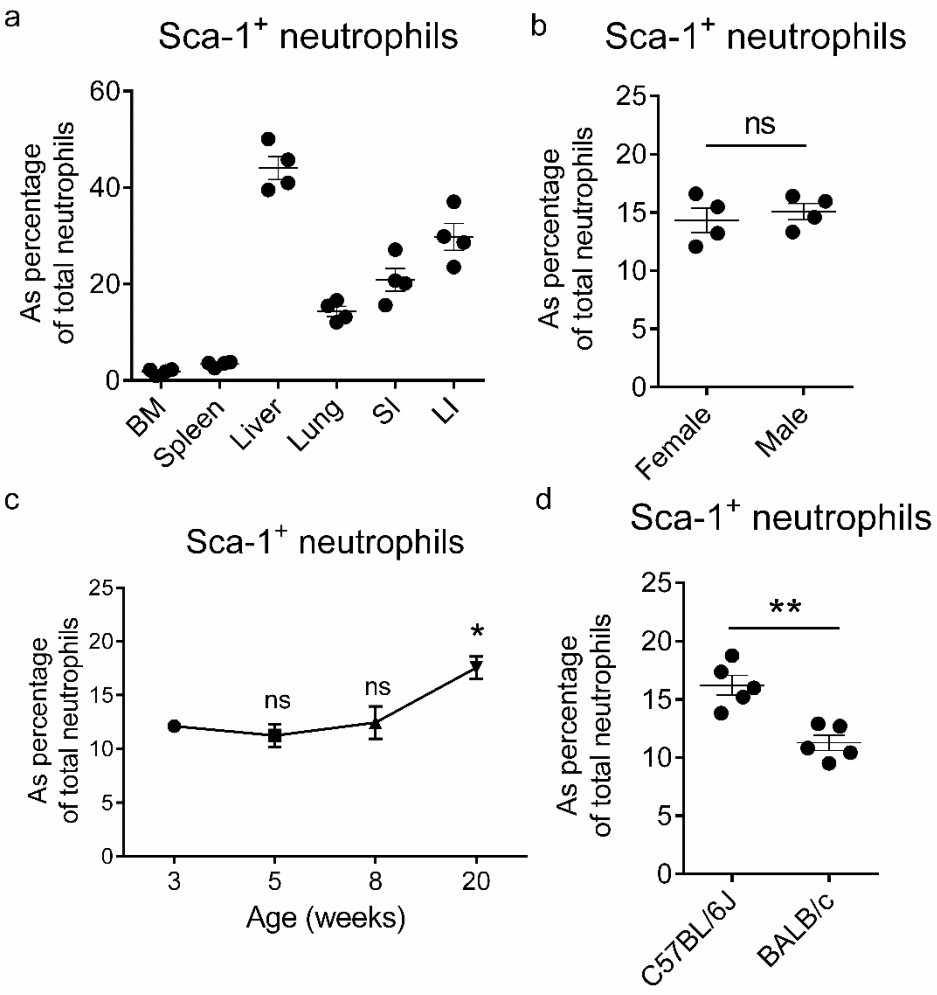

a
Sca-1+ neutrophils
As percentage of total neutrophils
60
40
20
0
BM
Spleen
Liver
Lung
SI
LI
b
Sca-1+ neutrophils
As percentage of total neutrophils
25
20
15
10
5
0
ns
Female
Male
c
Sca-1+ neutrophils
As percentage of total neutrophils
25
20
15
10
5
0
ns
ns
*
3
5
8
20
Age (weeks)
d
Sca-1+ neutrophils
As percentage of total neutrophils
25
20
15
10
5
0
**
C57BL/6J
BALB/c

Figure 3

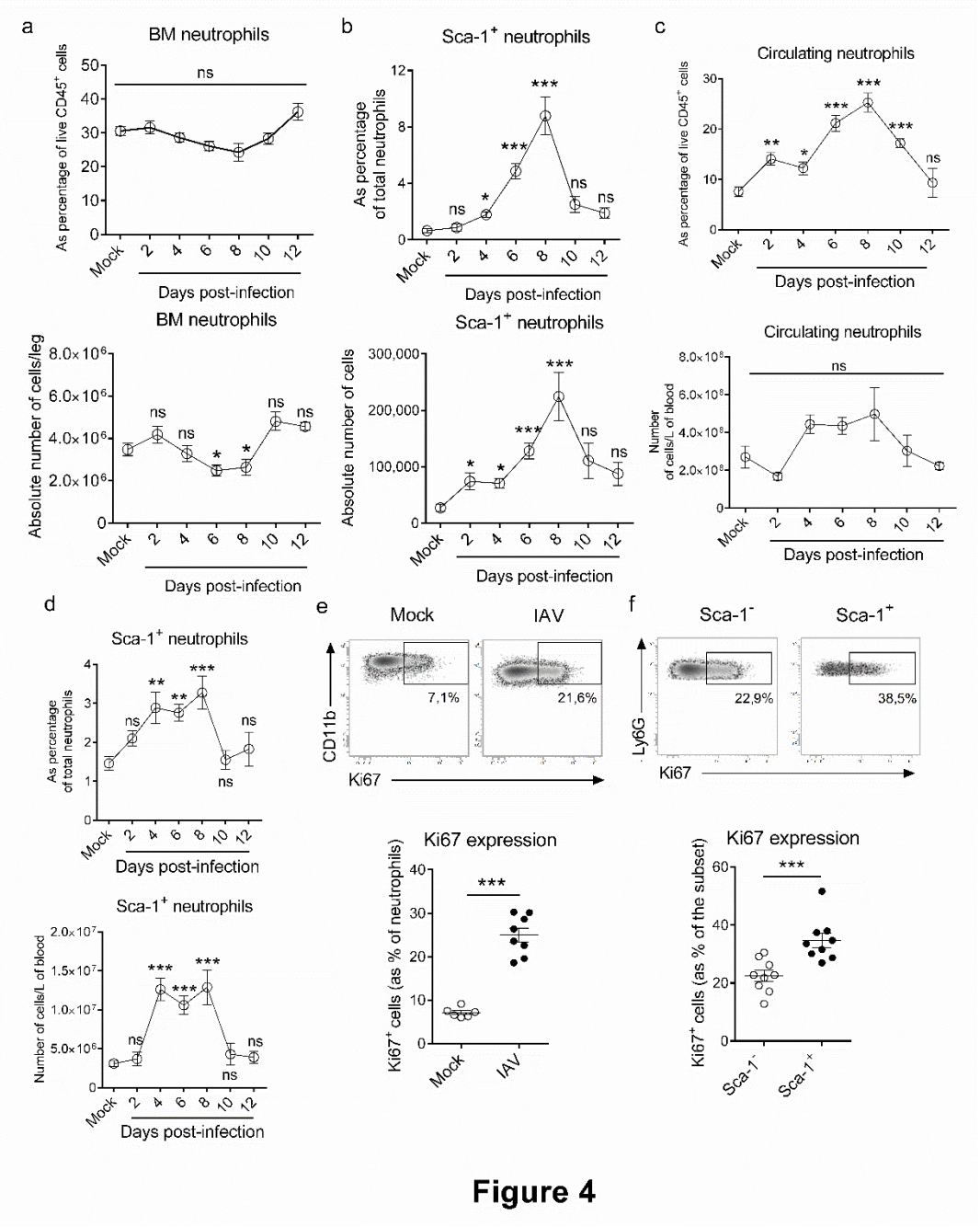

a
BM neutrophils
As percentage of live CD45+ cells
ns
Mock
Days post-infection
b
Sca-1+ neutrophils
As percentage of total neutrophils
c
Circulating neutrophils
BM neutrophils
Absolute number of cells/leg
Sca-1+ neutrophils
Absolute number of cells
Circulating neutrophils
Number of cells/L of blood
d
Sca-1+ neutrophils
e
Mock
IAV
CD11b
Ki67
7,1%
21,6%
f
Sca-1-
Sca-1+
Ly6G
22,9%
38,5%
Ki67 expression
Ki67+ cells (as % of neutrophils)
Ki67+ cells (as % of the subset)

Figure 4

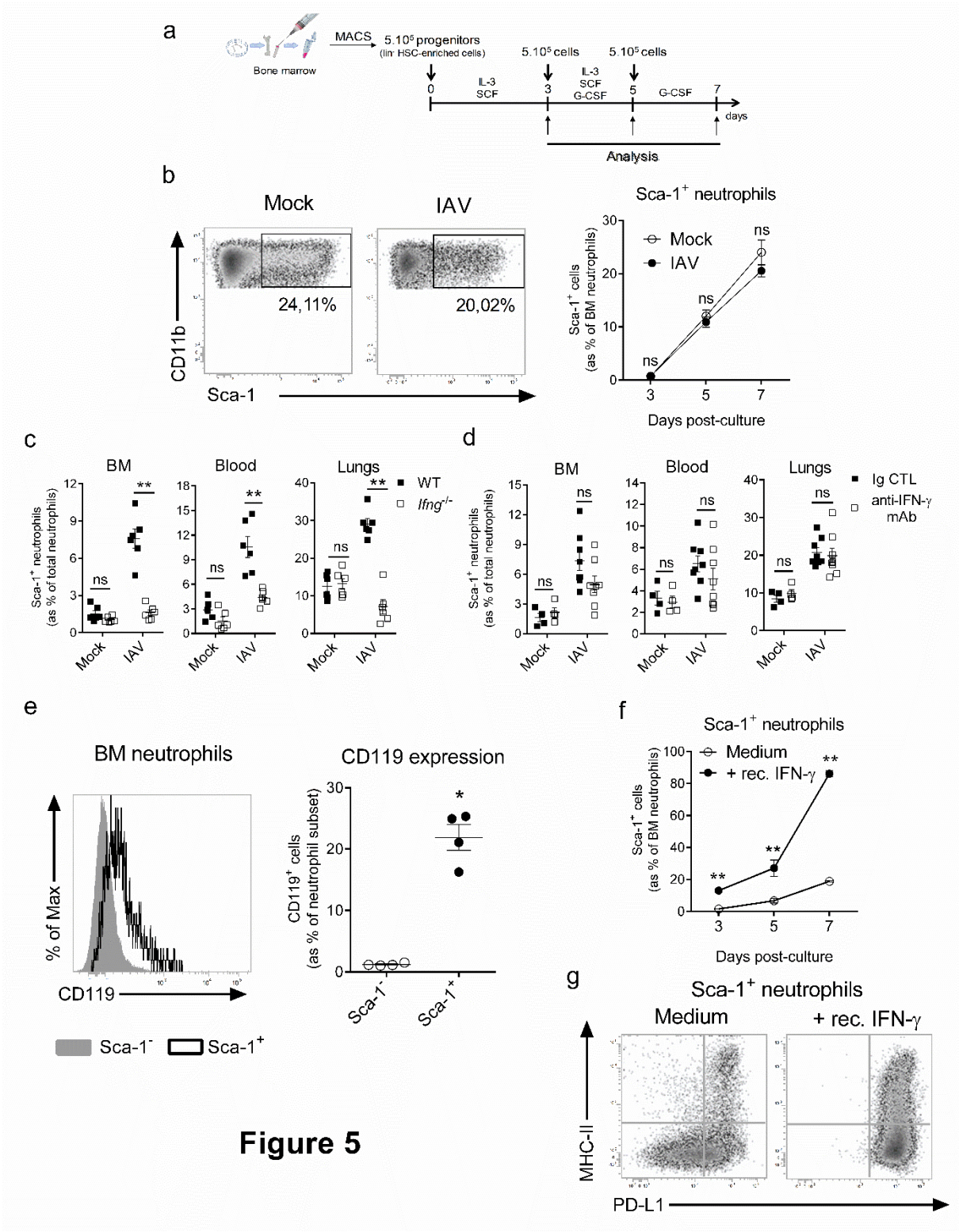
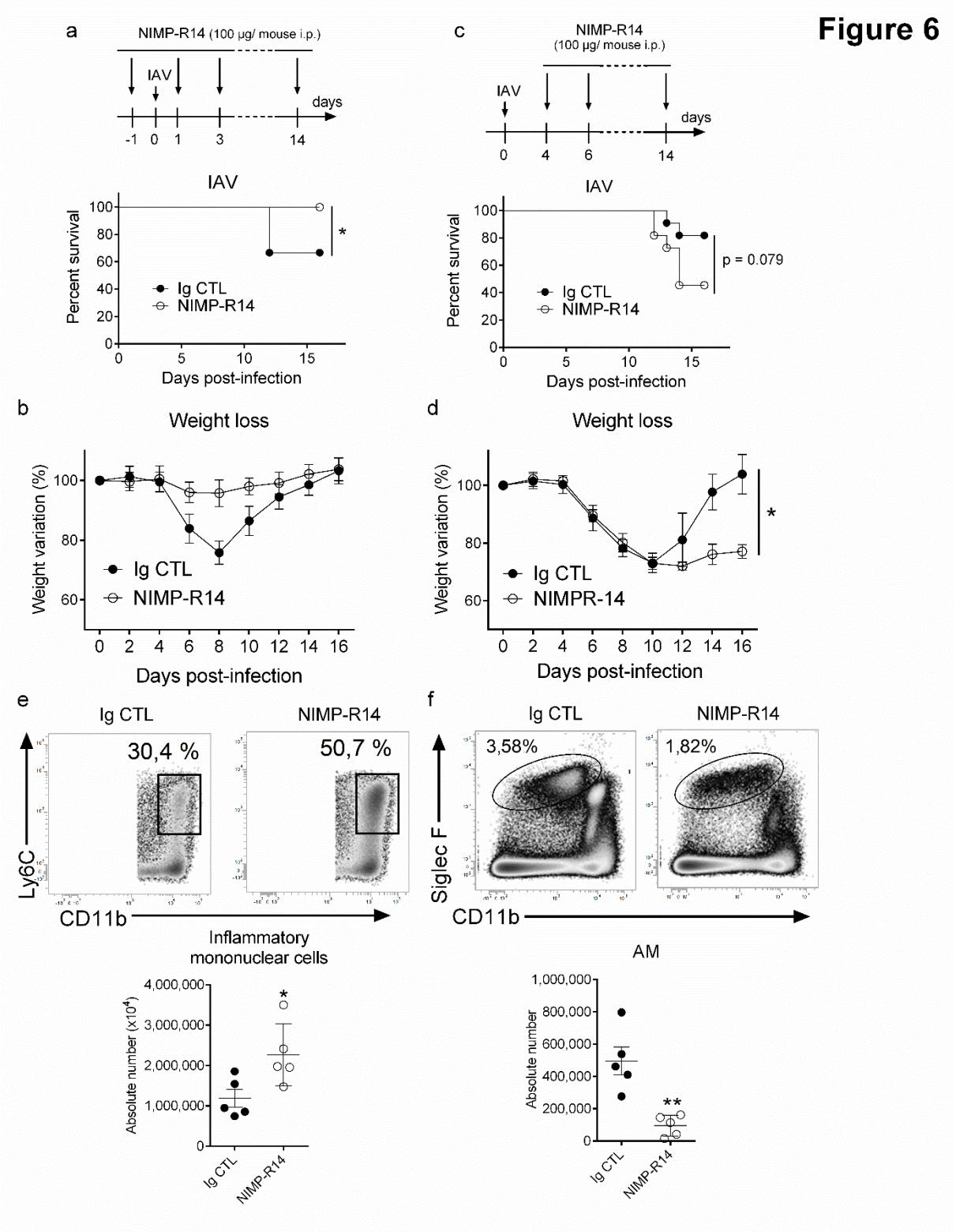

a
Bone marrow
MACS
5.10⁵ progenitors
(lin⁻ HSC-enriched cells)
5.10⁵ cells
5.10⁵ cells
0
IL-3
SCF
3
IL-3
SCF
G-CSF
5
G-CSF
7
days
Analysis
b
Mock
IAV
24,11%
20,02%
CD11b
Sca-1
Sca-1⁺ neutrophils
Mock
IAV
Sca-1⁺ cells
(as % of BM neutrophils)
Days post-culture
c
BM
Blood
Lungs
WT
Ifng⁻/⁻
Sca-1⁺ neutrophils
(as % of total neutrophils)
Mock
IAV
d
BM
Blood
Lungs
Ig CTL
anti-IFN-γ
mAb
e
BM neutrophils
% of Max
CD119
Sca-1⁻
Sca-1⁺
CD119 expression
CD119⁺ cells
(as % of neutrophil subset)
f
Sca-1⁺ neutrophils
Medium
+ rec. IFN-γ
Sca-1⁺ cells
(as % of BM neutrophils)
Days post-culture
g
Sca-1⁺ neutrophils
Medium
+ rec. IFN-γ
MHC-II
PD-L1

Figure 5



Supplementary Figures

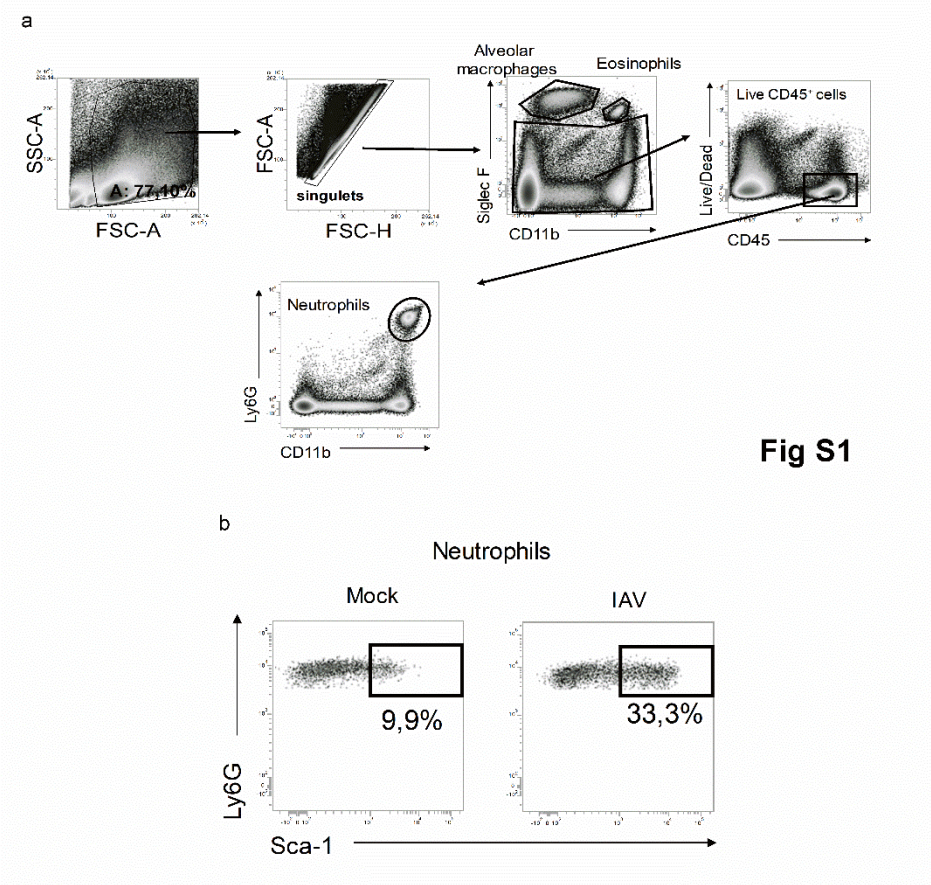


Figure S1: Gating strategy of lung Sca-1$^+$ neutrophils. (a), Gating strategy of lung neutrophils. (**b**), Representative dot plots of Sca-1 expression on lung neutrophils from mock or IAV-infected mice.

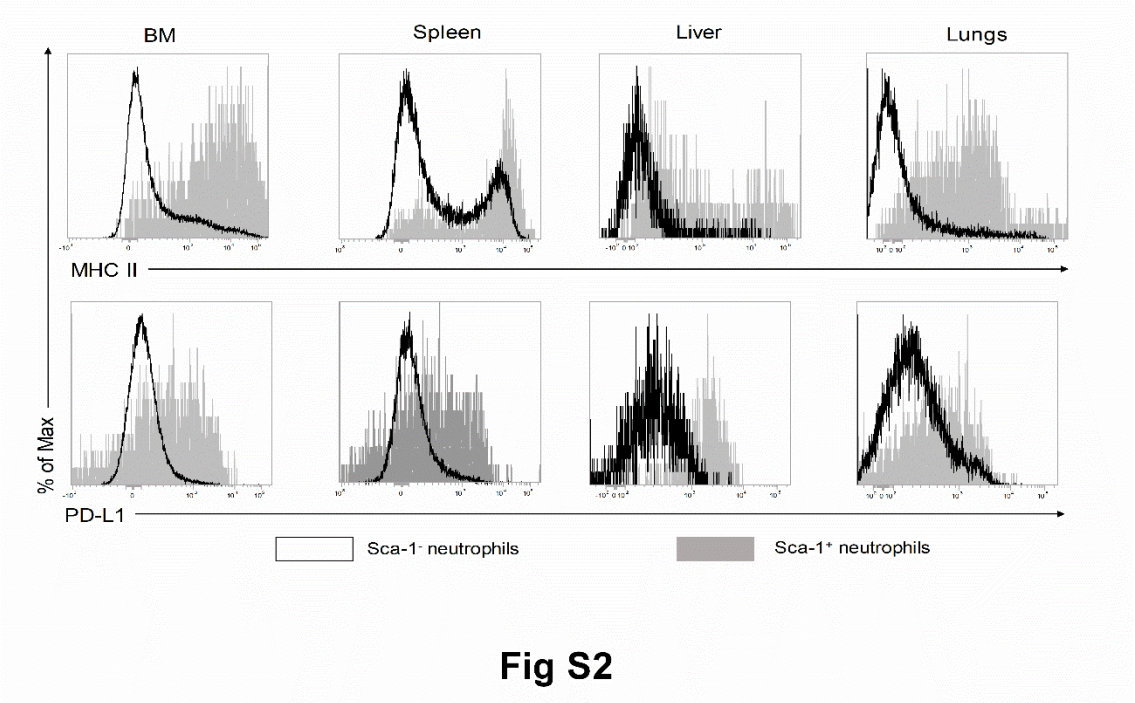


Fig S2

Figure S2: Phenotype of Sca-1$^-$ vs Sca-1$^+$ neutrophils in various tissues. Overlays for MHC II (upper panel) and PD-L1 (lower panel) expressions on Sca-1$^-$ (black line) and Sca-1$^+$ (filled grey) neutrophils from indicated tissues.

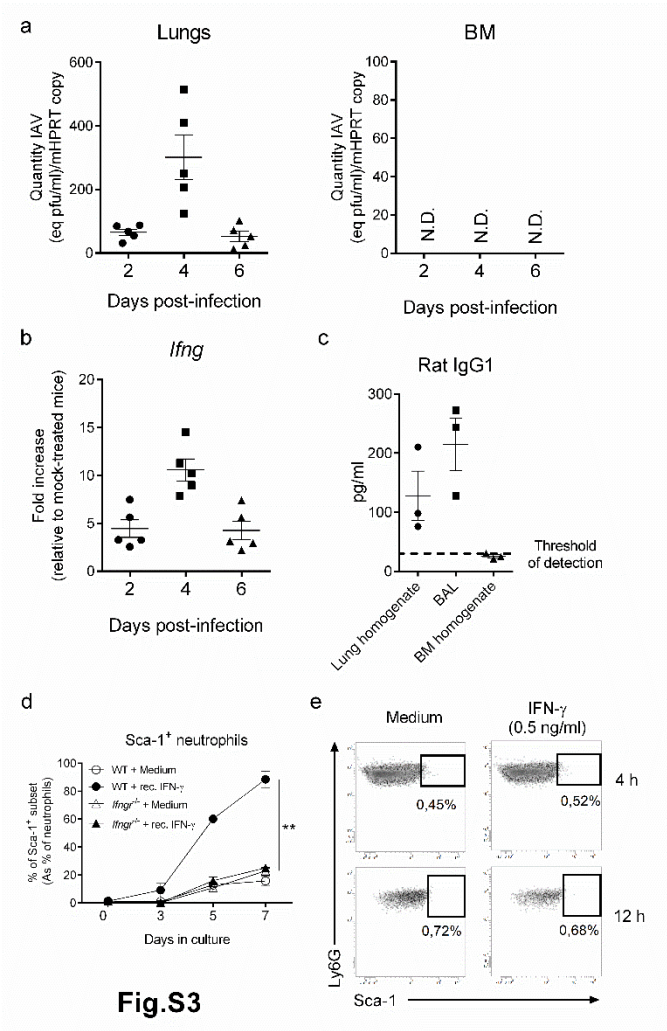


Figure S3: IFN-γ and BM origin of Sca-1$^+$ neutrophils. (**a**), Analysis of the viral load in the lung and BM of IAV-infected mice on the stated days p.i.. IAV M2 mRNA levels were measured by quantitative RT-qPCR. Data are normalized to expression of hprt. Shown are IAV M2/hprt mRNA expression ratios. Data represent the mean ± SEM of four independent experiments performed in triplicate. (**b**), *Ifng* mRNA copy numbers were determined by real-time qPCR. Data are normalized to expression of *Gapdh* and are expressed as fold increase over average gene expression in naive mice. Data represent the mean ± SEM of four independent experiments performed in triplicate. (**c**), Levels of rat IgG1 in lung homogenates, BAL and BM homogenates of anti-IFN-γ mAb-treated mice (12 h post-treatment). (**d**), Relative proportion of Sca-1$^+$ neutrophils on differentiated neutrophils from stem cells isolated from WT or *Ifngr*$^{-/-}$ mice in presence or absence of recombinant IFN-γ. Means ± SEM at indicated time points from two independent experiments are shown in the right panel. (**e**), Analysis of Sca-1 expression on lung mature Sca-1$^-$ neutrophils upon culture with or without recombinant IFN-γ. N.D., not detected; **, $p < 0.01$.

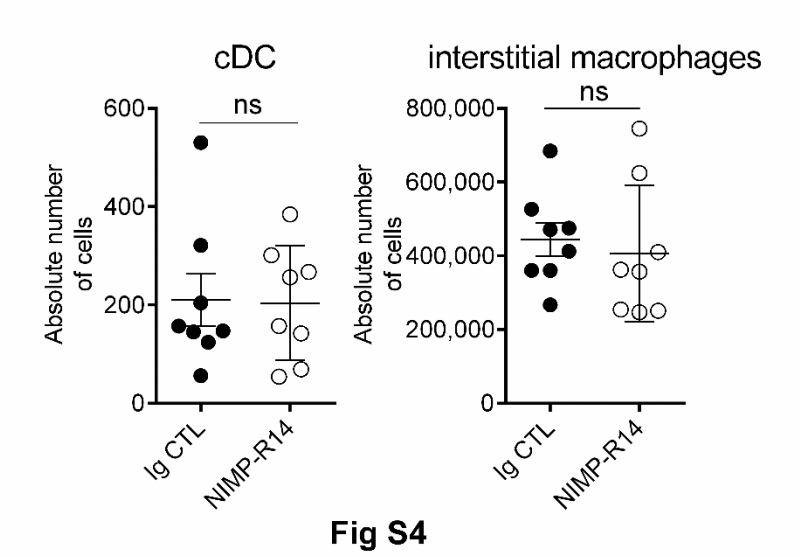


Figure S4: Effect of late neutrophil depletion on immune cells. WT C57BL/6J mice were i.n. infected with IAV (150 pfu) A/H3N2/Scotland/20/74 strain. Control or neutrophil-depleted (protocol panel c) mice were euthanized on day 10 and immune cells were analyzed in the whole lungs. Representative dot plots for conventional DCs ($CD11c^{+}$ $MHCII^{+}$ $CD64^{-}$ Siglec F^{-}) and interstitial macrophages ($CD11b^{dim}$ Siglec F^{-} $F4/80^{+}$).Individual values and means ± SEM from two independent experiments are shown (8 mice/group). ns, not significant.

Discussion et perspectives

Au cours de la dernière décennie, de nombreuses études ont permis de repositionner le neutrophile au cœur des processus de régulation de la réponse immune attirant ainsi l'intérêt des immunologistes pour ces cellules. Cette versatilité fonctionnelle récemment définie a mené de plus en plus de scientifiques à se poser la question de l'hétérogénéité des neutrophiles et de la potentielle implication de ces différentes sous-populations dans l'initiation et la régulation des réponses immunitaires.

Cette nouvelle vision du neutrophile nous a poussés à étudier cette question dans le contexte d'une infection grippale. Ainsi, nos travaux ont permis de mettre en évidence une hétérogénéité fonctionnelle des neutrophiles et de mieux comprendre leur rôle parfois considéré comme paradoxal dans ce modèle (Figure 33). Notre étude soulève également de nombreuses nouvelles interrogations, à la fois sur la biologie fondamentale de ces cellules mais aussi l'intérêt potentiel qu'elles pourraient fournir à la clinique dans le futur.

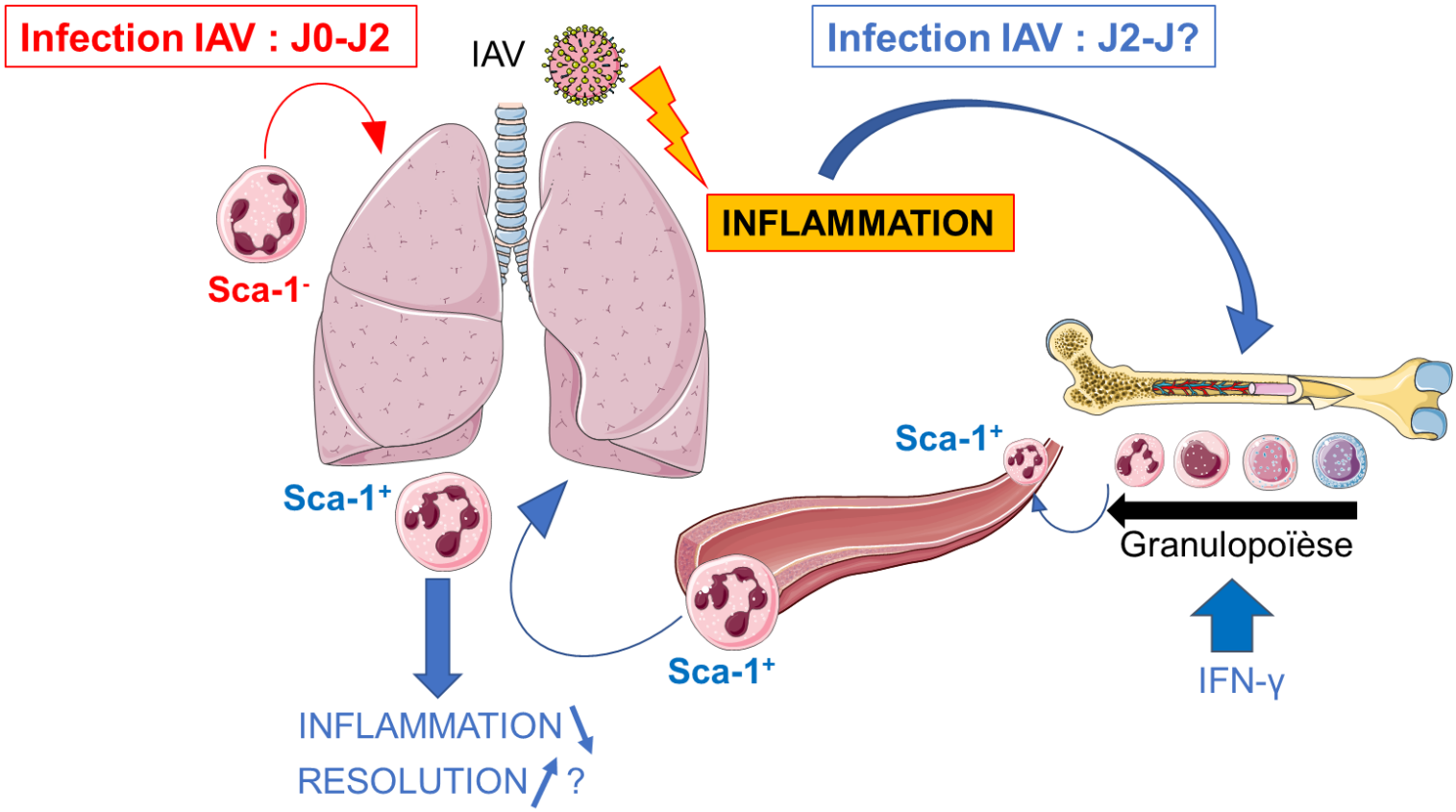


Figure 33 : Schéma récapitulatif de la dynamique des neutrophiles Sca-1⁺ au cours de l'infection au virus Influenza

I Identification d'une sous-population de neutrophiles régulateurs au cours de l'infection à IAV

Dans cette étude, nous avons tout d'abord cherché à étudier l'hétérogénéité phénotypique des neutrophiles au cours de l'infection grippale. Si l'existence d'une hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle des neutrophiles est bien documentée dans le cancer (données pré-cliniques ou cliniques), peu de données sont actuellement disponibles dans un contexte infectieux.

I.1 Sca-1 : un marqueur de neutrophiles régulateurs

De façon inattendue, nous avons observé un changement de phénotype des neutrophiles pulmonaires au cours de l'infection à IAV. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence une augmentation de la proportion et du nombre de neutrophiles exprimant le marqueur membranaire Stem cells antigen-1 (Sca-1), également appelé Ly6A. Cette observation a attiré notre attention à la vue de l'absence de littérature sur l'expression de ce marqueur à la surface des neutrophiles. Si, comme son nom l'indique, Sca-1 est un marqueur de cellules souches hématopoïétiques, celui-ci est exprimé sur de nombreuses populations cellulaires matures même si ses fonctions restent encore très mal connues (Holmes *et al.* 2007; Walasek *et al.* 2013; Lang *et al.* 2017; Tillman *et al.* 2016; Upadhyay *et al.* 2011; Bradfute *et al.* 2005).

En utilisant différentes analyses *in vivo* et *in vivo*, nos données indiquent clairement des fonctions régulatrices/suppressives associées aux neutrophiles Sca-1^+ comparativement aux neutrophiles Sca-1^-.

Premièrement, les neutrophiles Sca-1^+ expriment de nombreuses molécules associées à des fonctions régulatrices dans diverses pathologies. Ainsi, on peut noter l'augmentation de l'expression du CMH II, ce qui pourrait suggérer une activité « APC-like ». Cette activité « APC-like » des neutrophiles a d'ailleurs déjà pu être suggéré chez l'homme et la souris notamment dans des contextes vaccinaux (Abadie *et al.* 2005; Meinderts *et al.* 2019). Afin d'étudier plus finement cette possibilité nous pourrions mettre en place des approches *in vitro* de présentation antigénique aux LT $CD4^+$ notamment dans un modèle OT-II (Abdallah *et al.* 2011).

En plus du CMH II, les neutrophiles Sca-1$^+$ expriment préférentiellement une autre molécule présentatrice d'Antigène, CD1d. CD1d est une molécule monomorphique, apparenté au CMH I, impliqué dans la sélection, le développement et l'activation des iNKT (Gapin 2016; Brigl *et al.* 2003; Tuttle *et al.* 2018). Etant donné l'importance de ces dernières dans l'infection grippale (Paget, Ivanov, Fontaine, Blanc, Pichavant, Renneson, Bialecki, Pothlichet, Vendeville, Barba-Speath, Huerre, Faveeuw, Si-Tahar, Trottein, *et al.* 2011; De Santo *et al.* 2008; Kok *et al.* 2012), cette observation pourrait s'avérer biologiquement pertinente. De façon intéressante, l'équipe de Vinvenzo Cerundolo a pu démontrer l'importance de l'interaction CD1d-dépendante entre les cellules iNKT et les Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) au cours de l'infection grippale. En effet, ce dialogue contrôle l'expansion et les fonctions suppressives des MDSC, restaurant ainsi le développement de la réponse CD8$^+$ spécifique (De Santo *et al.* 2008). Les auteurs ayant définis les MDSC uniquement sur la base des marqueurs CD11b et Gr-1 (Ly6C/Ly6G), il est possible que certains neutrophiles contribuent à cet effet. Si ce mécanisme permet de réguler le développement de la réponse adaptative cellulaire, il pourrait aussi permettre de moduler l'intensité de l'inflammation au cours de la grippe, un paramètre important dans la physiopathologie de cette infection.

Toutefois, l'augmentation de l'expression de ces molécules de présentation antigénique, à la surface du neutrophile Sca-1$^+$, est concomitante avec celle de PD-L1, une molécule impliquée dans la suppression de la réponse lymphocytaire. PD-L1 interagit avec PD-1, un « checkpoint » inhibiteur pouvant inhiber la réponse et/ou la prolifération des LT antigène-spécifique (Freeman *et al.* 2000). Cette interaction peut également inhiber l'apoptose des LT régulateurs renforçant ainsi le potentiel pouvoir régulateur des neutrophiles Sca-1$^+$. Si la co-expression de molécule de présentation antigénique avec des molécules purement inhibitrices peut paraitre contre-intuitive, il est à préciser que l'activité suppressive de PD-L1 nécessite l'expression d'un CMH (ou CMH-like) pour cibler un LT via une interaction avec son TCR (Bardhan *et al.* 2016).

Au-delà des marqueurs membranaires, nous avons pu démontrer que les neutrophiles Sca-1$^+$ étaient capables de produire une cytokine immunosuppressive clé, l'IL-10 (Couper *et al.* 2008). Dans un modèle d'infection grippale, l'IL-10 contrôle l'hyperinflammation pulmonaire et le recrutement de cellules inflammatoires réduisant ainsi la mortalité des animaux (J. Sun *et al.* 2009). A l'inverse, la production d'IL-10 au cours de la grippe pourrait

avoir des effets délétères dans le contexte des surinfections bactériennes (Barthelemy *et al.* 2017) fréquemment retrouvées en clinique (Rothberg *et al.* 2008).

Un autre facteur soluble suppresseur produit par les neutrophiles Sca-1$^+$ est l'enzyme arginase-1. Grâce à son activité hydrolytique sur l'arginine, l'arginase-1 altère de nombreuses voies d'activation des LT (signalisation du TCR, perte de la CD3ε, signalisation IL-2). Si le rôle spécifique de l'arginase-1 n'a pas encore été étudié au cours de la grippe, il est possible qu'elle puisse participer aux fonctions suppressives des MDSC dans ce modèle (Namkoong *et al.* 2018). Enfin, la capacité diminuée à produire des radicaux libres, de l'IL-1β ou encore de la MPO indiquent un profil pro-inflammatoire moindre que celui des neutrophiles Sca-1$^-$.

Afin de clarifier la fonction des neutrophiles Sca-1$^+$ dans la grippe, nous avons mis en place un test de suppression de la prolifération et de l'activité des LT. Pour cela, des neutrophiles Sca-1$^+$ isolés de souris grippées étaient mis en culture avec des LT spléniques en présence d'une stimulation anti-CD3. Si nos résultats préliminaires montraient une action suppressive des neutrophiles Sca-1$^+$ dans la prolifération des LT et leur production d'IFN-γ, nous n'avons pas réussi à reproduire cet effet dans les expériences suivantes.

Plusieurs difficultés techniques peuvent expliquer ce résultat, à commencer par la longue durée du tri nécessaire pour obtenir un nombre suffisant de neutrophiles. L'apport d'une étape de pré-enrichissement (billes magnétiques) ne nous permettait que de diminuer de façon marginale le temps de tri. Il est également possible que les anticorps utilisés pour le tri induisent une activation des neutrophiles fragilisant leur survie en culture. De plus, nous ne connaissons actuellement pas le rôle qu'exerce Sca-1 chez le neutrophile. Il est possible que l'utilisation d'un anticorps dirigé contre Sca-1 puisse inhiber les éventuelles fonctions de la protéine. Cette possibilité sera abordée plus en détail en fin de sous-partie.

Une autre donnée à prendre en compte est le rôle de CD11b dans l'activité suppressive des neutrophiles. L'équipe de Léo Koenderman a en effet montré que CD11b était impliqué dans la suppression de l'activité des LT par les neutrophiles (Tak *et al.* 2018). Or, l'utilisation d'un anticorps anti-CD11b est indispensable pour le tri des neutrophiles et l'un des seuls clones disponibles est le M1/70, un anticorps bloquant (Brickson *et al.* 2003). Il se peut donc que l'outil nécessaire au tri des neutrophiles inhibe au moins en partie leur action, et des expériences sans l'anticorps sont à faire pour répondre à cette question.

Afin de contourner cela, nous allons tenter de réaliser des tests avec des neutrophiles totaux purifiés par billes magnétiques à différents moments de l'infection. Nous corrèlerons ensuite les activités antiprolifératives observées avec la proportion de neutrophiles Sca-1 présentes dans nos suspensions. De plus, des tests avec des neutrophiles issus d'une différenciation *ex vivo* sont également envisagés. En effet, dans notre modèle de différenciation, l'ajout d'IFN-γ recombinant conduit à la génération de neutrophiles exprimant de façon uniforme Sca-1^+. En dépit de tests biologiques *ex vivo* de suppression convaincants, nos données suggèrent que les neutrophiles Sca-1^+ ont une activité régulatrice/suppressive. Afin d'avoir une vision plus globale sur les propriétés et fonctions de ces neutrophiles Sca-1^+, nous réaliserons une analyse transcriptomique (RNA-Seq) de ces dernières en comparaison avec des neutrophiles Sca-1^-.

I.2 Les neutrophiles régulateurs Sca-1^+ sont morphologiquement matures

Comme précédemment énoncé, l'existence de neutrophiles au profil régulateur n'a été que très peu décrite dans les infections aigues. D'après la littérature, les neutrophiles régulateurs murins sont soit définit comme des neutrophiles N2 (cancer) ou soit comme des MDSC.

Les neutrophiles N2 sont des neutrophiles associés aux tumeurs dérivant de neutrophiles circulant classiques sous l'influence du TGF-β dans l'environnement tumoral (Fridlender *et al.* 2009; Mishalian *et al.* 2013). Les N2 ont une activité pro-tumorale en favorisant l'angiogenèse et en diminuant l'activité de LT $CD8^+$ (via la production d'arginase). Morphologiquement, les neutrophiles N2 présentent un noyau normalement segmenté mais ils sont moins denses que les N1 (Sagiv *et al.* 2015).

Par ailleurs, les MDSC représentent une population très hétérogène de cellules immatures d'origine myéloïdes (Patrizia Scapini *et al.* 2016; Carmona-Rivera *et al.* 2013; Moses *et al.* 2016). Les MDSC exercent leurs fonctions suppressives au travers d'une production importante d'arginase-1 et d'IL-10. Parmi les MDSC, la sous-population « granulocytaire » (G-MDSC) est principalement constituée de neutrophiles immatures ayant quittés la moelle osseuse avant la fin de leur processus de maturation. Ainsi, les G-MDSC présentent un noyau en forme de bande ou hyposegmenté et sont plutôt larges avec une densité faible (Sagiv *et al.* 2015).

De façon intéressante, l'analyse microscopique des neutrophiles Sca-1^{+} indiquent que ces derniers ont un profil classique de neutrophiles matures au regard de leur taille et de leur noyau segmenté. De plus, nos analyses de cytométrie en flux suggèrent qu'elles ont une densité légèrement plus faible que les neutrophiles Sca-1^{-}, une observation qui pourrait s'expliquer par une différence dans leur contenu cytoplasmique. Une analyse sur gradient de densité nous permettra de vérifier en partie cette observation.

En lien avec nos observations, les travaux de Léo Koenderman mettent en évidence l'existence de neutrophiles matures et régulateurs. Par exemple, l'injection de lipopolysaccharide chez l'Homme induit des neutrophiles CD16^{high} CD62L^{dim} au noyau hyper-segmenté (Pillay, 2011 JCI). Ces neutrophiles ont donc, en plus d'un phénotype différent des neutrophiles « classiques » CD16^{high} CD62L^{high}, une morphologie différente. Les chercheurs ont suggéré que l'hyper-segmentation du noyau était associé à un âge plus avancé du neutrophile. Une analyse protéomique des différentes sous-populations semble indiquer que la population CD62L^{dim} serait en réalité une sous-population distincte, se développant en parallèle des neutrophiles « classiques » CD62L^{high} (Tak *et al.* 2017).

En rapport avec leurs fonctions, les neutrophiles Sca-1^{+} que nous avons identifiés sont donc originaux par leur morphologie, qui est celle d'un neutrophile mature sans différence majeure avec les neutrophiles « classiques » Sca-1^{-}. Des analyses de microscopie électronique pourraient nous permettre d'étudier plus en détail le contenu en organelles de ces cellules et notamment la diversité et quantité de granules.

I.3 Les neutrophiles Sca-1^{+} : Une population hétérogène ?

Comme nous l'avons vu, les neutrophiles Sca-1^{+} forment une sous-population de neutrophiles régulateurs dont le nombre et la fréquence augmente au cours de l'infection au virus *Influenza*. Il est intéressant de noter que les neutrophiles Sca-1^{+} expriment des protéines que n'expriment pas ou très peu les neutrophiles Sca-1^{-} comme PD-L1, CMH II ou encore l'IL-10. Toutefois, cette discrimination des phénotypes Sca-1^{-} et Sca-1^{+} peut également s'appliquer à l'intérieur même de la sous-population Sca-1^{+}. Ainsi, on remarque une augmentation de l'expression de certains marqueurs au cours de l'infection grippale, mais les neutrophiles Sca-1^{+} n'expriment pas tous les protéines qui les distinguent des neutrophiles Sca-1^{-}.

Ceci peut s'expliquer par plusieurs mécanismes, mais il se peut que les neutrophiles Sca-1$^+$ soient activés une fois dans les poumons infectés par différents facteurs. En effet, si l'on compare l'expression de PD-L1 par les neutrophiles Sca-1$^+$ dans la moelle, le sang et le parenchyme pulmonaire, on remarque une augmentation graduelle jusque dans ce dernier compartiment. Cela suggère que les neutrophiles Sca-1$^+$, bien que programmés dans la moelle, expriment progressivement leur phénotype régulateur. On peut ainsi imaginer un mécanisme de tolérance de la part de l'organisme qui n'activerait pas l'ensemble de ces cellules régulatrices au même moment, au risque de supprimer totalement la réponse inflammatoire.

Une deuxième hypothèse est l'existence, au sein même de la sous-population de neutrophiles Sca-1$^+$, de différentes populations partageant une expression commune de Sca-1. Celles-ci exprimeraient différents marqueurs définissant par exemple des fonctions spécifiques ou encore des cibles spécifiques. Cela nécessiterait des investigations plus poussées sur le rôle de ces différents marqueurs dans l'action des neutrophiles afin de détecter des possibles sous-populations fonctionnelles de neutrophiles Sca-1$^+$.

I.4 Rôle de la protéine Sca-1 chez le neutrophile

Défini en premier lieu comme un marqueur des cellules souches hématopoïétiques, Sca-1 est exprimé par de nombreuses cellules où il semble avoir une fonction propre. Si nous n'avons pour l'instant aucune définition du rôle de Sca-1 chez le neutrophile, nous pouvons nous appuyer sur les résultats obtenus avec d'autres cellules pour émettre des hypothèses chez le neutrophile.

En plus de son rôle dans le renouvellement des cellules souches hématopoïétiques (C. Y. Ito *et al.* 2003), Sca-1 a été particulièrement étudié chez les lymphocytes. En effet, les LT augmentent son expression au cours d'infections virales. L'expression de Sca-1 permet par exemple de distinguer les LT mémoires, mais la protéine ne semble pas jouer de rôle dans leur mise en place (Whitmire *et al.* 2009). En revanche, la ligation de Sca-1 via un anticorps induit l'activation des LT et la production de cytokine comme l'IL-2 (Henderson *et al.* 2002; Flood *et al.* 1990). Cette activation s'accompagne toutefois d'une inhibition de la prolifération et une induction de l'apoptose des cellules (Lang *et al.* 2017) notamment via la translocation du cytochrome C et l'activation des caspases 3 et 9.

Cette dernière donnée peut expliquer les problèmes rencontrés lors des essais de suppression de l'activité des LT. En effet, si Sca-1 a un comportement similaire sur les neutrophiles, il est possible que le tri de la population via un anticorps anti-Sca-1 soit létal pour le neutrophile en induisant son apoptose.

Les ligands de Sca-1 sont encore peu connus (CD22, une lectine exprimée par les LB ; l'intégrine αVβ3 ou encore le vecteur viral AAV-PHP.B) et leur effet sur l'activation de Sca-1 n'est pas encore compris (Pflugh *et al.* 2002; Penvose *et al.* 2012; Hordeaux *et al.* 2019). Nous n'avons donc pas encore d'indices sur ce que serait la cible de Sca-1 *in vivo* pour les neutrophiles et si des ligands pourraient par exemple induire l'apoptose des neutrophiles Sca-1^+ *in vivo*.

Cependant, différentes études semblent montrer un lien entre Sca-1 et TGF-β, et plus particulièrement avec une protéine du récepteur à TGF-β, TGFBR-I (Upadhyay *et al.* 2011). Upadhyay et al ont ainsi montré que Sca-1 s'associait à TGFBR-I et inhibait l'activation du récepteur par un de ses ligands, GDF-10, empêchant l'activation de Smad3 et promouvant la prolifération de cellules tumorales. TGFBR-I est exprimé par les neutrophiles, mais le rôle de TGF-β n'est que peu connu et semble être très dépendant du contexte et de l'environnement des cellules. Ainsi, des études montrent une action pro-inflammatoire, pro-apoptotique ou encore anti-inflammatoire selon les modèles (Kelly *et al.* 2017), et TGF-βI semble être à l'origine de la polarisation des neutrophiles vers un profil « N2 » anti-inflammatoire dans le cancer. Il serait donc intéressant de mieux comprendre les interactions entre Sca-1 et TGFBR-I dans notre modèle, et d'étudier le rôle de TGFBR-I chez le neutrophile lors de l'infection à *Influenza* en particulier.

En dehors de cette activité liée à la signalisation, Sca-1 semble être impliqué dans les interactions cellule-cellule aussi bien au niveau des cellules souches que des LT (Penvose *et al.* 2012; Pflugh *et al.* 2002). De plus, Sca-1 semble reconnaitre l'intégrine αVβ3 qui est impliquée dans les interactions cellule-cellule et qui est exprimée par les cellules endothéliales. Cette expression est d'ailleurs fortement augmentée lors d'une agression (Antonov *et al.* 2011; Horton 1997). Ceci pourrait expliquer la répartition des neutrophiles Sca-1^+ dans les différents tissus de la souris à l'homéostasie, ces cellules peuplant préférentiellement certains organes.

Sca-1 reste une protéine mystérieuse encore utilisée dans de nombreux contextes pour déterminer des populations et sous-populations. Il est indispensable de mieux cerner le rôle

de Sca-1 chez le neutrophile afin notamment de répondre à la question de l'hétérogénéité des neutrophiles Sca-1^+ qui pour l'instant partagent tous l'expression de ce marqueur mais ne semblent pas avoir forcément tous la même fonction à un temps donné. Des indices sur la fonction de Sca-1 permettraient également d'accélérer l'étude des neutrophiles régulateurs chez l'Homme, cette protéine ne présentant pas d'orthologue humain.

II Revisite du rôle du neutrophile dans la grippe

II.1 Les conséquences du rôle des neutrophiles dans la grippe ne sont-elles que dépendantes du modèle utilisé ?

L'un des objectifs de notre étude était de chercher des réponses au rôle ambivalent du neutrophile dans les modèles expérimentaux de grippe. Comme nous l'avons vu en introduction, la littérature scientifique actuelle n'est pas consensuelle et le rôle des neutrophiles dans la grippe est vu aussi bien comme bénéfique que délétère en fonction des études.

Il est clair que les différents paramètres expérimentaux (souche, dose, fond génétique) peuvent aisément expliquer les différences de phénotypes observés entre les études. A titre d'exemple, de nombreuses souches d'IAV sont utilisées par les différents laboratoires de recherche à travers le monde présentant chacune certaines particularités : niveau de virulence, cibles de différentes régions du poumon, virus adapté ou non au modèle animal, etc.

Toutefois, le design expérimental des études passées sur la grippe indique que les neutrophiles ont été considérés comme une population homogène et mono-tâche. Dans ce contexte, l'évaluation du rôle des neutrophiles n'a été qu'apprécié dans sa globalité via l'utilisation de souris rendues neutropéniques dès le début de l'infection (injection d'anticorps déplétants anti-Ly6G).

En utilisant cette approche, la plupart des études indiquent une protection des animaux suggérant un rôle délétère des neutrophiles dans la grippe (Brandes *et al.* 2013; Vidy *et al.* 2016; Narasaraju *et al.* 2011) et cela indépendamment de la souche (PR8 ou WSN) ou du fond génétique utilisé (C57BL/6 ou BALB/c). Si ces résultats suggèrent donc un rôle général délétère des neutrophiles, il n'exclut pas l'existence de fonctions protectrices plus discrètes. Ainsi, en

utilisant des modèles de sévérité différentes, les équipes de Ronald Germain et de Patrick Reading ont pu démontrer que le neutrophile contribuait au contrôle de l'inflammation et de la transition d'une grippe modérée à une grippe sévère (Tate *et al.* 2009; Brandes *et al.* 2013). Dans ce contexte, nous pourrions émettre l'hypothèse que le neutrophile joue un rôle délétère dans les grippes sévères et plutôt protecteur dans un modèle plus léger.

Dans notre modèle « immuno-pathologique » d'infection grippale induite par une souche H3N2 (Scotland/74) (Le Goffic *et al.* 2006), les souris neutropéniques sont complètement protégées avec une survie de 100 % et une perte de poids modérée par rapport aux souris contrôles. Si ces données sont en accord avec l'hypothèse ci-dessus, la situation est totalement différente lorsque l'on modifie la cinétique de déplétion des neutrophiles. En effet, une déplétion des neutrophiles débutant au pic de réplication virale (J4) et continuée pendant la phase de résolution entraine un retard de reprise de poids et une augmentation de la mortalité des animaux. Nos données indiquent clairement que dans un même modèle, les neutrophiles peuvent avoir des rôles antagonistes au cours de l'évolution de l'infection grippale.

Il est important de rappeler que nous avons commencé la déplétion en neutrophiles à J4 post-infection car ce point de cinétique correspond à l'apparition des neutrophiles Sca-1$^+$ régulateurs dans les voies aériennes. Ainsi, nous émettons l'hypothèse que ces neutrophiles régulateurs favorisent le retour à l'homéostasie de l'inflammation respiratoire et donc diminuent les dommages tissulaires associés responsables de la mort des animaux. Si nos données convergent indirectement vers cette explication, des nouveaux modèles biologiques sont clairement nécessaires pour valider notre hypothèse.

II.2 Comment étudier plus spécifiquement les neutrophiles régulateurs dans la grippe ?

Bien que nous ayons des outils pour étudier les fonctions des neutrophiles Sca-1$^+$ *in vitro*, leur rôle *in vivo* n'a pu être suggéré qu'indirectement via la déplétion de l'ensemble des neutrophiles.

Parmi les autres approches, la déplétion des cellules Sca-1$^+$ ne semblent pas être spécifique car Sca-1 est exprimé par de nombreux contingents cellulaires d'origine myéloïde ou lymphoïde, introduisant donc un biais dissuasif. Ainsi, le développement d'une souris présentant une mutation conditionnelle parait la plus adaptée. Si le ciblage spécifique des

neutrophiles est aujourd'hui possible avec une spécificité plus ou moins importante (Hasenberg *et al.* 2015; Faget *et al.* 2018), il nous reste toutefois à définir le gène à supprimer dans ces cellules pour cibler spécifiquement la population Sca-1$^+$. Justement, Sca-1 ne parait pas nécessairement le gène candidat le plus pertinent au vu des connaissances actuelles très limitées sur les fonctions de ce gène. L'identification d'un gène impliqué dans les fonctions régulatrices de ces cellules pourrait être un candidat intéressant. A titre d'exemple, PD-L1 pourrait être une cible si nous confirmons son rôle dans l'activité régulatrice de ces cellules. Toutefois, d'autres facteurs PD-L1-indépendants pourraient jouer un rôle important dans la fonction régulatrice des neutrophiles Sca-1$^+$ (*e.g.* synthèse de médiateurs solubles). L'apport des nouvelles technologies d'analyse transcriptomique (RNA-Seq), que nous sommes en train de réaliser, pourrait potentiellement permettre d'identifier plusieurs gènes « signature » et donc de nouveaux candidats pour la création de notre modèle de souris « knock-out » conditionnelles.

A côté de cette approche génétique, le transfert adoptif de neutrophiles Sca-1$^+$ dans des souris neutropéniques (génétiquement ou après déplétion) pourrait également permettre d'obtenir de nouveaux indices sur les fonctions des neutrophiles Sca-1$^+$. Toutefois, l'une des limites de ce procédé est de pouvoir purifier un nombre suffisant de neutrophiles Sca-1$^+$. Si cela parait réalisable à partir d'animaux infectés (par la grippe notamment), le nombre limité de ces cellules chez une souris naïve (~ 25,000 par poumon) apparait comme un frein important. Au-delà de l'aspect numérique, la manipulation des neutrophiles *ex vivo* est particulièrement compliquée et il est probable que leur altération par les différentes étapes de purification ne permette pas un transfert de cellules parfaitement fonctionnelles.

Toutefois, ces différentes approches seront considérées par notre groupe de recherche dans les mois à venir.

III Programmation des neutrophiles Sca-1+ dans la moelle

III.1 De l'infection pulmonaire à la programmation dans la moelle osseuse

L'une des observations les plus intéressantes de notre étude est l'acquisition par les neutrophiles du programme régulateur au cours de leur différenciation dans la moelle pendant l'infection à IAV et non *in situ* au point infectieux.

Un premier indice de cela est l'expression importante de Ki67 par les neutrophiles régulateurs. Cette protéine est en effet un marqueur de prolifération cellulaire qui s'accumule pendant la mitose et diminue progressivement dans les neutrophiles matures (et donc quiescents) (I. Miller *et al.* 2018). Dans les poumons infectés, les neutrophiles Sca-1$^+$ présentent une expression supérieure de Ki67 par rapport aux neutrophiles Sca-1$^-$. Cela suggère que, de façon globale, ils sont issus d'une différenciation plus récente que les neutrophiles Sca-1$^-$, ce qui semble être appuyé par le fait que la population de neutrophiles Sca-1$^+$ apparait tardivement dans la moelle après une première phase de recrutement des neutrophiles Sca-1$^-$.

Un autre indice est que l'ajout d'un facteur induisant le programme régulateur (Voir paragraphe ci-dessous) ne permet pas de développer *in vitro* des neutrophiles régulateurs à partir de neutrophiles matures pulmonaires Sca-1$^-$.

Enfin, il est important de mentionner que, d'un point de vue cinétique, l'augmentation significative des neutrophiles Sca-1$^+$ dans la moelle et le sang précède celle observée dans les poumons.

L'infection à IAV étant principalement locale, il est probable qu'un médiateur indirect dû à l'inflammation systémique soit responsable de l'acquisition du programme régulateur par les neutrophiles médullaires. D'autres modèles infectieux induisant une inflammation générale ont déjà montré leur influence sur l'éducation fonctionnelle de certains types cellulaires dans la moelle. A titre d'exemple, une infection orale à *Toxoplasma gondii* influence la différenciation des monocytes dans la moelle vers un profil régulateur (Askenase *et al.* 2015). Il est d'ailleurs intéressant de noter que deux des marqueurs retrouvés sur ces monocytes régulateurs sont Sca-1 et CMH II.

Si nos données pointent vers un rôle important de la moelle dans ce phénomène, des expériences complémentaires seront nécessaires pour confirmer cela. L'une des pistes que nous avons explorées au cours de ma thèse est la possibilité de bloquer la sortie des

neutrophiles de la moelle afin de corréler cela avec le taux de neutrophiles régulateurs retrouvé dans les poumons. Toutefois, nos approches visant à mimer cela (injection de réparixine ou de FTY720) ne nous ont pas permis de répondre à cette question.

III.2 L'IFN-γ est une cytokine clé dans la programmation des neutrophiles Sca-1$^+$ lors de l'infection à *Influenza*

L'absence de matériel viral dans la moelle des animaux infectés par IAV suggère un mécanisme indirect probablement médié par un facteur soluble. Les travaux du laboratoire de Yasmine Belkaid (Askenase *et al.* 2015) démontrent l'importance de l'IFN-γ dans la programmation de monocytes régulateurs. De façon intéressante, nous retrouvons des transcrits d'IFN-γ dans la moelle des souris infectées. De plus, Sca-1, un marqueur de notre population d'intérêt est un gène souvent retrouvé dans les signatures IFN faisant de lui un ISG (Khuda Dad Khan *et al.* 1993; X. Ma *et al.* 2001; Dumont *et al.* 1986; DeLong *et al.* 2018).

L'utilisation de souris *Ifng*$^{-/-}$ dans notre modèle montre une forte diminution de la population de neutrophiles Sca-1$^+$ induite par IAV. De façon intéressante, cette diminution s'observe déjà dans la moelle. De plus, ce facteur semble suffisant en contexte infectieux pour induire ce programme régulateur comme nous avons pu le démontrer dans notre modèle de différenciation *ex vivo*.

Ces observations ouvrent donc le questionnement de la source d'IFN-γ dans notre système. La présence de transcrit d'ARN pour cette cytokine dans la moelle après infection suggère que cette synthèse pourrait être locale. Dans l'étude d'Askenase et al (Askenase *et al.* 2015), l'IFN-γ est produit par les cellules NK résidentes qui sont stimulées par l'IL-12 produit par les cellules dendritiques des ganglions drainants les intestins et qui voyage jusqu'à la moelle.

Un mécanisme similaire peut être suggéré dans notre modèle. Même si nous n'avons pas encore répondu directement à cette question, nos travaux préliminaires suggèrent (FACS intracellulaire) la présence dans la moelle de cellules productrices d'IFN-γ au cours de l'infection.

En accord avec la précédente étude, nous observons que les cellules NK représentent une source d'IFN-γ post-IAV. Toutefois, d'autres populations de LT innés semblent capables de produire de grandes quantités d'IFN-γ comme les iNKT ou les LT γδ. Notre laboratoire ayant

un intérêt important pour ces cellules et les outils pour les étudier, nous analyserons le développement des neutrophiles régulateurs en l'absence de ces populations (souris *Traj18*$^{-/-}$: déficients en iNKT ou *Tcrd*$^{-/-}$: déficients en LT γδ).

Enfin, il est important de noter que dans les animaux naïfs *Ifng*$^{-/-}$, la proportion de neutrophiles Sca-1^{+} n'est pas impactée suggérant qu'un ou plusieurs autres facteur(s) contrôle(nt) cette population à l'homéostasie.

III.3 Les neutrophiles nécessitent un ou plusieurs autres facteurs pour l'induction d'un programme régulateur

Dans notre modèle de différenciation *ex vivo*, nous avons remarqué que, dans ces conditions, les neutrophiles exprimaient Sca-1 dans une proportion bien plus importante qu'*in vivo*. De plus, les souris *Ifng*$^{-/-}$ et *Ifngr*$^{-/-}$ présentaient également une fréquence de neutrophiles Sca-1^{+} non nulle. Cela indique donc un mécanisme complémentaire à l'IFN-γ pour l'induction de la population de neutrophiles Sca-1^{+}, notamment à l'homéostasie.

Parmi les candidats potentiels, nous pouvons citer le G-CSF. En effet, dans notre modèle de différenciation, l'expression de Sca-1, PD-L1 et CMH II est particulièrement induite lors de la phase où le G-CSF est le seul facteur de croissance ajouté. De plus, un rôle du G-CSF dans la production d'IL-10 a notamment été montré chez la souris (Hermesh *et al.* 2012). Il est intéressant également de remarquer que l'injection de G-CSF humain recombinant à des volontaires sains induit un phénotype particulier sur les neutrophiles circulants au bout de 7 jours de traitement au G-CSF (Ohsaka *et al.* 1995; Carulli 1997). Ce phénotype consiste en une surexpression de CD11b accompagnée d'une diminution de CD62L, profil que l'on retrouve sur les neutrophiles régulateurs humains (Pillay *et al.* 2012).

Il ne s'agit ici que de corrélations et non de relation cause à effet entre ces deux observations. Il serait toutefois très intéressant d'étudier plus en détail le rôle du G-CSF aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* sur la génération des neutrophiles Sca-1^{+} et la polarisation des neutrophiles vers un phénotype régulateur. Une des options est par exemple de réaliser une expérience similaire à celle d'Ohsaka et al, qui consisterait en une injection de G-CSF à des souris naïves afin d'observer l'évolution de la population de neutrophiles Sca-1^{+} dans les différents tissus qu'ils peuplent. L'utilisation de souris n'exprimant pas de G-CSF ou de G-CSFR semble en revanche difficile à mettre en place, au vu de l'importance de ce facteur de croissance dans le développement de l'ensemble des neutrophiles.

III.4 Les neutrophiles régulateurs peuvent-ils provenir d'une polarisation *in situ* ?

Dans les cancers solides, le TGF-β a montré, dans le microenvironnement tumoral, une action polarisante en un phénotype « N2 » anti-inflammatoire et pro-tumoral (Fridlender *et al.* 2009). Dans ce même contexte, des indices suggèrent que le G-CSF pourrait jouer un rôle dans la polarisation des neutrophiles vers le type N2 (Coffelt *et al.* 2015; Roberts 2005). Il est intéressant de noter que l'on retrouve ces deux médiateurs dans les voies aériennes de souris infectées à IAV (Denney *et al.* 2018; Carlson *et al.* 2010; L. Qi *et al.* 2011), et on peut supposer une action du G-CSF et/ou du TGF-β dans la polarisation des neutrophiles régulateurs.

Il a été également montré que les cellules tumorales exprimant le G-CSF pouvaient attirer les neutrophiles pro-tumoraux sur le site métastatique, montrant un effet dans le système sanguin voire dans la moelle. Cela supposerait alors une attraction de neutrophiles pré-programmés et non une polarisation *in situ*. En dehors du contexte cancéreux, le G-CSF semble plutôt associé au maintien des fonctions pro-inflammatoires et antibactériennes des neutrophiles, et ne favoriserait donc pas l'hypothèse d'un rôle dans la polarisation de neutrophiles régulateurs (Bo *et al.* 2011; A. C. Cheng *et al.* 2007; Goya *et al.* 1993; Eichacker *et al.* 1994; Haberstroh *et al.* 1995). IFN-γ montre le même comportement dans l'environnement inflammatoire, promouvant les fonctions pro-inflammatoires des neutrophiles (Ellis *et al.* 2004). IFN-γ stimule également les capacités antivirales des cellules lors de l'infection à *Influenza* (N Baumgarth *et al.* 1996).

Les données de la littérature montrent donc plutôt un recrutement de neutrophiles pré-programmés comme des neutrophiles hypersegmentés recrutés chez des enfants atteints d'infection respiratoire (Cortjens *et al.* 2017). Avec toutes les limites de notre modèle, cette pré-programmation va dans le sens de nos résultats montrant que l'ajout d'IFN-γ sur des neutrophiles matures Sca-1^- ne provoque pas de polarisation vers un profil régulateur. De plus, les données issues des essais de déplétion de l'IFN-γ systémique dans l'infection grippale ne montrent pas d'impact sur le recrutement de la population Sca-1^+. Ces résultats suggèrent donc une programmation des neutrophiles en sous-types fonctionnels directement dans la moelle par l'IFN-γ.

Le rôle essentiel de l'IFN-γ dans la programmation des neutrophiles (qui pourrait également être accompagné par le G-CSF) semble donc assez paradoxal en lui-même, cette

cytokine montrant un effet pro-inflammatoire sur les neutrophiles. Une étape à suivre est de trouver la cible cellulaire pour l'induction de l'expression de Sca-1 et du phénotype régulateur. D'après l'effet de l'IFN-γ et du G-CSF sur les neutrophiles matures, on peut ainsi penser que la cible cellulaire réside dans leurs progéniteurs. Il est intéressant de noter que les métamyélocytes expriment Sca-1, expression qui diminue au fur et à mesure de la différenciation. Il reste donc à savoir si les neutrophiles Sca-1$^+$ sont issus de progéniteurs n'ayant pas diminué l'expression de cette protéine ou s'il s'agit d'une nouvelle induction au cours de la différenciation.

IV Les neutrophiles Sca-1+ à l'homéostasie : Niches tissulaires et facteurs de survie

De façon intéressante, nos travaux démontrent l'existence de neutrophiles, co-exprimant Sca-1, PD-L1 et CMH II, potentiellement régulateur à l'homéostasie. Les neutrophiles régulateurs sont généralement associés soit à de l'immaturité (G-MDSC) (Pillay *et al.* 2013) ou bien à l'acquisition d'un tel profil après un stress (cancer, LPS, etc.) (Pillay *et al.* 2012; Fridlender *et al.* 2009). Dans notre cas, il est important de mentionner que les neutrophiles Sca-1$^+$ que nous observons à l'homéostasie présentent déjà une morphologie de cellules matures, les différenciant ainsi des G-MDSC.

Suite à l'observation de ces cellules dans les poumons de souris naïves, nous pouvions nous demander si ces dernières étaient spécifiques ou non de cet organe. De façon intéressante, nos résultats montrent un enrichissement des neutrophiles Sca-1$^+$ dans les organes non lymphoïdes comme les poumons, le foie ou encore les intestins. A l'inverse, même s'ils sont détectés dans ces organes, les neutrophiles Sca-1$^+$ sont très peu représentés dans les organes lymphoïdes comme les ganglions, la rate ou la moelle.

L'enrichissement de la population de neutrophiles Sca-1$^+$ dans ces tissus pourrait faire sens. En effet, ces tissus requièrent un niveau de tolérance immunitaire important dû au contact permanent avec différents composés inflammatoires. De plus, ces tissus sont au contact direct de produits microbiens et/ou des microbes eux-mêmes, il était donc légitime de se demander si le microbiote avait une influence sur les neutrophiles Sca-1$^+$. Nos travaux en cours évaluent cette hypothèse. Pour cela, les souris sont traitées plusieurs semaines avec un cocktail d'antibiotiques à large spectre permettant d'éliminer la grande majorité des

commensaux (Ge *et al.* 2017; Emal *et al.* 2017). Si nos données préliminaires indiquent un rôle du microbiote sur l'homéostasie générale des neutrophiles, il est encore trop tôt pour tirer des conclusions sur la population Sca-1$^+$. En effet, nos résultats à confirmer donnent des effets tissu-dépendants.

Notre approche de déplétion n'étant pas parfaite car pouvant générer des biais en favorisant des phyla pro- ou anti-neutrophiles Sca-1$^+$ et n'intégrant pas les composantes virales et fongiques du microbiote, nous envisageons de tester notre hypothèse dans des souris Germ-free (collaboration avec le Pr. T. Mallevaey, Université de Toronto).

De plus, il serait intéressant d'étudier si cette différence de localisation tissulaire est dépendante de facteurs de « homing » particuliers. Pour cela, nous analyserons l'expression différentielle de différents récepteurs aux chimiokines ainsi que certaines intégrines. Il est également possible que la distribution particulière soit dépendante de facteurs de survie reçus *in situ* leur permettant de survivre dans certains environnements plutôt que d'autres.

V Opportunités cliniques

Si notre travail consistait principalement à mieux les mécanismes de régulation de l'inflammation au cours de la grippe par le prisme des neutrophiles, nos observations ouvrent un champ d'investigation intéressant dans le domaine clinique.

L'intérêt du modèle murin réside dans la facilité d'investigation des mécanismes, mais nous avons été confrontés à certaines difficultés liées à la transposabilité du modèle souris vers l'Homme. Ceci est dû au fait que Sca-1 ne présente pas, à l'heure actuelle, d'orthologues connus chez l'Homme. En effet, s'il existe de nombreux orthologues de la famille des Ly6 chez l'Homme (Loughner *et al.* 2016), Ly6A/Sca-1 fait partie des rares, avec Ly6G, à ne pas être observé. Ceci peut donc constituer une limite pour l'étude d'une population analogue chez l'Homme. Afin de contourner cela, nous allons réaliser, comme énoncé précédemment, une analyse transcriptomique (RNA-Seq) des neutrophiles Sca-1$^-$ et Sca-1$^+$ afin de tenter de caractériser un ou plusieurs gènes spécifiques de cette population.

Une étude multicentrique a récemment montré que les neutrophiles étaient très fortement liés à l'intensité de la pathologie grippale chez l'Homme (Tang *et al.* 2019). Cette étude peut nous donner des pistes pour trouver un pendant humain aux neutrophiles Sca-1$^+$,

car on y retrouve de nombreux paramètres liés aux neutrophiles Sca-1^+ murins comme les « pathways » de l'IL-10 ou de PD-L1.

Nous avons également mené des premiers tests avec des échantillons biologiques de patients présentant une pneumonie sévère et séjournant dans le service de réanimation polyvalente du CHRU de Tours (Etude ImPACT : NCT03379207).

Nos résultats préliminaires menés sur la base du marqueur PD-L1 suggèrent une augmentation de son expression par les neutrophiles dans le sang des patients par rapport aux contrôles. Il reste bien sûr à confirmer ces observations sur un nombre plus important de patients. A termes, des analyses de corrélation seront réalisées entre la proportion relative de neutrophiles PD-L1 et la sévérité de la maladie et/ou le devenir du patient. Il est à noter que nous mettons également cette analyse au point à partir d'aspirations endo-trachéales de ces patients (pour les patients très sévères intubés-ventilés). Ceci pourrait générer des données plus pertinentes et sensibles que le sang circulant.

Dans la littérature, peu d'études se sont concentrées sur l'origine des neutrophiles régulateurs (Pillay *et al.* 2013), posant l'observation qu'ils apparaissent après un stimulus (LPS, cancer). La difficulté d'accès aux tissus d'origine des neutrophiles chez l'Homme est particulièrement problématique. Notre étude permet ainsi d'apporter des indices quant au phénotype et à l'origine des neutrophiles régulateurs lors de l'inflammation. Ainsi ces cellules apparaissent comme des cibles d'intérêt en thérapie. Plus spécifiquement, le syndrome de détresse respiratoire aigüe (SDRA) est une complication pathologique grave (40% de mortalité en milieu hospitalier) ayant pour principale étiologie les pneumonies (Sweeney *et al.* 2016) et n'ayant, à ce jour, aucune thérapeutique dédiée (Sweeney *et al.* 2016). D'un point de vue physiopathologique, le neutrophile semble jouer un rôle pivot dans le processus pro-inflammatoire délétère notamment via la synthèse importante de molécules provoquant des dégâts tissulaires, en particulier les NETs et les ROS (H. Li *et al.* 2018; Kellner *et al.* 2017). Il est possible qu'un défaut de programmation de neutrophiles régulateurs soit une des causes de la physiopathologie ou bien que ces derniers ne soient pas assez nombreux pour contrecarrer la surinflammation.

D'un point de vue thérapeutique, on peut se poser la question du bénéfice de favoriser la polarisation des neutrophiles vers un profil régulateur. Toutefois, cette possibilité est à considérer avec beaucoup de précaution. En effet, il est fréquemment observé en clinique

l'apparition de surinfections bactériennes chez ces patients. Dans ce contexte, favoriser des processus anti-inflammatoires est très discutable. Dans tous les cas, ceci suggère l'importance et le rôle pivot des neutrophiles dans la régulation de l'inflammation pulmonaire notamment en contexte infectieux. Ces dernières restent donc une cible pertinente dans le cadre de thérapies cellulaires.

En dehors de cet aspect, il serait très intéressant de pouvoir considérer les neutrophiles régulateurs comme marqueurs prédictifs dans les infections respiratoires sévères. On peut ainsi penser qu'un défaut de ces neutrophiles dans le sang ou dans les voies aériennes des patients soit un signe de défaut de contrôle de l'inflammation. Leur fluctuation au cours du séjour du patient pourrait aussi constituer un facteur d'évolution (positif ou négatif) de la maladie et notamment de la transition vers un SDRA. A terme, cette utilisation pourrait ne pas se limiter qu'aux pathologies respiratoires et être pertinente dans de nombreuses pathologies liées à l'inflammation aiguë ou chronique comme les maladies inflammatoires de l'intestin, les maladies auto-immunes ou le cancer.

Bibliographie

A

Abadie, Valérie, Edgar Badell, Patrice Douillard, Danielle Ensergueix, Pieter J M Leenen, Myriam Tanguy, Laurence Fiette, Sem Saeland, Brigitte Gicquel, and Nathalie Winter. 2005. "Neutrophils Rapidly Migrate via Lymphatics after Mycobacterium Bovis BCG Intradermal Vaccination and Shuttle Live Bacilli to the Draining Lymph Nodes." *Blood* 106 (5): 1843–50. https://doi.org/10.1182/blood-2005-03-1281.

Abdallah, Delbert S Abi, Charlotte E. Egan, Barbara A. Butcher, and Eric Y. Denkers. 2011. "Mouse Neutrophils Are Professional Antigen-Presenting Cells Programmed to Instruct T H1 and T H17 T-Cell Differentiation." *International Immunology* 23 (5): 317–26. https://doi.org/10.1093/intimm/dxr007.

Adler, Heiko, Janice L Beland, Nadia C. Del-Pan, Lester Kobzik, Joanne P Brewer, Thomas R Martin, and Ilonna J Rimm. 1997. "Suppression of Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV-1)–Induced Pneumonia in Mice by Inhibition of Inducible Nitric Oxide Synthase (INOS, NOS2)." *The Journal of Experimental Medicine* 185 (9): 1533–40. https://doi.org/10.1084/jem.185.9.1533.

Adolfsson, Jörgen, Ole Johan Borge, David Bryder, Kim Theilgaard-Möch, Astrand-Grundström Ingbritt, Ewa Sitnicka, Yutaka Sasaki, and Sten E.W. Jacobsen. 2001. "Upregulation of Flt3 Expression within the Bone Marrow Lin-Sca1+ c-Kit+ Stem Cell Compartment Is Accompanied by Loss of Self-Renewal Capacity." *Immunity* 15: 659–69. https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S1074-7613%2801%2900220-5.

Adolfsson, Jörgen, Robert Månsson, Natalija Buza-Vidas, Anne Hultquist, Karina Liuba, Christina T. Jensen, David Bryder, et al. 2005. "Identification of Flt3 + Lympho-Myeloid Stem Cells Lacking Erythro-Megakaryocytic Potential: A Revised Road Map for Adult Blood Lineage Commitment." *Cell* 121 (2): 295–306. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.013.

Adrover, José M., Carlos del Fresno, Georgiana Crainiciuc, Maria Isabel Cuartero, María Casanova-Acebes, Linnea A. Weiss, Hector Huerga-Encabo, et al. 2019. "A Neutrophil Timer Coordinates Immune Defense and Vascular Protection." *Immunity* 50 (2): 390-402.e10. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.01.002.

Akahoshi, Tohru, Takeshi Sasahara, Rie Namai, Toshimichi Matsui, Hiroyuki Watabe, Hidero Kitasato, Matsuhisa Inoue, and Hirobumi Kondo. 2003. "Production of Macrophage Inflammatory Protein 3α (MIP-3α) (CCL20) and MIP-31β (CCL19) by Human Peripheral Blood Neutrophils in Response to Microbial Pathogens." *Infection and Immunity* 71 (1): 524–26. https://doi.org/10.1128/IAI.71.1.524-526.2003.

Akaike, Takaaki, Yoichiro Noguchi, Sumiko Ijiri, Keisuke Setoguchit, Moritaka Sugat, Yong Mu Zhengt, Bernhard Dietzscholdt, et al. 1996. "Pathogenesis of Influenza Virus-Induced Pneumonia: Involvement of Both Nitric Oxide

and Oxygen Radicals." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (6): 2448–53. https://doi.org/10.1073/pnas.93.6.2448.

Akashi, Koichi, David Traver, Toshihiro Miyamoto, and Irving L. Weissman. 2000. "A Clonogenic Common Myeloid Progenitor That Gives Rise to All Myeloid Lineages." *Nature* 404 (6774): 193–97.

Akgul, Cahit, Dale A. Moulding, and Steven W. Edwards. 2001. "Molecular Control of Neutrophil Apoptosis." *FEBS Letters* 487 (3): 318–22. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)02324-3.

Akong-Moore, Kathryn, Ohn A. Chow, Maren von Köckritz-Blickwede, and Victor Nizet. 2012. "Influences of Chloride and Hypochlorite on Neutrophil Extracellular Trap Formation." *PLoS ONE* 7 (8): 1–7. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042984.

Ambruso, Daniel R., Nancy Cusack, and Gail Thurman. 2004. "NADPH Oxidase Activity of Neutrophil Specific Granules: Requirements for Cytosolic Components and Evidence of Assembly during Cell Activation." *Molecular Genetics and Metabolism* 81 (4): 313–21. https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2004.01.009.

Amini, Poorya, Darko Stojkov, Andrea Felser, Christopher B. Jackson, Carolina Courage, André Schaller, Laurent Gelman, et al. 2018. "Neutrophil Extracellular Trap Formation Requires OPA1-Dependent Glycolytic ATP Production." *Nature Communications* 9 (1). https://doi.org/10.1038/s41467-018-05387-y.

Amorim, M. J., E. A. Bruce, E. K. C. Read, A. Foeglein, R. Mahen, A. D. Stuart, and P. Digard. 2011. "A Rab11- and Microtubule-Dependent Mechanism for Cytoplasmic Transport of Influenza A Virus Viral RNA." *Journal of Virology* 85 (9): 4143–56. https://doi.org/10.1128/jvi.02606-10.

Antonov, Alexander S., Galina N. Antonova, David H. Munn, Nahid Mivechi, Rudolf Lucas, John D. Catravas, and Alexander D. Verin. 2011. "AVβ3 Integrin Regulates Macrophage Inflammatory Responses via PI3 Kinase/Akt-Dependent NF-KB Activation." *Journal of Cellular Physiology* 226 (2): 469–76. https://doi.org/10.1002/jcp.22356.

Arai, Hiroshi, David Gordon, Elizabeth G. Nabel, and Gary J. Nabel. 1997. "Gene Transfer of Fas Ligand Induces Tumor Regression in Vivo." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (25): 13862–67. https://doi.org/10.1073/pnas.94.25.13862.

Aratani, Yasuaki. 2018. "Myeloperoxidase: Its Role for Host Defense, Inflammation, and Neutrophil Function." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 640 (November 2017): 47–52. https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.01.004.

Aratani, Yasuaki, Hideki Koyama, Sei-Ichiro Ichiro Nyui, Kazuo Suzuki, Fumiaki Kura, and Nobuyo Maeda. 1999. "Severe Impairment in Early Host Defense against Candida Albicans in Mice Deficient in Myeloperoxidase." *Infection and Immunity* 67 (4): 1828–36. http://iai.asm.org/.

Aratani, Yasuaki, Fumiaki Kura, Haruo Watanabe, Hisayoshi Akagawa, Yukie Takano, Kazuo Suzuki, Nobuyo Maeda, and Hideki Koyama. 2002. "Differential Host Susceptibility to Pulmonary Infections with Bacteria and Fungi

in Mice Deficient in Myeloperoxidase." *The Journal of Infectious Diseases* 182 (4): 1276–79. https://doi.org/10.1086/315843.

Arnon, Tal I., Hagit Achdout, Niva Lieberman, Roi Gazit, Tsufit Gonen-Gross, Gil Katz, Ahuva Bar-Ilan, et al. 2004. "The Mechanisms Controlling the Recognition of Tumor- and Virus-Infected Cells by NKp46." *Blood* 103 (2): 664–72. https://doi.org/10.1182/blood-2003-05-1716.

Askenase, Michael H., Seong-ji Ji Han, Allyson L. Byrd, Denise MoraisdaFonseca, Nicolas Bouladoux, Christoph Wilhelm, Joanne E. Konkel, et al. 2015. "Bone-Marrow-Resident NK Cells Prime Monocytes for Regulatory Function during Infection." *Immunity* 42 (6): 1130–42. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.05.011.

Au-Yeung, Byron B., Sebastian Deindl, Lih-Yun Yun Hsu, Emil H. Palacios, Susan E. Levin, John Kuriyan, and Arthur Weiss. 2009. "The Structure, Regulation, and Function of ZAP-70." *Immunological Reviews* 228 (1): 41–57. https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00753.x.

Azzouz, Louiza, Ahmed Cherry, Magdalena Riedl, Meraj Khan, Fred G. Pluthero, Walter H.A. Kahr, Nades Palaniyar, and Christoph Licht. 2018. "Relative Antibacterial Functions of Complement and NETs: NETs Trap and Complement Effectively Kills Bacteria." *Molecular Immunology* 97 (August 2017): 71–81. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.02.019.

B

Bain, C. C., C. L. Scott, H. Uronen-Hansson, S. Gudjonsson, O. Jansson, O. Grip, M. Guilliams, B. Malissen, W. W. Agace, and A. Mc I. Mowat. 2013. "Resident and Pro-Inflammatory Macrophages in the Colon Represent Alternative Context-Dependent Fates of the Same Ly6C Hi Monocyte Precursors." *Mucosal Immunology* 6 (3): 498–510. https://doi.org/10.1038/mi.2012.89.

Banerjee, Indranil, Yasuyuki Miyake, Samuel Philip Nobs, Christoph Schneider, Peter Horvath, Manfred Kopf, Patrick Matthias, Ari Helenius, and Yohei Yamauchi. 2014. "Influenza A Virus Uses the Aggresome Processing Machinery for Host Cell Entry." *Science* 346 (6208): 473–77. https://doi.org/10.1126/science.1257037.

Bardhan, Kankana, Theodora Anagnostou, and Vassiliki A. Boussiotis. 2016. "The PD1: PD-L1/2 Pathway from Discovery to Clinical Implementation." *Frontiers in Immunology* 7 (DEC). https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00550.

Barthelemy, A., S. Ivanov, J. Fontaine, D. Soulard, H. Bouabe, C. Paget, C. Faveeuw, and F. Trottein. 2017. "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* 10 (2): 460–69. https://doi.org/10.1038/mi.2016.49.

Batlle, Eduard, and Joan Massagué. 2019. "Transforming Growth Factor-β Signaling in Immunity and Cancer." *Immunity* 50 (4): 924–40. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.024.

Baudin, Florence, Isabelle Petit, Winfried Weissenhorn, and Rob W.H. Ruigrok. 2001. “In Vitro Dissection of the Membrane and RNP Binding Activities of Influenza Virus M1 Protein.” *Virology* 281 (1): 102–8. https://doi.org/10.1006/viro.2000.0804.

Baumgarth, N, and A Kelso. 1996. “In Vivo Blockade of Gamma Interferon Affects the Influenza Virus-Induced Humoral and the Local Cellular Immune Response in Lung Tissue.” *Journal of Virology* 70 (7): 4411–18. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.06.027.

Baumgarth, Nicole, Ometa C. Herman, Gina C. Jager, Lorena E. Brown, Leonore A. Herzenberg, and Jianzhu Chen. 2000. “B-1 and b-2 Cell-Derived Immunoglobulin m Antibodies Are Nonredundant Components of the Protective Response to Influenza Virus Infection.” *Journal of Experimental Medicine* 192 (2): 271–80. https://doi.org/10.1084/jem.192.2.271.

Beauvillain, Céline, Pierre Cunin, Andrea Doni, Mari Scotet, Sébastien Jaillon, Marie Line Loiry, Giovanni Magistrelli, et al. 2011. “CCR7 Is Involved in the Migration of Neutrophils to Lymph Nodes.” *Blood* 117 (4): 1196–1204. https://doi.org/10.1182/blood-2009-11-254490.

Beauvillain, Céline, Yves Delneste, Mari Scotet, Audrey Peres, Hugues Gascan, Pierre Guermonprez, Vincenzo Barnaba, and Pascale Jeannin. 2007. “Neutrophils Efficiently Cross-Prime Naive T Cells in Vivo.” *Blood* 110 (8): 2965–73. https://doi.org/10.1182/blood-2006-12-063826.

Becker, E. L., J. C. Kermode, P. H. Naccache, R. Yassin, M. L. Marsh, J. J. Munoz, and R. I. Sha’afi. 1985. “The Inhibition of Neutrophil Granule Enzyme Secretion and Chemotaxis by Pertussis Toxin.” *Journal of Cell Biology* 100 (5): 1641–46. https://doi.org/10.1083/jcb.100.5.1641.

Belisle, S. E., J. R. Tisoncik, M. J. Korth, V. S. Carter, S. C. Proll, D. E. Swayne, M. Pantin-Jackwood, T. M. Tumpey, and M. G. Katze. 2010. “Genomic Profiling of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF-) Receptor and Interleukin-1 Receptor Knockout Mice Reveals a Link between TNF- Signaling and Increased Severity of 1918 Pandemic Influenza Virus Infection.” *Journal of Virology* 84 (24): 12576–88. https://doi.org/10.1128/jvi.01310-10.

Benarafa, Charaf, and Hans Uwe Simon. 2017. “Role of Granule Proteases in the Life and Death of Neutrophils.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 482 (3): 473–81. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.11.086.

Bennouna, Soumaya, Susan K. Bliss, Tyler J. Curiel, and Eric Y. Denkers. 2003a. “Cross-Talk in the Innate Immune System: Neutrophils Instruct Recruitment and Activation of Dendritic Cells during Microbial Infection.” *The Journal of Immunology* 171 (11): 6052–58. https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.11.6052.

———. 2003b. “Cross-Talk in the Innate Immune System: Neutrophils Instruct Recruitment and Activation of Dendritic Cells during Microbial Infection.” *The Journal of Immunology* 171 (11): 6052–58. https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.11.6052.

Bergeron, Yves, Nathalie Ouellet, Anne-Marie Marie Deslauriers, Marie Simard, Martin Olivier, and Michel G. Bergeron. 1998. “Cytokine Kinetics and Other Host Factors in Response to

Pneumococcal Pulmonary Infection in Mice." *Infection and Immunity* 66 (3): 912–22. http://iai.asm.org/.

Beshara, Ranin, Valentin Sencio, Daphnée Soulard, Adeline Barthélémy, Josette Fontaine, Thibault Pinteau, Lucie Deruyter, et al. 2018. "Alteration of Flt3-Ligand-Dependent de Novo Generation of Conventional Dendritic Cells during Influenza Infection Contributes to Respiratory Bacterial Superinfection." *PLoS Pathogens* 14 (10): 1–28. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007360.

Blidberg, Kristin, Lena Palmberg, Barbro Dahlén, Ann Sofie Lantz, and Kjell Larsson. 2012. "Chemokine Release by Neutrophils in Chronic Obstructive Pulmonary Disease." *Innate Immunity* 18 (3): 503–10. https://doi.org/10.1177/1753425911423270.

Bliss, S K, A J Marshall, Y Zhang, and E Y Denkers. 1999. "Human Polymorphonuclear Leukocytes Produce IL-12, TNF-Alpha, and the Chemokines Macrophage-Inflammatory Protein-1 Alpha and -1 Beta in Response to Toxoplasma Gondii Antigens." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 162 (12): 7369–75. https://doi.org/Human polymorphonuclear leukocytes produce IL-12, TNF-, and the chemokines macrophage-inflammatory protein-1 and -1 in response to Toxoplasma gondii antigens.

Bliss, Susan K., Barbara A. Butcher, and Eric Y. Denkers. 2000. "Rapid Recruitment of Neutrophils Containing Prestored IL-12 During Microbial Infection." *The Journal of Immunology* 165 (8): 4515–21. https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.8.4515.

Bo, Lulong, Fei Wang, Jiali Zhu, Jinbao Li, and Xiaoming Deng. 2011. "Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF) and Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF) for Sepsis: A Meta-Analysis." *Critical Care* 15 (1): 1–12. https://doi.org/10.1186/cc10031.

Boeltz, Sebastian, Poorya Amini, Hans Joachim Anders, Felipe Andrade, Rostyslav Bilyy, Simon Chatfield, Iwona Cichon, et al. 2019. "To NET or Not to NET:Current Opinions and State of the Science Regarding the Formation of Neutrophil Extracellular Traps." *Cell Death and Differentiation* 26 (3): 395–408. https://doi.org/10.1038/s41418-018-0261-x.

Bogdan, C. 2001. "Nitric Oxide and the Immune Response - Nature Immunology." *Nature Immunology* 2 (10): 907–16. https://doi.org/10.1038/ni1001-907.

Borregaard, N., L. J. Miller, and T. A. Springer. 1987. "Chemoattractant-Regulated Mobilization of a Novel Intracellular Compartment in Human Neutrophils." *Science* 237 (4819): 1204–6. https://doi.org/10.1126/science.3629236.

Borregaard, Niels. 2010. "Neutrophils, from Marrow to Microbes." *Immunity* 33 (5): 657–70. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.11.011.

Borregaard, Niels, Ole E. Sørensen, and Kim Theilgaard-Mönch. 2007. "Neutrophil Granules: A Library of Innate Immunity Proteins." *Trends in Immunology* 28 (8): 340–45. https://doi.org/10.1016/j.it.2007.06.002.

Bot, A, S Bot, and C A Bona. 1998. "Protective Role of Gamma Interferon during the Recall Response to Influenza Virus." *Journal of Virology* 72 (8): 6637–45.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9658110%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC109853.

Boutaffala, L., M. J.M. Bertrand, C. Remouchamps, G. Seleznik, F. Reisinger, M. Janas, C. Bénézech, et al. 2015. "NIK Promotes Tissue Destruction Independently of the Alternative NF-KB Pathway through TNFR1/RIP1-Induced Apoptosis." *Cell Death and Differentiation* 22 (12): 2020–33. https://doi.org/10.1038/cdd.2015.69.

Bowers, Nathan L., E. Scott Helton, Richard P H Huijbregts, Paul A. Goepfert, Sonya L. Heath, and Zdenek Hel. 2014. "Immune Suppression by Neutrophils in HIV-1 Infection: Role of PD-L1/PD-1 Pathway." *PLoS Pathogens* 10 (3). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003993.

Boxio, Rachel, Carine Bossenmeyer-Pourié, Natacha Steinckwich, Christian Dournon, and Oliver Nüße. 2004. "Mouse Bone Marrow Contains Large Numbers of Functionally Competent Neutrophils." *Journal of Leukocyte Biology* 75 (4): 604–11. https://doi.org/10.1189/jlb.0703340.

Boxio, Rachel, Julien Wartelle, Béatrice Nawrocki-Raby, Brice Lagrange, Laurette Malleret, Timothee Hirche, Clifford Taggart, Yves Pacheco, Gilles Devouassoux, and Abderrazzaq Bentaher. 2016. "Neutrophil Elastase Cleaves Epithelial Cadherin in Acutely Injured Lung Epithelium." *Respiratory Research* 17 (1): 129. https://doi.org/10.1186/s12931-016-0449-x.

Bradfute, Steven B., Timothy A. Graubert, and Margaret A. Goodell. 2005. "Roles of Sca-1 in Hematopoietic Stem/Progenitor Cell Function." *Experimental Hematology* 33 (7): 836–43. https://doi.org/10.1016/j.exphem.2005.04.001.

Brandes, Marlène, Frederick Klauschen, Stefan Kuchen, Ronald N. Germain, and Ronald N. Germain Marlène Brandes, Frederick Klauschen, Stefan Kuchen, Marlène Brandes, Frederick Klauschen, et al. 2013. "A Systems Analysis Identifies a Feedforward Inflammatory Circuit Leading to Lethal Influenza Infection." *Cell* 154 (1): 197–212. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.013.

Brewer, Douglas B. 1994. "Max Schultze and the Living, Moving, Phagocytosing Leucocytes: 1865." *Medical History* 38 (1): 91–101. https://doi.org/10.1017/S0025727300056064.

Brickson, S., L. L. Ji, K. Schell, R. Olabisi, B St Pierre Schneider, T. M. Best, B. St Pierre Schneider, and T. M. Best. 2003. "M1/70 Attenuates Blood-Borne Neutrophil Oxidants, Activation, and Myofiber Damage Following Stretch Injury." *Journal of Applied Physiology* 95 (3): 969–76. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00005.2003.

Brigl, Manfred, Lynn Bry, Sally C. Kent, Jenny E. Gumperz, and Michael B. Brenner. 2003. "Mechanism of CD1d-Restricted Natural Killer T Cell Activation during Microbial Infection." *Nature Immunology* 4 (12): 1230–37. https://doi.org/10.1038/ni1002.

Brinkmann, V. 2004. "Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria." *Science* 303 (5663): 1532–35. https://doi.org/10.1126/science.1092385.

Brinkmann, Volker, and Arturo Zychlinsky. 2012. "Neutrophil Extracellular Traps: Is Immunity

the Second Function of Chromatin?" *The Journal of Cell Biology* 198 (5): 773–83. https://doi.org/10.1083/jcb.201203170.

Brochetta, Cristiana, Francesca Vita, Neeraj Tiwari, Lisa Scandiuzzi, Maria Rosa Soranzo, Claudine Guérin-Marchand, Giuliano Zabucchi, and Ulrich Blank. 2008. "Involvement of Munc18 Isoforms in the Regulation of Granule Exocytosis in Neutrophils." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1783 (10): 1781–91. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.05.023.

Brovkovych, Viktor, Xiao-Pei Pei Gao, Evan Ong, Svitlana Brovkovych, Marie-Luise Luise Brennan, Xiao Su, Stanley L. Hazen, Asrar B. Malik, and Randal A. Skidgel. 2008. "Augmented Inducible Nitric Oxide Synthase Expression and Increased NO Production Reduce Sepsis-Induced Lung Injury and Mortality in Myeloperoxidase-Null Mice." *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 295 (1): L96–103. https://doi.org/10.1152/ajplung.00450.2007.

Bruce, E. A., P. Digard, and A. D. Stuart. 2010. "The Rab11 Pathway Is Required for Influenza A Virus Budding and Filament Formation." *Journal of Virology* 84 (12): 5848–59. https://doi.org/10.1128/jvi.00307-10.

Bruhns, Pierre. 2012. "Properties of Mouse and Human IgG Receptors and Their Contribution to Disease Models." *Blood* 119 (24): 5640–49. https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-380121.

Bugl, Stefanie, Stefan Wirths, Martin R. Müller, Markus P. Radsak, and Hans-Georg Georg Kopp. 2012. "Current Insights into Neutrophil Homeostasis." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1266 (1): 171–78. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06607.x.

Bui, Matthew, Gary Whittaker, and Ari Helenius. 1996. "Effect of M1 Protein and Low PH on Nuclear Transport of Influenza Virus Ribonucleoproteins." *Journal of Virology* 70 (12): 8391–8401. http://jvi.asm.org/.

Byrd-Leotis, Lauren, Richard D. Cummings, and David A. Steinhauer. 2017. "The Interplay between the Host Receptor and Influenza Virus Hemagglutinin and Neuraminidase." *International Journal of Molecular Sciences* 18 (7). https://doi.org/10.3390/ijms18071541.

C

Calder, Lesley J., Sebastian Wasilewski, John A. Berriman, and Peter B. Rosenthal. 2010. "Structural Organization of a Filamentous Influenza A Virus." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (23): 10685–90. https://doi.org/10.1073/pnas.1002123107.

Carlson, Christina M., Elizabeth A. Turpin, Lindsey A. Moser, Kevin B. O'Brien, Troy D. Cline, Jeremy C. Jones, Terrence M. Tumpey, et al. 2010. "Transforming Growth Factor-β: Activation by Neuraminidase and Role in Highly Pathogenic H5N1 Influenza Pathogenesis." *PLoS Pathogens* 6 (10). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001136.

Carmona-Rivera, Carmelo, and Mariana J. Kaplan. 2013. "Low-Density Granulocytes: A Distinct Class of Neutrophils in Systemic Autoimmunity." *Seminars in*

Immunopathology 35 (4): 455–63. https://doi.org/10.1007/s00281-013-0375-7.

Carulli, Giovanni. 1997. "COLONY-STIMULATING FACTOR ADMINISTRATION ON NEUTROPHIL PHENOTYPE AND FUNCTIONS Fe Ta St Ti Fo u Fe Ta St Ti Fo U." *Haematologica* 82: 606–16.

Casanova-Acebes, María, Christophe Pitaval, Linnea A. Weiss, César Nombela-Arrieta, Raphaël Chèvre, Noelia A-González, Yuya Kunisaki, et al. 2013. "Rhythmic Modulation of the Hematopoietic Niche through Neutrophil Clearance." *Cell* 153 (5): 1025–35. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.040.

Casanova-Acebes, Maria, José A. Nicolás-Ávila, Jackson Liang Yao Li, Susana García-Silva, Akhila Balachander, Andrea Rubio-Ponce, Linnea A. Weiss, et al. 2018. "Neutrophils Instruct Homeostatic and Pathological States in Naive Tissues." *The Journal of Experimental Medicine* 215 (11): 2778–95. https://doi.org/10.1084/jem.20181468.

Castanheira, Fernanda V.S. S., and Paul Kubes. 2019. "Neutrophils and NETs in Modulating Acute and Chronic Inflammation." *Blood* 133 (20): 2178–85. https://doi.org/10.1182/blood-2018-11-844530.

Chaix, Julie, Marlowe S Tessmer, Kasper Hoebe, Nicolas Fuséri, Bernhard Ryffel, Marc Dalod, Lena Alexopoulou, et al. 2008. "Priming of Natural Killer Cells by Interleukin-18." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 181 (3): 1627–31. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5154249/.

Chan, M. C.W., C. Y. Cheung, W. H. Chui, G. S.W. Tsao, J. M. Nicholls, Y. O. Chan, R. W.Y. Chan, et al. 2005. "Proinflammatory Cytokine Responses Induced by Influenza A (H5N1) Viruses in Primary Human Alveolar and Bronchial Epithelial Cells." *Respiratory Research* 6 (November): 1–13. https://doi.org/10.1186/1465-9921-6-135.

Chandel, Navdeep S., Wendy C. Trzyna, David S. McClintock, and Paul T. Schumacker. 2000. "Role of Oxidants in NF-KB Activation and TNF-α Gene Transcription Induced by Hypoxia and Endotoxin." *The Journal of Immunology* 165 (2): 1013–21. https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.2.1013.

Channon, Keith M., and T. J. Guzik. 2002. "Mechanisms of Superoxide Production in Human Blood Vessels: Relationship to Endothelial Dysfunction, Clinical and Genetic Risk Factors." *Journal of Physiology and Pharmacology* 53 (4 I): 515–24.

Chen, Feidi, Anthony Cao, Suxia Yao, Heather L. Evans-Marin, Han Liu, Wei Wu, Eric D. Carlsen, et al. 2016. "MTOR Mediates IL-23 Induction of Neutrophil IL-17 and IL-22 Production." *The Journal of Immunology* 196 (10): 4390–99. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501541.

Chen, James Y., Masanori Miyanishi, Sean K. Wang, Satoshi Yamazaki, Rahul Sinha, Kevin S. Kao, Jun Seita, Debashis Sahoo, Hiromitsu Nakauchi, and Irving L. Weissman. 2016. "Hoxb5 Marks Long-Term Haematopoietic Stem Cells and Reveals a Homogenous Perivascular Niche." *Nature* 530 (7589): 223–27. https://doi.org/10.1038/nature16943.

Chen, Kaiwen W., Christina J. Groß, Flor Vásquez Sotomayor, Katryn J. Stacey, Jurg Tschopp, Matthew J. Sweet, and Kate Schroder. 2014. "The Neutrophil NLRC4 Inflammasome

Selectively Promotes IL-1β Maturation without Pyroptosis during Acute Salmonella Challenge." *Cell Reports* 8 (2): 570–82. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.06.028.

Chen, Rubing, and Edward C. Holmes. 2006. "Avian Influenza Virus Exhibits Rapid Evolutionary Dynamics." *Molecular Biology and Evolution* 23 (12): 2336–41. https://doi.org/10.1093/molbev/msl102.

Chen, Yi-Ling, Shun-Hua Chen, Jiu-Yao Wang, and Bei-Chang Yang. 2003. "Fas Ligand on Tumor Cells Mediates Inactivation of Neutrophils." *The Journal of Immunology* 171 (3): 1183–91. https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.3.1183.

Cheng, A. C., D. Limmathurotsakul, W. Chierakul, N. Getchalarat, V. Wuthiekanun, D. P. Stephens, N. P. J. Day, et al. 2007. "A Randomized Controlled Trial of Granulocyte Colony-Stimulating Factor for the Treatment of Severe Sepsis Due to Melioidosis in Thailand." *Clinical Infectious Diseases* 45 (3): 308–14. https://doi.org/10.1086/519261.

Cheng, Sara S., Joyce J. Lai, Nicholas W. Lukacs, and Steven L. Kunkel. 2001. "Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor Up-Regulates CCR1 in Human Neutrophils." *The Journal of Immunology* 166 (2): 1178–84. https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.2.1178.

Cheong, Woo Chang, Hye Ri Kang, Hyunyee Yoon, Suk Jo Kang, Jenny P.Y. Ting, and Moon Jung Song. 2015. "Influenza A Virus NS1 Protein Inhibits the NLRP3 Inflammasome." *PLoS ONE* 10 (5): 1–16. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126456.

Christensen, J. L., and I. L. Weissman. 2002. "Flk-2 Is a Marker in Hematopoietic Stem Cell Differentiation: A Simple Method to Isolate Long-Term Stem Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (25): 14541–46. https://doi.org/10.1073/pnas.261562798.

Christoffersson, Gustaf, Evelina Vågesjö, Jennifer Vandooren, Majken Lidén, Sara Massena, Rachel B Reinert, Marcela Brissova, et al. 2012. "VEGF-A Recruits a Proangiogenic MMP-9-Delivering Neutrophil Subset That Induces Angiogenesis in Transplanted Hypoxic Tissue." *Blood* 120 (23): 4653–62. https://doi.org/10.1182/blood-2012-04-421040.

Chtanova, Tatyana, Marie Schaeffer, Seong Ji Han, Giel G. van Dooren, Marcelo Nollmann, Paul Herzmark, Shiao Wei Chan, et al. 2008. "Dynamics of Neutrophil Migration in Lymph Nodes during Infection." *Immunity* 29 (3): 487–96. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.07.012.

Clarke, Thomas B., Kimberly M. Davis, Elena S. Lysenko, Alice Y. Zhou, Yimin Yu, and Jeffrey N. Weiser. 2010. "Recognition of Peptidoglycan from the Microbiota by Nod1 Enhances Systemic Innate Immunity." *Nature Medicine* 16 (2): 228–31. https://doi.org/10.1038/nm.2087.

Coffelt, Seth B., Kelly Kersten, Chris W. Doornebal, Jorieke Weiden, Kim Vrijland, Cheei Sing Hau, Niels J M Verstegen, et al. 2015. "IL-17-Producing Γδ T Cells and Neutrophils Conspire to Promote Breast Cancer Metastasis." *Nature* 522 (7556): 345–48. https://doi.org/10.1038/nature14282.

Coffelt, Seth B., Max D. Wellenstein, and Karin E. De Visser. 2016. “Neutrophils in Cancer: Neutral No More.” *Nature Reviews Cancer* 16 (7): 431–46. https://doi.org/10.1038/nrc.2016.52.

Colotta, F., F. Re, N. Polentarutti, S. Sozzani, and A. Mantovani. 1992. “Modulation of Granulocyte Survival and Programmed Cell Death by Cytokines and Bacterial Products.” *Blood* 80 (8): 2012–20.

Cortjens, Bart, Sarah A. Ingelse, Job C. Calis, Alexander P. Vlaar, Leo Koenderman, Reinout A. Bem, and Job B. van Woensel. 2017. “Neutrophil Subset Responses in Infants with Severe Viral Respiratory Infection.” *Clinical Immunology* 176 (March): 100–106. https://doi.org/10.1016/j.clim.2016.12.012.

Couper, Kevin N., Daniel G. Blount, and Eleanor M. Riley. 2008. “IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection.” *The Journal of Immunology* 180 (9): 5771–77. https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.9.5771 .

Cowland, Jack B., Anders H. Johnsen, and Niels Borregaard. 1995. “HCAP-18, a Cathelin/pro-Bactenecin-like Protein of Human Neutrophil Specific Granules.” *FEBS Letters* 368 (1): 173–76. https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00634-L.

Croker, Ben A., Joanne A. O’Donnell, Cameron J. Nowell, Donald Metcalf, Grant Dewson, Kirsteen J. Campbell, Kelly L. Rogers, et al. 2011. “Fas-Mediated Neutrophil Apoptosis Is Accelerated by Bid, Bak,and Bax and Inhibited by Bcl-2 and Mcl-1.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (32): 13135–40. https://doi.org/10.1073/pnas.1110358108.

Cullen, Sean P., Colin Adrain, Alexander U. Lüthi, Patrick J. Duriez, and Seamus J. Martin. 2007. “Human and Murine Granzyme B Exhibit Divergent Substrate Preferences.” *Journal of Cell Biology* 176 (4): 435–44. https://doi.org/10.1083/jcb.200612025.

D

Dahl, Richard, Jonathan C. Walsh, David Lancki, Peter Laslo, Sangeeta R. Iyer, Harinder Singh, and M. Celeste Simon. 2003. “Regulation of Macrophage and Neutrophil Cell Fates by the PU.1:C/EBPα Ratio and Granulocyte Colony-Stimulating Factor.” *Nature Immunology* 4 (10): 1029–36. https://doi.org/10.1038/ni973.

Damjanovic, Daniela, Maziar Divangahi, Kapilan Kugathasan, Cherrie Lee Small, Anna Zganiacz, Earl G. Brown, Cory M. Hogaboam, Jack Gauldie, and Zhou Xing. 2011. “Negative Regulation of Lung Inflammation and Immunopathology by TNF-α during Acute Influenza Infection.” *American Journal of Pathology* 179 (6): 2963–76. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.09.003.

Davenport, F. M., and A. V. HENNESSY. 1956. “A SEROLOGIC RECAPITULATION OF PAST EXPERIENCES WITH INFLUENZA A; ANTIBODY RESPONSE TO MONOVALENT VACCINE.” *Journal of Experimental Medicine* 104 (1): 85–97. https://doi.org/10.1084/jem.104.1.85.

Davey, Martin S., Nicola Tamassia, Marzia Rossato, Flavia Bazzoni, Federica Calzetti, Kirsten Bruderek, Marina Sironi, et al. 2011. “Failure to Detect Production of IL-10 by Activated Human Neutrophils.” *Nature Immunology* 12 (11): 1017–18. https://doi.org/10.1038/ni.2111.

Davis, I. C., A. J. Zajac, K. B. Nolte, J. Botten, B. Hjelle,

and S. Matalon. 2002. “Elevated Generation of Reactive Oxygen/Nitrogen Species in Hantavirus Cardiopulmonary Syndrome.” *Journal of Virology* 76 (16): 8347–59. https://doi.org/10.1128/jvi.76.16.8347-8359.2002.

Definition, The Berlin. 2012. “Acute Respiratory Distress Syndrome.” *JAMA* 307 (23). https://doi.org/10.1001/jama.2012.5669.

Delclaux, Christophe, Christophe Delacourt, Marie Pia D’Ortho, V Boyer, Chantal Lafuma, and Alain Harf. 1996. “Role of Gelatinase B and Elastase in Human Polymorphonuclear Neutrophil Migration across Basement Membrane.” *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 14 (3): 288–95. https://doi.org/10.1165/ajrcmb.14.3.8845180.

DeLong, Jonathan H., Aisling O’Hara Hall, Christoph Konradt, Gaia M. Coppock, Jeongho Park, Gretchen Harms Pritchard, and Christopher A. Hunter. 2018. “Cytokine- and TCR-Mediated Regulation of T Cell Expression of Ly6C and Sca-1.” *The Journal of Immunology*, ji1701154. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701154.

Demetri, George D, and James D Griffin. 1991. “Granulocyte Colony-Stimulating Factor and Its Receptor.” *Blood* 78 (11): 2791–2808. www.bloodjournal.org.

Deniset, Justin F., Bas G. Surewaard, Woo Yong Lee, and Paul Kubes. 2017. “Splenic Ly6Ghigh Mature and Ly6Gint Immature Neutrophils Contribute to Eradication of S. Pneumoniae.” *Journal of Experimental Medicine* 214 (5): 1333–50. https://doi.org/10.1084/jem.20161621.

Denney, L., W. Branchett, L. G. Gregory, R. A. Oliver, and C. M. Lloyd. 2018. “Epithelial-Derived TGF-B1 Acts as a pro-Viral Factor in the Lung during Influenza A Infection.” *Mucosal Immunology* 11 (2): 523–35. https://doi.org/10.1038/mi.2017.77.

Deshmukh, Hitesh S, Yuhong Liu, Ogechukwu R Menkiti, Junjie Mei, Ning Dai, Claire E O’Leary, Paula M Oliver, Jay K Kolls, Jeffrey N Weiser, and G Scott Worthen. 2014. “The Microbiota Regulates Neutrophil Homeostasis and Host Resistance to Escherichia Coli K1 Sepsis in Neonatal Mice.” *Nature Medicine* 20 (5): 524–30. https://doi.org/10.1038/nm.3542.

Devi, Sapna, Yilin Wang, Weng Keong Chew, Ronald Lima, Noelia A-González, Citra N.Z. Mattar, Shu Zhen Chong, et al. 2013. “Neutrophil Mobilization via Plerixafor-Mediated CXCR4 Inhibition Arises from Lung Demargination and Blockade of Neutrophil Homing to the Bone Marrow.” *The Journal of Experimental Medicine* 210 (11): 2321–36. https://doi.org/10.1084/jem.20130056.

Dicker, Alison J., Megan L. Crichton, Eleanor G. Pumphrey, Andrew J. Cassidy, Guillermo Suarez-Cuartin, Oriol Sibila, Elizabeth Furrie, et al. 2018. “Neutrophil Extracellular Traps Are Associated with Disease Severity and Microbiota Diversity in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease.” *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 141 (1): 117–27. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.04.022.

Diebold, Sandra S., Tsuneyasu Kaisho, Hiroaki Hemmi, Shizuo Akira, and Caetano Reis E Sousa. 2004. “Innate Antiviral Responses by Means of TLR7-Mediated Recognition of Single-Stranded RNA.” *Science* 303 (5663): 1529–31.

https://doi.org/10.1126/science.1093616.

Dinarello, Charles A. 1999. “Interleukin-18.” *Methods* 19 (1): 121–32. https://doi.org/10.1006/meth.1999.0837.

Djeu, J Y, D Serbousek, and D K Blanchard. 1990. “Release of Tumor Necrosis Factor by Human Polymorphonuclear Leukocytes.” *Blood* 76 (7): 1405–9. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.01594-1.

Dock, Donald S., William L. Kraus, Lockhart B. McGUIRE, John W. Hyland, Florence W. Haynes, and Lewis DEXTER. 1961. “THE PULMONARY BLOOD VOLUME IN MAN.” *Journal of Clinical Investigation* 40 (2): 317–28. https://doi.org/10.1172/JCI104259.

Dockrell, D. H. 2003. “The Multiple Roles of Fas Ligand in the Pathogenesis of Infectious Diseases.” *Clinical Microbiology and Infection* 9 (8): 766–79. https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2003.00669.x.

Dorhoi, Anca, Marco Iannaccone, Maura Farinacci, Kellen C. Faé, Jörg Schreiber, Pedro Moura-Alves, Geraldine Nouailles, et al. 2013. “MicroRNA-223 Controls Susceptibility to Tuberculosis by Regulating Lung Neutrophil Recruitment.” *Journal of Clinical Investigation* 123 (11): 4836–48. https://doi.org/10.1172/JCI67604.

Drannik, Anna G., Mahmoud A. Pouladi, Clinton S. Robbins, Susanna I. Goncharova, Sussan Kianpour, and Martin R. Stämpfli. 2004. “Impact of Cigarette Smoke on Clearance and Inflammation after Pseudomonas Aeruginosa Infection.” *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 170 (11): 1164–71. https://doi.org/10.1164/rccm.200311-1521OC.

Dubois, Julia, Olivier Terrier, and Manuel Rosa-Calatrava. 2014. “Influenza Viruses and MRNA Splicing: Doing More with Less.” Edited by Robert Krug and Peter Palese. *MBio* 5 (3): 1–13. https://doi.org/10.1128/mBio.00070-14.

Dubravec, D. B., D. R. Spriggs, J. A. Mannick, and M. L. Rodrick. 1990. “Circulating Human Peripheral Blood Granulocytes Synthesize and Secrete Tumor Necrosis Factor α.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (17): 6758–61. https://doi.org/10.1073/pnas.87.17.6758.

Dumitru, C. A., M. K. Fechner, T. K. Hoffmann, S. Lang, and S. Brandau. 2012. “A Novel P38-MAPK Signaling Axis Modulates Neutrophil Biology in Head and Neck Cancer.” *Journal of Leukocyte Biology* 91 (4): 591–98. https://doi.org/10.1189/jlb.0411193.

Dumont, F. J., R. G E Palfree, and L. Z. Coker. 1986. “Phenotypic Changes Induced by Interferon in Resting T Cells: Major Enhancement of LY-6 Antigen Expression.” *Journal of Immunology* 137 (1): 201–10.

Dupré-Crochet, Sophie, Marie Erard, and Oliver Nüβe. 2013. “ROS Production in Phagocytes: Why, When, and Where?” *Journal of Leukocyte Biology* 94 (4): 657–70. https://doi.org/10.1189/jlb.1012544.

E

Eash, Kyle J., Adam M. Greenbaum, Priya K. Gopalan, and Daniel C. Link. 2010. “CXCR2 and CXCR4 Antagonistically Regulate Neutrophil Trafficking from Murine Bone Marrow.” *Journal of Clinical Investigation* 120 (7): 2423–31. https://doi.org/10.1172/JCI41649.

Ehrlich, Paul. 1891. “Histologie Und Klinik Des

Blutes." *Royal College of Physicians of Edinburgh (Archive)*.

Eichacker, P. Q., Y. Waisman, C. Natanson, A. Farese, W. D. Hoffman, S. M. Banks, and T. J. MacVittie. 1994. "Cardiopulmonary Effects of Granulocyte Colony-Stimulating Factor in a Canine Model of Bacterial Sepsis." *Journal of Applied Physiology* 77 (5): 2366–73. https://doi.org/10.1152/jappl.1994.77.5.2366 .

Eirik Mollnes, Tom, Ole-Lars Lars Brekke, Michael Fung, Hilde Fure, Dorte Christiansen, Grethe Bergseth, Vibeke Videm, et al. 2002. "Essential Role of the C5a Receptor in E Coli-Induced Oxidative Burst and Phagocytosis Revealed by a Novel Lepirudin-Based Human Whole Blood Model of Inflammation." *Blood* 100 (5): 1869–77. www.bloodjournal.org.

Eisfeld, Amie J., Gabriele Neumann, and Yoshihiro Kawaoka. 2015. "At the Centre: Influenza A Virus Ribonucleoproteins." *Nature Reviews Microbiology* 13 (1): 28–41. https://doi.org/10.1038/nrmicro3367.

Ekman, Anna Karin, and Lars Olaf Cardell. 2010. "The Expression and Function of Nod-like Receptors in Neutrophils." *Immunology* 130 (1): 55–63. https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03212.x.

El-Benna, Jamel, Margarita Hurtado-Nedelec, Viviana Marzaioli, Jean-Claude Marie, Marie-Anne Gougerot-Pocidalo, and Pham My-Chan Dang. 2016. "Priming of the Neutrophil Respiratory Burst: Role in Host Defense and Inflammation." *Immunological Reviews* 273 (1): 180–93. https://doi.org/10.1111/imr.12447.

Ella, Krisztina, Roland Csépányi-Kömi, and Krisztina Káldi. 2016. "Circadian Regulation of Human Peripheral Neutrophils." *Brain, Behavior, and Immunity* 57: 209–21. https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.04.016.

Ellis, Terri N., and Blaine L. Beaman. 2004. "Interferon-γ Activation of Polymorphonuclear Neutrophil Function." *Immunology* 112 (1): 2–12. https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2004.01849.x.

Elsbach, Peter, and Jerrold Weiss. 1998. "Role of the Bactericidal/Permeability-Increasing Protein in Host Defence." *Current Opinion in Immunology* 10 (1): 45–49. https://doi.org/10.1016/S0952-7915(98)80030-7.

Elstak, Edo D., Maaike Neeft, Nadine T. Nehme, Isabelle Callebaut, Geneviève de Saint Basile, and Peter van der Sluijs. 2012. "Munc13-4*rab27 Complex Tethers Secretory Lysosomes at the Plasma Membrane." *Communicative & Integrative Biology* 5 (1): 64–67. https://doi.org/10.4161/cib.18015.

Emal, Diba, Elena Rampanelli, Ingrid Stroo, Loes M. Butter, Gwendoline J. Teske, Nike Claessen, Geurt Stokman, Sandrine Florquin, Jaklien C. Leemans, and Mark C. Dessing. 2017. "Depletion of Gut Microbiota Protects against Renal Ischemia-Reperfusion Injury." *Journal of the American Society of Nephrology* 28 (5): 1450–61. https://doi.org/10.1681/asn.2016030255.

English, Denis. 1996. "Phosphatidic Acid: A Lipid Messenger Involved in Intracellular and Extacellular Signalling." *Cellular Signalling* 8 (5): 341–47. https://doi.org/10.1016/0898-6568(95)00076-3.

Ermolaeva, Maria A., Marie Cécile Michallet, Nikoletta Papadopoulou, Olaf Utermöhlen,

Ksanthi Kranidioti, George Kollias, Jürg Tschopp, and Manolis Pasparakis. 2008. “Function of TRADD in Tumor Necrosis Factor Receptor 1 Signaling and in TRIF-Dependent Inflammatory Responses.” *Nature Immunology* 9 (9): 1037–46. https://doi.org/10.1038/ni.1638.

Evrard, Maximilien, Immanuel W.H. Kwok, Shu Zhen Chong, Karen W.W. Teng, Etienne Becht, Jinmiao Chen, Je Lin Sieow, et al. 2018. “Developmental Analysis of Bone Marrow Neutrophils Reveals Populations Specialized in Expansion, Trafficking, and Effector Functions.” *Immunity* 48 (2): 364-379.e8. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.02.002.

F

Faget, Julien, Gael Boivin, Pierre-Benoit Ancey, Aspasia Gkasti, Julie Mussard, Camilla Engblom, Christina Pfirschke, et al. 2018. “Efficient and Specific Ly6G+ Cell Depletion: A Change in the Current Practices toward More Relevant Functional Analyses of Neutrophils.” *BioRxiv* 18: 498881. https://doi.org/10.1101/498881.

Faress, Shaker Al, Olivier Ferraris, Vincent Moules, Martine Valette, Alan Hay, and Bruno Lina. 2008. “Identification and Characterization of a Late AH1N2 Human Reassortant in France during the 2002-2003 Influenza Season.” *Virus Research* 132 (1–2): 33–41. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.10.007.

Fasano, M. B., S. Cousart, S. Neal, and C. E. McCall. 1991. “Increased Expression of the Interleukin 1 Receptor on Blood Neutrophils of Humans with the Sepsis Syndrome.” *Journal of Clinical Investigation* 88 (5): 1452–59. https://doi.org/10.1172/JCI115454.

Faurschou, Mikkel, Ole E. Sørensen, Anders H. Johnsen, Jon Askaa, and Niels Borregaard. 2002. “Defensin-Rich Granules of Human Neutrophils: Characterization of Secretory Properties.” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1591 (1–3): 29–35. https://doi.org/10.1016/S0167-4889(02)00243-4.

Feuk-Lagerstedt, Elisabeth, Charlotta Movitz, Sara Pellmé, Claes Dahlgren, and Anna Karlsson. 2007. “Lipid Raft Proteome of the Human Neutrophil Azurophil Granule.” *Proteomics* 7 (2): 194–205. https://doi.org/10.1002/pmic.200600482.

Filippo, Katia De, and Sara M. Rankin. 2018. “CXCR4, the Master Regulator of Neutrophil Trafficking in Homeostasis and Disease.” *European Journal of Clinical Investigation* 48 (February). https://doi.org/10.1111/eci.12949.

Finsterbusch, Michaela, Mathieu Benoit Voisin, Martina Beyrau, Timothy John Williams, and Sussan Nourshargh. 2014. “Neutrophils Recruited by Chemoattractants in Vivo Induce Microvascular Plasma Protein Leakage through Secretion of TNF.” *Journal of Experimental Medicine* 211 (7): 1307–14. https://doi.org/10.1084/jem.20132413.

Fitch, W. M., J. M.E. Leiter, X. Li, and P. Palese. 1991. “Positive Darwinian Evolution in Human Influenza A Viruses.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (10): 4270–74. https://doi.org/10.1073/pnas.88.10.4270.

Fitzer-Attas, Cheryl J., Malcolm Lowry, Mary T. Crowley, Alexander J. Finn, Fanying Meng,

Anthony L. DeFranco, Clifford A. Lowel, Clifford A. Lowell, and Clifford A. Lowel. 2000. “Fcγ Receptor–Mediated Phagocytosis in Macrophages Lacking the Src Family Tyrosine Kinases Hck, Fgr, and Lyn.” *The Journal of Experimental Medicine* 191 (4): 669–82. https://doi.org/10.1084/jem.191.4.669.

Flood, Patrick M., Joseph P. Dougherty, and Yacov Row. 1990. “Inhibition of Ly-6A Antigen Expression Prevents T Cell Activation.” *Journal of Experimental Medicine* 172 (1): 115–20. https://doi.org/10.1084/jem.172.1.115.

Fodor, E. 2013. “The RNA Polymerase of Influenza A Virus: Mechanisms of Viral Transcription and Replication.” *Acta Virologica* 57 (02): 113–22. https://doi.org/10.4149/av_2013_02_113.

Fortin, Carl F., Thornin Ear, and Patrick P. McDonald. 2009. “Autocrine Role of Endogenous Interleukin-18 on Inflammatory Cytokine Generation by Human Neutrophils.” *FASEB Journal* 23 (1): 194–203. https://doi.org/10.1096/fj.08-110213.

Freeman, Gordon J., Andrew J. Long, Yoshiko Iwai, Karen Bourque, Tatyana Chernova, Hiroyuki Nishimura, Lori J. Fitz, et al. 2000. “Engagement of the PD-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation.” *Journal of Experimental Medicine* 192 (7): 1027–34. https://doi.org/10.1084/jem.192.7.1027.

Fridlender, Zvi G., Jing Sun, Samuel Kim, Veena Kapoor, Guanjun Cheng, Leona Ling, G. Scott Worthen, and Steven M. Albelda. 2009. “Polarization of Tumor-Associated Neutrophil Phenotype by TGF-β: ‘N1’ versus ‘N2’ TAN.” *Cancer Cell* 16 (3): 183–94. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.06.017.

Fridlender, Zvi G., Jing Sun, Inbal Mishalian, Sunil Singhal, Guanjun Cheng, Veena Kapoor, Wenhwai Horng, et al. 2012. “Transcriptomic Analysis Comparing Tumor-Associated Neutrophils with Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells and Normal Neutrophils.” *PLoS ONE* 7 (2). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031524.

Friedman, Alan D. 2002. “Transcriptional Regulation of Granulocyte and Monocyte Development.” *Oncogene* 21 (21): 3377–90. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205324.

Fritsch, Jürgen, Philipp Zingler, Vinzenz Särchen, Anna Laura Heck, and Stefan Schütze. 2017. “Role of Ubiquitination and Proteolysis in the Regulation of Pro- and Anti-Apoptotic TNF-R1 Signaling.” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1864 (11): 2138–46. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.07.017.

Fujimoto, Ippei, Jiehong Pan, Takenori Takizawa, and Yoshinobu Nakanishi. 2000. “Virus Clearance through Apoptosis-Dependent Phagocytosis of Influenza A Virus-Infected Cells by Macrophages.” *Journal of Virology* 74 (7): 3399–3403. https://doi.org/10.1128/jvi.74.7.3399-3403.2000.

Fujisawa, Haruo, Sumiaki Tsuru, Mariko Taniguchi, Yutaka Zinnaka, and Kikuo Nomoto. 1987. “Protective Mechanisms against Pulmonary Infection with Influenza Virus. I. Relative Contribution of Polymorphonuclear Leukocytes and of Alveolar Macrophages to Protection during the Early Phase of Intranasal

Infection." *Journal of General Virology* 68 (2): 425–32. https://doi.org/10.1099/0022-1317-68-2-425.

Furze, Rebecca C., and Sara M. Rankin. 2008. "Neutrophil Mobilization and Clearance in the Bone Marrow." *Immunology* 125 (3): 281–88. https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.02950.x.

Futosi, Krisztina, Szabina Fodor, and Attila Mócsai. 2013. "Reprint of Neutrophil Cell Surface Receptors and Their Intracellular Signal Transduction Pathways." *International Immunopharmacology* 17 (4): 1185–97. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2013.11.010.

Futosi, Krisztina, Tamás Németh, Robert Pick, Tibor Vántus, Barbara Walzog, Attila Mócsai, T. Nemeth, et al. 2012. "Dasatinib Inhibits Proinflammatory Functions of Mature Human Neutrophils." *Blood* 119 (21): 4981–91. https://doi.org/10.1182/blood-2011-07-369041.

G

Gack, Michaela Ulrike, Randy Allen Albrecht, Tomohiko Urano, Kyung Soo Inn, I. Chueh Huang, Elena Carnero, Michael Farzan, Satoshi Inoue, Jae Ung Jung, and Adolfo García-Sastre. 2009. "Influenza A Virus NS1 Targets the Ubiquitin Ligase TRIM25 to Evade Recognition by the Host Viral RNA Sensor RIG-I." *Cell Host and Microbe* 5 (5): 439–49. https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.04.006.

Gadina, Massimo, Douglas Hilton, James A. Johnston, Akio Morinobu, Arash Lighvani, Yong Jie Zhou, Roberta Visconti, and John J. O'Shea. 2001. "Signaling by Type I and II Cytokine Receptors: Ten Years After." *Current Opinion in Immunology* 13 (3): 363–73. https://doi.org/10.1016/S0952-7915(00)00228-4.

Gallina, Giovanna, Luigi Dolcetti, Paolo Serafini, Carmela De Santo, Ilaria Marigo, Mario P Colombo, Giuseppe Basso, et al. 2006. "Tumors Induce a Subset of Inflammatory Monocytes with Immunosuppressive Activity on CD8+ T Cells." *Journal of Clinical Investigation* 116 (10): 2777–90. https://doi.org/10.1172/JCI28828.

Ganz, T., M. E. Selsted, D. Szklarek, S. S. Harwig, K. Daher, D. F. Bainton, and R. I. Lehrer. 1985. "Defensins. Natural Peptide Antibiotics of Human Neutrophils." *Journal of Clinical Investigation* 76 (4): 1427–35. https://doi.org/10.1172/JCI112120.

Gapin, Laurent. 2016. "Development of Invariant Natural Killer T Cells." *Current Opinion in Immunology* 39 (3): 68–74. https://doi.org/10.1016/j.coi.2016.01.001.

Garcia-Romo, G. S., S. Caielli, B. Vega, J. Connolly, F. Allantaz, Z. Xu, M. Punaro, et al. 2011. "Netting Neutrophils Are Major Inducers of Type I IFN Production in Pediatric Systemic Lupus Erythematosus." *Science Translational Medicine* 3 (73): 73ra20-73ra20. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001201.

Garten, Rebecca J., C. Todd Davis, Colin A. Russell, Bo Shu, Stephen Lindstrom, Amanda Balish, Wendy M. Sessions, et al. 2009. "Antigenic and Genetic Characteristics of Swine-Origin 2009 A(H1N1) Influenza Viruses Circulating in Humans." *Science* 325 (5937): 197–201. https://doi.org/10.1126/science.1176225.

Gazit, Roi, Raizy Gruda, Moran Elboim, Tal I. Arnon,

Gil Katz, Hagit Achdout, Jacob Hanna, et al. 2006. “Lethal Influenza Infection in the Absence of the Natural Killer Cell Receptor Gene Ncr1.” *Nature Immunology* 7 (5): 517–23. https://doi.org/10.1038/ni1322.

Ge, Xiaolong, Chao Ding, Wei Zhao, Lizhi Xu, Hongliang Tian, Jianfeng Gong, Minsheng Zhu, Jieshou Li, and Ning Li. 2017. “Antibiotics-Induced Depletion of Mice Microbiota Induces Changes in Host Serotonin Biosynthesis and Intestinal Motility.” *Journal of Translational Medicine* 15 (1): 1–9. https://doi.org/10.1186/s12967-016-1105-4.

Geijtenbeek, Teunis B.H., and Sonja I. Gringhuis. 2009. “Signalling through C-Type Lectin Receptors: Shaping Immune Responses.” *Nature Reviews Immunology* 9 (7): 465–79. https://doi.org/10.1038/nri2569.

GeurtsvanKessel, Corine H., Monique A.M. Willart, Leonie S. Van Rijt, Femke Muskens, Mirjam Kool, Chantal Baas, Kris Thielemans, et al. 2008. “Clearance of Influenza Virus from the Lung Depends on Migratory Langerin+CD11b- but Not Plasmacytoid Dendritic Cells.” *Journal of Experimental Medicine* 205 (7): 1621–34. https://doi.org/10.1084/jem.20071365.

Ghoreschi, Kamran, Arian Laurence, and John J. O’shea. 2009. “Janus Kinases in Immune Cell Signaling.” *Immunological Reviews* 228 (1): 273–87. https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00754.x.

Gibbert, K., J. F. Schlaak, D. Yang, and U. Dittmer. 2013. “IFN-α Subtypes: Distinct Biological Activities in Anti-Viral Therapy.” *British Journal of Pharmacology* 168 (5): 1048–58. https://doi.org/10.1111/bph.12010.

Gill, James R, Zong-Mei Sheng, Susan F Ely, Donald G Guinee, Mary B Beasley, James Suh, Charuhas Deshpande, et al. 2010. “Pulmonary Pathologic Findings of Fatal 2009 Pandemic Influenza A/H1N1 Viral Infections.” *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 134 (2): 235–43. https://doi.org/10.1043/1543-2165-134.2.235.

Ginzberg, Hedy H., Patrick T. Shannon, Tomoko Suzuki, Ouyang Ouy-Ang Hong, Eric Vachon, Theo Moraes, Maria Teresa Herrera Abreu, et al. 2004. “Leukocyte Elastase Induces Epithelial Apoptosis: Role of Mitochondial Permeability Changes and Akt.” *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 287 (1 50-1): 286–98. https://doi.org/10.1152/ajpgi.00350.2003.

Girbl, Tamara, Tchern Lenn, Lorena Perez, Loïc Rolas, Anna Barkaway, Aude Thiriot, Carlos del Fresno, et al. 2018. “Distinct Compartmentalization of the Chemokines CXCL1 and CXCL2 and the Atypical Receptor ACKR1 Determine Discrete Stages of Neutrophil Diapedesis.” *Immunity* 49 (6): 1062-1076.e6. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.09.018.

Gisbergen, Klaas P J M Van, Marta Sanchez-Hernandez, Teunis B H Geijtenbeek, and Yvette Van Kooyk. 2005. “Neutrophils Mediate Immune Modulation of Dendritic Cells through Glycosylation-Dependent Interactions between Mac-1 and DC-SIGN.” *Journal of Experimental Medicine* 201 (8): 1281–92. https://doi.org/10.1084/jem.20041276.

Glasner, Ariella, Antonija Zurunic, Tal Meningher, Tihana Lenac Rovis, Pinchas Tsukerman, Yotam Bar-On, Rachel Yamin, et al. 2012. “Elucidating the Mechanisms of Influenza Virus Recognition

by Ncr1." *PloS One* 7 (5). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036837.

Glowacka, E., P. Lewkowicz, H. Rotsztejn, and A. Zalewska. 2010. "IL-8, IL-12 and IL-10 Cytokines Generation by Neutrophils, Fibroblasts and Neutrophils- Fibroblasts Interaction in Psoriasis." *Advances in Medical Sciences* 55 (2): 254–60. https://doi.org/10.2478/v10039-010-0037-0.

Godfrey, Dale I., Jérôme Le Nours, Daniel M. Andrews, Adam P. Uldrich, and Jamie Rossjohn. 2018. "Unconventional T Cell Targets for Cancer Immunotherapy." *Immunity* 48 (3): 453–73. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.03.009.

Goffic, Ronan Le, Viviane Balloy, Micheline Lagranderie, Lena Alexopoulou, Nicolas Escriou, Richard Flavell, Michel Chignard, and Mustapha Si-Tahar. 2006. "Detrimental Contribution of the Toll-like Receptor (TLR)3 to Influenza A Virus-Induced Acute Pneumonia." *PLoS Pathogens* 2 (6): 0526–35. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020053.

Goffic, Ronan Le, Julien Pothlichet, Damien Vitour, Takashi Fujita, Eliane Meurs, Michel Chignard, and Mustapha Si-Tahar. 2007. "Cutting Edge: Influenza A Virus Activates TLR3-Dependent Inflammatory and RIG-I-Dependent Antiviral Responses in Human Lung Epithelial Cells." *The Journal of Immunology* 178 (6): 3368–72. https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.6.3368.

Goya, Tomomochi, Motomichi Torisu, Fukashi Doi, and Takeshi Yoshida. 1993. "Effects of Granulocyte Colony Stimulating Factor and Monobactam Antibiotics (Aztreonam) on Neutrophil Functions in Sepsis." *Clinical Immunology and Immunopathology* 69 (3): 278–84. https://doi.org/10.1006/clin.1993.1181.

Graham, Mary Beth, and Thomas J. Braciale. 1997. "Resistance to and Recovery from Lethal Influenza Virus Infection in B Lymphocyte-Deficient Mice." *Journal of Experimental Medicine* 186 (12): 2063–68. https://doi.org/10.1084/jem.186.12.2063.

Graham, Mary Beth, Dyana K. Dalton, David Giltinan, Vivian L. Braciale, Timothy A. Stewart, and Thomas J. Braciale. 1993. "Response to Influenza Infection in Mice with a Targeted Disruption in the Interferon Gamma Gene." *Journal of Experimental Medicine* 178 (5): 1725–32. https://doi.org/10.1084/jem.178.5.1725.

Grassi, Luigi, Farzin Pourfarzad, Sebastian Ullrich, Angelika Merkel, Felipe Were, Enrique Carrillo-de-Santa-Pau, Guoqiang Yi, et al. 2018. "Dynamics of Transcription Regulation in Human Bone Marrow Myeloid Differentiation to Mature Blood Neutrophils." *Cell Reports* 24 (10): 2784–94. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.08.018.

Grassinger, Jochen, David N. Haylock, Melonie J. Storan, Gemma O. Haines, Brenda Williams, Genevieve A. Whitty, Andrew R. Vinson, et al. 2009. "Thrombin-Cleaved Osteopontin Regulates Hemopoietic Stem and Progenitor Cell Functions through Interactions with A9β1and A4β1 Integrins." *Blood* 114 (1): 49–59. https://doi.org/10.1182/blood-2009-01-197988.

Gray, Robert D., Gareth Hardisty, Kate H. Regan, Maeve Smith, Calum T. Robb, Rodger Duffin, Annie MacKellar, et al. 2018. "Delayed Neutrophil Apoptosis Enhances NET Formation in Cystic Fibrosis." *Thorax* 73 (2): 134–44. https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2017-210134.

Gray, Robert D., Christopher D. Lucas, Annie Mackellar, Feng Li, Katia Hiersemenzel, Chris Haslett, Donald J. Davidson, and Adriano G. Rossi. 2013. "Activation of Conventional Protein Kinase C (PKC) Is Critical in the Generation of Human Neutrophil Extracellular Traps." *Journal of Inflammation (United Kingdom)* 10 (1): 1. https://doi.org/10.1186/1476-9255-10-12.

Gregory, V., M. Bennett, M. H. Orkhan, S. Al Hajjar, N. Varsano, E. Mendelson, M. Zambon, J. Ellis, A. Hay, and Y. P. Lin. 2002. "Emergence of Influenza A H1N2 Reassortant Viruses in the Human Population during 2001." *Virology* 300 (1): 1–7. https://doi.org/10.1006/viro.2002.1513.

Guillot, Loïc, Ronan Le Goffic, Sarah Bloch, Nicolas Escriou, Shizuo Akira, Michel Chignard, and Mustapha Si-Tahar. 2005. "Involvement of Toll-like Receptor 3 in the Immune Response of Lung Epithelial Cells to Double-Stranded RNA and Influenza A Virus." *Journal of Biological Chemistry* 280 (7): 5571–80. https://doi.org/10.1074/jbc.M410592200.

Guo, Xi-zhi J. zhi J., and Paul G. Thomas. 2017. "New Fronts Emerge in the Influenza Cytokine Storm." *Seminars in Immunopathology* 39 (5): 541–50. https://doi.org/10.1007/s00281-017-0636-y.

Guo, Yuanji, Xiyan Xu, and Nancy J. Cox. 1992. "Human Influenza A (H1N2) Viruses Isolated from China." *Journal of General Virology* 73 (2): 383–87. https://doi.org/10.1099/0022-1317-73-2-383.

Guyre, P. M., A. S. Campbell, W. D. Kniffin, and M. W. Fanger. 1990. "Monocytes and Polymorphonuclear Neutrophils of Patients with Streptococcal Pharyngitis Express Increased Numbers of Type I IgG Fc Receptors." *Journal of Clinical Investigation* 86 (6): 1892–96. https://doi.org/10.1172/JCI114921.

Guzik, T J, R Korbut, and T ADAMEK-GUZIK. 2003. "NITRIC OXIDE AND SUPEROXIDE IN INFLAMMATION AND IMMUNE REGULATION," 469–87. www.jpp.krakow.pl.

H

Haberstroh, Jörg, Hans Breuer, Ivo Lücke, Kyros Massarrat, Reinhard Früh, Uta Mand, Petra Hagedorn, Leo Brunnberg, and Bernd-U. von Specht. 1995. "EFFECT OF RECOMBINANT HUMAN GRANULOCYTE COLONY-STIMULATING FACTOR ON HEMODYNAMIC AND CYTOKINE RESPONSE IN A PORCINE MODEL OF PSEUDOMONAS SEPSIS." *Shock* 4 (3): 216–24. https://doi.org/10.1097/00024382-199509000-00011.

Hachiya, Osamu, Yuji Takeda, Hiroaki Miyata, Hiroshi Watanabe, Takao Yamashita, and and Fujiro Sendo*. 1995. "Inhibition Spontaneous Neutrophil by Bacterial and Lipopolysaccharide In Vitro Human of Apoptosis Results Retardation by LPS of Spontaneous Neutrophil Apopto- Sis In Vitro We Examined the Effects of LPS on Spontaneous Apoptosis of Human Neutrophils

in Vit" 39 (9): 715–23.

Häger, M., J. B. Cowland, and N. Borregaard. 2010. "Neutrophil Granules in Health and Disease." *Journal of Internal Medicine* 268 (1): 25–34. https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2010.02237.x.

Hale, Benjamin G., Randy A. Albrecht, and Adolfo García-Sastre. 2010. "Innate Immune Evasion Strategies of Influenza Viruses." *Future Microbiology* 5 (1): 23–41. https://doi.org/10.2217/fmb.09.108.

Harfoot, Rhodri, and Richard J. Webby. 2017. "H5 Influenza, a Global Update." *Journal of Microbiology* 55 (3): 196–203. https://doi.org/10.1007/s12275-017-7062-7.

Harris, Audray, Giovanni Cardone, Dennis C. Winkler, J. Bernard Heymann, Matthew Brecher, Judith M. White, and Alasdair C. Steven. 2006. "Influenza Virus Pleiomorphy Characterized by Cryoelectron Tomography." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (50): 19123–27. https://doi.org/10.1073/pnas.0607614103.

Hartshorn, Kevan L., Mitchell R. White, Tesfaldet Tecle, Uffe Holmskov, and Erika C. Crouch. 2006. "Innate Defense against Influenza A Virus: Activity of Human Neutrophil Defensins and Interactions of Defensins with Surfactant Protein D." *The Journal of Immunology* 176 (11): 6962–72. https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.11.6962.

Hasenberg, Anja, Mike Hasenberg, Linda Männ, Franziska Neumann, Lars Borkenstein, Manuel Stecher, Andreas Kraus, et al. 2015. "Catchup: A Mouse Model for Imaging-Based Tracking and Modulation of Neutrophil Granulocytes." *Nature Methods* 12 (5): 445–52. https://doi.org/10.1038/nmeth.3322.

Hashimoto, Yumi, Takeshi Moki, Takenori Takizawa, Akiko Shiratsuchi, and Yoshinobu Nakanishi. 2007. "Evidence for Phagocytosis of Influenza Virus-Infected, Apoptotic Cells by Neutrophils and Macrophages in Mice." *The Journal of Immunology* 178 (4): 2448–57. https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.4.2448.

Hassane, M., D. Demon, D. Soulard, J. Fontaine, L. E. Keller, E. C. Patin, R. Porte, et al. 2017. "Neutrophilic NLRP3 Inflammasome-Dependent IL-1β Secretion Regulates the ΓδT17 Cell Response in Respiratory Bacterial Infections." *Mucosal Immunology* 10 (4): 1056–68. https://doi.org/10.1038/mi.2016.113.

Hassane, Maya, Youenn Jouan, Florent Creusat, Daphnée Soulard, Chloé Boisseau, Loïc Gonzalez, Emmanuel C Patin, et al. 2019. "Interleukin-7 Protects against Bacterial Respiratory Infection by Promoting IL-17A-Producing Innate T-Cell Response." *Mucosal Immunology*, no. September. https://doi.org/10.1038/s41385-019-0212-y.

Hause, Ben M., Mariette Ducatez, Emily A. Collin, Zhiguang Ran, Runxia Liu, Zizhang Sheng, Anibal Armien, et al. 2013. "Isolation of a Novel Swine Influenza Virus from Oklahoma in 2011 Which Is Distantly Related to Human Influenza C Viruses." *PLoS Pathogens* 9 (2). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003176.

Hay, Alan J., Victoria Gregory, Alan R. Douglas, and Pu Lin Yi. 2001. "The Evolution of Human Influenza Viruses." *Philosophical Transactions*

of the Royal Society B: Biological Sciences 356 (1416): 1861–70. https://doi.org/10.1098/rstb.2001.0999.

Hayashi, Fumitaka, Terry K. Means, and Andrew D. Luster. 2003. "Toll-like Receptors Stimulate Human Neutrophil Function." *Blood* 102 (7): 2660–69. https://doi.org/10.1182/blood-2003-04-1078.

Hayden, Frederick G., R. Scott Fritz, Monica C. Lobo, W. Gregory Alvord, Warren Strober, and Stephen E. Straus. 1998. "Local and Systemic Cytokine Responses during Experimental Human Influenza A Virus Infection." *The Journal of Clinical Investigation* 101 (3): 643–49. https://doi.org/10.1001/jama.2009.294.

He, Yuan, Hideki Hara, and Gabriel Núñez. 2016. "Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation." *Trends in Biochemical Sciences* 41 (12): 1012–21. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.09.002.

Helft, Julie, Balaji Manicassamy, Pierre Guermonprez, Daigo Hashimoto, Aymeric Silvin, Judith Agudo, Brian D Brown, et al. 2012. "Cross-Presenting CD103+ Dendritic Cells Are Protected from Influenza Virus Infection." *Journal of Clinical Investigation* 122 (11): 4037–47. https://doi.org/10.1172/JCI60659.

Hemmers, Saskia, John R. Teijaro, Sanja Arandjelovic, and Kerri A. Mowen. 2011. "PAD4-Mediated Neutrophil Extracellular Trap Formation Is Not Required for Immunity against Influenza Infection." *PLoS ONE* 6 (7). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022043.

Henderson, S. Christine, Mihir M. Kamdar, and Anil Bamezai. 2002. " Ly-6A.2 Expression Regulates Antigen-Specific CD4 + T Cell Proliferation and Cytokine Production ." *The Journal of Immunology* 168 (1): 118–26. https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.1.118.

Hermesh, Tamar, Thomas M. Moran, Deepika Jain, and Carolina B. López. 2012. "Granulocyte Colony-Stimulating Factor Protects Mice during Respiratory Virus Infections." *PLoS ONE* 7 (5): 2–9. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037334.

Hewins, P., M. D. Morgan, N. Holden, D. Neil, J. M. Williams, C. O.S. Savage, and L. Harper. 2006. "IL-18 Is Upregulated in the Kidney and Primes Neutrophil Responsiveness in ANCA-Associated Vasculitis." *Kidney International* 69 (3): 605–15. https://doi.org/10.1038/sj.ki.5000167.

Hidalgo, Andrés, Edwin R. Chilvers, Charlotte Summers, and Leo Koenderman. 2019. "The Neutrophil Life Cycle." *Trends in Immunology* 40 (7): 1–14. https://doi.org/10.1016/j.it.2019.04.013.

Hilda, J. Nancy, Meenakshi Narasimhan, and Sulochana D. Das. 2014. "Neutrophils from Pulmonary Tuberculosis Patients Show Augmented Levels of Chemokines MIP-1α, IL-8 and MCP-1 Which Further Increase upon in Vitro Infection with Mycobacterial Strains." *Human Immunology* 75 (8): 914–22. https://doi.org/10.1016/j.humimm.2014.06.020.

Hinshaw, V. S., R. G. Webster, and B. Turner. 1980. "The Perpetuation of Orthomyxoviruses and Paramyxoviruses in Canadian Waterfowl." *Canadian Journal of Microbiology* 26 (5): 622–29. https://doi.org/10.1139/m80-108.

Hintzen, Gabriele, Lars Ohl, Maria-Luisa del Rio, Jose-

Ignacio Rodriguez-Barbosa, Oliver Pabst, Jessica R. Kocks, Janet Krege, Svenja Hardtke, and Reinhold Förster. 2006. “Induction of Tolerance to Innocuous Inhaled Antigen Relies on a CCR7-Dependent Dendritic Cell-Mediated Antigen Transport to the Bronchial Lymph Node.” *The Journal of Immunology* 177 (10): 7346–54. https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.10.7346.

Hirche, Tiro O., Erika C. Crouch, Marcia Espinola, Thomas J. Brokelman, Robert P. Mecham, Nihal DeSilva, Jessica Cooley, Eileen Remold-O’Donnell, and Abderrazzaq Belaaouaj. 2004. “Neutrophil Serine Proteinases Inactivate Surfactant Protein D by Cleaving within a Conserved Subregion of the Carbohydrate Recognition Domain.” *Journal of Biological Chemistry* 279 (26): 27688–98. https://doi.org/10.1074/jbc.M402936200.

Holmes, Christina, and William L. Stanford. 2007. “Concise Review: Stem Cell Antigen-1: Expression, Function, and Enigma.” *Stem Cells* 25 (6): 1339–47. https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0644.

Hommes, Tijmen J., Miriam H. Van Lieshout, Cornelis Van’t Veer, Sandrine Florquin, Hester J. Bootsma, Peter W. Hermans, Alex F. De Vos, and Tom Van Der Poll. 2015. “Role of Nucleotide-Binding Oligomerization Domain-Containing (NOD) 2 in Host Defense during Pneumococcal Pneumonia.” *PLoS ONE* 10 (12): 1–13. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145138.

Hong, Cynthia, Yoko Kidani, Noelia A-Gonzalez, Tram Phung, Ayaka Ito, Xin Rong, Katrin Ericson, et al. 2012. “Coordinate Regulation of Neutrophil Homeostasis by Liver X Receptors in Mice.” *Journal of Clinical Investigation* 122 (1): 337–47. https://doi.org/10.1172/JCI58393.

Hordeaux, Juliette, Yuan Yuan, Peter M. Clark, Qiang Wang, R. Alexander Martino, Joshua J. Sims, Peter Bell, Angela Raymond, William L. Stanford, and James M. Wilson. 2019. “The GPI-Linked Protein LY6A Drives AAV-PHP.B Transport across the Blood-Brain Barrier.” *Molecular Therapy* 27 (5): 912–21. https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.02.013.

Hornick, Emma E., Balaji Banoth, Ann M. Miller, Zeb R. Zacharias, Nidhi Jain, Mary E. Wilson, Katherine N. Gibson-Corley, et al. 2018a. “Nlrp12 Mediates Adverse Neutrophil Recruitment during Influenza Virus Infection.” *The Journal of Immunology* 200 (3): 1188–97. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700999.

———. 2018b. “Nlrp12 Mediates Adverse Neutrophil Recruitment during Influenza Virus Infection.” *The Journal of Immunology* 200 (3): 1188–97. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700999.

Horton, Michael A. 1997. “The Avβ3 Integrin ‘Vitronectin Receptor.’” *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 29 (5): 721–25. https://doi.org/10.1016/S1357-2725(96)00155-0.

Houard, Xavier, Véronique Ollivier, Liliane Louedec, Jean Baptiste Michel, and Magnus Bäck. 2009. “Differential Inflammatory Activity across Human Abdominal Aortic Aneurysms Reveals Neutrophil-Derived Leukotriene B4 as a Major Chemotactic Factor Released from the Intraluminal Thrombus.” *FASEB Journal* 23 (5): 1376–83. https://doi.org/10.1096/fj.08-116202.

Hoving, J. Claire, Gillian J. Wilson, and Gordon D. Brown. 2014. "Signalling C-Type Lectin Receptors, Microbial Recognition and Immunity." *Cellular Microbiology* 16 (2): 185–94. https://doi.org/10.1111/cmi.12249.

Hsu, Hailing, Jianing Huang, Hong-Bing Bing Shu, Vijay Baichwal, and David V. Goeddel. 1996. "TNF-Dependent Recruitment of the Protein Kinase RIP to the TNF Receptor-1 Signaling Complex." *Immunity* 4 (4): 387–96. https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80252-6.

Huang, Fang Fang, Peter F. Barnes, Yan Feng, Ruben Donis, Zissis C. Chroneos, Steven Idell, Timothy Allen, et al. 2011. "GM-CSF in the Lung Protects against Lethal Influenza Infection." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 184 (2): 259–68. https://doi.org/10.1164/rccm.201012-2036OC.

Hufford, Matthew M., Taeg S. Kim, Jie Sun, and Thomas J. Braciale. 2014. "The Effector T Cell Response to Influenza Infection." In *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 386:423–55. Springer Verlag. https://doi.org/10.1007/82_2014_397.

Hufford, Matthew M., Graham Richardson, Haixia Zhou, Balaji Manicassamy, Adolfo García-Sastre, Richard I. Enelow, and Thomas J. Braciale. 2012. "Influenza-Infected Neutrophils within the Infected Lungs Act as Antigen Presenting Cells for Anti-Viral CD8+ T Cells." *PLoS ONE* 7 (10). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046581.

Hui, Wang, Michael Bell, and Graeme Carroll. 1997. "Detection of Oncostatin M in Synovial Fluid from Patients with Rheumatoid Arthritis." *Annals of the Rheumatic Diseases* 56 (3): 184–87. https://doi.org/10.1136/ard.56.3.184.

Hutchinson, Edward C., Philip D. Charles, Svenja S. Hester, Benjamin Thomas, David Trudgian, Mónica Martínez-Alonso, and Ervin Fodor. 2014. "Conserved and Host-Specific Features of Influenza Virion Architecture." *Nature Communications* 5 (May). https://doi.org/10.1038/ncomms5816.

Hutchinson, Edward C., and Yohei Yamauchi. 2018. "Understanding Influenza." *Methods in Molecular Biology* 1836: 1–21. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8678-1_1.

Hyun, Kyung Kim, Maria De La Luz Sierra, Cassin Kimmel Williams, A. Virginia Gulino, Giovanna Tosato, and H. K. Kim. 2006. "G-CSF down-Regulation of CXCR4 Expression Identified as a Mechanism for Mobilization of Myeloid Cells." *Blood* 108 (3): 812–20. https://doi.org/10.1182/blood-2005-10-4162.

I

Ioannidis, Lisa J., Catherine Q. Nie, Ann Ly, Victoria Ryg-Cornejo, Chris Y. Chiu, and Diana S. Hansen. 2016. "Monocyte- and Neutrophil-Derived CXCL10 Impairs Efficient Control of Blood-Stage Malaria Infection and Promotes Severe Disease." *The Journal of Immunology* 196 (3): 1227–38. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501562.

Ischiropoulos, Harry, and Abu B. Al-Mehdi. 1995. "Peroxynitrite-Mediated Oxidative Protein Modifications." *FEBS Letters* 364 (3): 279–82. https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00307-U.

Ito, Caryn Y., Carol Y J Li, Alan Bernstein, John E. Dick, and William L. Stanford. 2003. "Hematopoietic Stem Cell and Progenitor Defects in Sca-1/Ly-6A-Null Mice." *Blood* 101 (2): 517–23. https://doi.org/10.1182/blood-2002-06-1918.

Ito, Toshihiro, † J Nelson, S S Couceiro, Sørge Kelm, Linda G Baum, Scott Krauss, Maria R Castrucci, et al. 1998. "Molecular Basis for the Generation in Pigs of Influenza A Viruses with Pandemic Potential." *Journal of Virology* 72 (9): 7367–73. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9696833%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC109961.

Iuliano, A. Danielle, Katherine M. Roguski, Howard H. Chang, David J. Muscatello, Rakhee Palekar, Stefano Tempia, Cheryl Cohen, et al. 2018. "Estimates of Global Seasonal Influenza-Associated Respiratory Mortality: A Modelling Study." *The Lancet* 391 (10127): 1285–1300. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)33293-2.

Iyoda, Takuya, Kisaburo Nagata, Makoto Akashi, and Yoshiro Kobayashi. 2005. "Neutrophils Accelerate Macrophage-Mediated Digestion of Apoptotic Cells In Vivo as Well as In Vitro." *The Journal of Immunology* 175 (6): 3475–83. https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.6.3475.

J

Jegaskanda, Sinthujan, Kirsten Vandenberg, Karen L. Laurie, Liyen Loh, Marit Kramski, Wendy R. Winnall, Katherine Kedzierska, Steven Rockman, and Stephen J. Kent. 2014. "Cross-Reactive Influenza-Specific Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Intravenous Immunoglobulin as a Potential Therapeutic against Emerging Influenza Viruses." *Journal of Infectious Diseases* 210 (11): 1811–22. https://doi.org/10.1093/infdis/jiu334.

Jenne, Craig N., Connie H.Y. Wong, Franz J. Zemp, Braedon McDonald, Masmudur M. Rahman, Peter A. Forsyth, Grant McFadden, and Paul Kubes. 2013. "Neutrophils Recruited to Sites of Infection Protect from Virus Challenge by Releasing Neutrophil Extracellular Traps." *Cell Host and Microbe* 13 (2): 169–80. https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.01.005.

Jilma, Bernd, N. Hergovich, P. Stohlawetz, H.-G G. Eichler, P. Bauer, and O. F. Wagner. 1999. "Circadian Variation of Granulocyte Colony Stimulating Factor Levels in Man." *British Journal of Haematology* 106 (2): 368–70. https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1999.01543.x.

Jo, Eun-Kyeong Kyeong, Jin Kyung Kim, Dong-Min Min Shin, and Chihiro Sasakawa. 2016. "Molecular Mechanisms Regulating NLRP3 Inflammasome Activation." *Cellular and Molecular Immunology* 13 (2): 148–59. https://doi.org/10.1038/cmi.2015.95.

Jong, Menno D de, Cameron P Simmons, Tran Tan Thanh, Vo Minh Hien, Gavin J D Smith, Tran Nguyen Bich Chau, Dang Minh Hoang, et al. 2006. "Fatal Outcome of Human Influenza A (H5N1) Is Associated with High Viral Load and Hypercytokinemia." *Nature Medicine* 12 (10): 1203–7. https://doi.org/10.1038/nm1477.

K

Kägi, David, Birgit Ledermann, Kurt Bürki, Peter Seiler, Bernhard Odermatt, Kristin J. Olsen, Eckhard R. Podack, Rolf M. Zinkernagel, and Hans Hengartner. 1994. "Cytotoxicity

Mediated by T Cells and Natural Killer Cells Is Greatly Impaired in Perforin-Deficient Mice." *Nature* 369 (6475): 31–37. https://doi.org/10.1038/369031a0.

Kaiser, L., R. S. Fritz, S. E. Straus, L. Gubareva, and F. G. Hayden. 2001. "Symptom Pathogenesis during Acute Influenza: Interleukin-6 and Other Cytokine Responses." *Journal of Medical Virology* 64 (3): 262–68. https://doi.org/10.1002/jmv.1045.

Kaiserman, Dion, Catherina H. Bird, Jiuru Sun, Antony Matthews, Kheng Ung, James C. Whisstock, Philip E. Thompson, Joseph A. Trapani, and Phillip I. Bird. 2006. "The Major Human and Mouse Granzymes Are Structurally and Functionally Divergent." *Journal of Cell Biology* 175 (4): 619–30. https://doi.org/10.1083/jcb.200606073.

Kamohara, Hidenobu, Wataru Matsuyama, Osamu Shimozato, Koichiro Abe, Carole Galligan, Shin-Ichi Hashimoto, Kouji Matsushima, and Teizo Yoshimura. 2004. "Regulation of Tumour Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) and TRAIL Receptor Expression in Human Neutrophils." *Immunology* 111 (2): 186–94. https://doi.org/10.1111/j.0019-2805.2003.01794.x.

Kang, Jong Seok, Cheng Liu, and Rik Derynck. 2009. "New Regulatory Mechanisms of TGF-β Receptor Function." *Trends in Cell Biology* 19 (8): 385–94. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2009.05.008.

Karin, Michael, and Anning Lin. 2002. "NF-KB at the Crossroads of Life and Death." *Nature Immunology* 3 (3): 221–27. https://doi.org/10.1038/ni0302-221.

Kasten, Kevin R., Jared T. Muenzer, and Charles C. Caldwell. 2010. "Neutrophils Are Significant Producers of IL-10 during Sepsis." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 393 (1): 28–31. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.01.066.

Katayama, Yoshio, Michela Battista, Wei Ming Kao, Andrés Hidalgo, Anna J. Peired, Steven A. Thomas, and Paul S. Frenette. 2006. "Signals from the Sympathetic Nervous System Regulate Hematopoietic Stem Cell Egress from Bone Marrow." *Cell* 124 (2): 407–21. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.041.

Kawagoe, Tatsukata, Shintaro Sato, Kazufumi Matsushita, Hiroki Kato, Kosuke Matsui, Yutaro Kumagai, Tatsuya Saitoh, Taro Kawai, Osamu Takeuchi, and Shizuo Akira. 2008. "Sequential Control of Toll-like Receptor-Dependent Responses by IRAK1 and IRAK2." *Nature Immunology* 9 (6): 684–91. https://doi.org/10.1038/ni.1606.

Kawai, Taro, Ken Takahashi, Shintaro Sato, Cevayir Coban, Himanshu Kumar, Hiroki Kato, Ken J. Ishii, Osamu Takeuchi, and Shizuo Akira. 2005. "IPS-1, an Adaptor Triggering RIG-I- and Mda5-Mediated Type I Interferon Induction." *Nature Immunology* 6 (10): 981–88. https://doi.org/10.1038/ni1243.

Kawano, Yuko, Chie Fukui, Masakazu Shinohara, Kanako Wakahashi, Shinichi Ishii, Tomohide Suzuki, Mari Sato, et al. 2016. " G-CSF-Induced Sympathetic Tone Provokes Fever and Primes Antimobilizing Functions of Neutrophils via PGE 2 ." *Blood* 129 (5): 587–97. https://doi.org/10.1182/blood-2016-07-725754.

Kawaoka, Yoshihiro, Scott Krauss, and Robert G Webster. 1989. "Avian-to-Human

Transmission of the PB1 Gene of Influenza A Viruses in the 1957 and 1968 Pandemics." *Journal of Virology* 63 (11): 4603–8. http://jvi.asm.org/.

Kaynar, A. Murat, A. Mc Garry Houghton, Esther H. Lum, Bruce R. Pitt, and Steven D. Shapiro. 2008. "Neutrophil Elastase Is Needed for Neutrophil Emigration into Lungs in Ventilator-Induced Lung Injury." *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 39 (1): 53–60. https://doi.org/10.1165/rcmb.2007-0315OC.

Kellner, Manuela, Satish Noonepalle, Qing Lu, Anup Srivastava, Evgeny Zemskov, and Stephen M. Black. 2017. "ROS Signaling in the Pathogenesis of Acute Lung Injury (ALI) and Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS)." In *Adv Exp Med Biol*, edited by Yong-Xiao Wang, 967:105–37. Advances in Experimental Medicine and Biology. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-63245-2_8.

Kelly, Aoife, Stephanie A. Houston, Eleanor Sherwood, Joshua Casulli, and Mark A. Travis. 2017. "Regulation of Innate and Adaptive Immunity by TGFβ." *Advances in Immunology* 134: 137–233. https://doi.org/10.1016/bs.ai.2017.01.001.

Khuda Dad Khan, K. Shuai, G. Lindwall, S. E. Maher, J. E. Darnell, and A. L.M. Bothwell. 1993. "Induction of the Ly-6A/E Gene by Interferon α/β and γ Requires a DNA Element to Which a Tyrosine-Phosphorylated 91-KDa Protein Binds." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (14): 6806–10.

Kiel, Mark J., Ömer H. Yilmaz, Toshihide Iwashita, Osman H. Yilmaz, Cox Terhorst, and Sean J. Morrison. 2005. "SLAM Family Receptors Distinguish Hematopoietic Stem and Progenitor Cells and Reveal Endothelial Niches for Stem Cells." *Cell* 121 (7): 1109–21. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.05.026.

Kilpatrick, Laurie E., Shuang Sun, DeMauri Mackie, Fred Baik, Haiying Li, and Helen M. Korchak. 2006. "Regulation of TNF Mediated Antiapoptotic Signaling in Human Neutrophils: Role of δ-PKC and ERK1/2." *Journal of Leukocyte Biology* 80 (6): 1512–21. https://doi.org/10.1189/jlb.0406284.

Kim, Chaekyun, and Mary C. Dinauer. 2001. "Rac2 Is an Essential Regulator of Neutrophil Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase Activation in Response to Specific Signaling Pathways." *The Journal of Immunology* 166 (2): 1223–32. https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.2.1223.

Kim, Taeg S., and Thomas J. Braciale. 2009. "Respiratory Dendritic Cell Subsets Differ in Their Capacity to Support the Induction of Virus-Specific Cytotoxic CD8+ T Cell Responses." *PLoS ONE* 4 (1). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004204.

Kirkegaard, Karla, Matthew D. Pauly, Megan C. Procario, Adam S. Lauring, Karla Kirkegaard, Matthew D. Pauly, Megan C. Procario, and Adam S. Lauring. 2017. "A Novel Twelve Class Fluctuation Test Reveals Higher than Expected Mutation Rates for Influenza A Viruses." *ELife* 6: 1–18. https://doi.org/10.7554/eLife.26437.

Klein, Eili Y., Bradley Monteforte, Alisha Gupta,

Wendi Jiang, Larissa May, Yu Hsiang Hsieh, and Andrea Dugas. 2016. “The Frequency of Influenza and Bacterial Coinfection: A Systematic Review and Meta-Analysis.” *Influenza and Other Respiratory Viruses* 10 (5): 394–403. https://doi.org/10.1111/irv.12398.

Klemke, Martin, Guido H. Wabnitz, Faustina Funke, Beate Funk, Henning Kirchgessner, and Yvonne Samstag. 2008. “Oxidation of Cofilin Mediates T Cell Hyporesponsiveness under Oxidative Stress Conditions.” *Immunity* 29 (3): 404–13. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.06.016.

Kok, Wai Ling, Laura Denney, Kambez Benam, Suzanne Cole, Colin Clelland, Andrew J. McMichael, and Ling-Pei Ho. 2012. “Pivotal Advance: Invariant NKT Cells Reduce Accumulation of Inflammatory Monocytes in the Lungs and Decrease Immune-Pathology during Severe Influenza A Virus Infection.” *Journal of Leukocyte Biology* 91 (3): 357–68. https://doi.org/10.1189/jlb.0411184.

Kolaczkowska, Elzbieta, Magdalena Chadzinska, Anna Scislowska-Czarnecka, Barbara Plytycz, Ghislain Opdenakker, and Bernd Arnold. 2006. “Gelatinase B/Matrix Metalloproteinase-9 Contributes to Cellular Infiltration in a Murine Model of Zymosan Peritonitis.” *Immunobiology* 211 (3): 137–48. https://doi.org/10.1016/j.imbio.2005.08.004.

Kolaczkowska, Elzbieta, Weronika Grzybek, Nico van Rooijen, Helene Piccard, Barbara Plytycz, Bernd Arnold, and Ghislain Opdenakker. 2009. “Neutrophil Elastase Activity Compensates for a Genetic Lack of Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) in Leukocyte Infiltration in a Model of Experimental Peritonitis.” *Journal of Leukocyte Biology* 85 (3): 374–81. https://doi.org/10.1189/jlb.0808460.

Kolaczkowska, Elzbieta, Craig N. Jenne, Bas G.J. Surewaard, Ajitha Thanabalasuriar, Woo Yong Lee, Maria Jesus Sanz, Kerri Mowen, Ghislain Opdenakker, and Paul Kubes. 2015. “Molecular Mechanisms of NET Formation and Degradation Revealed by Intravital Imaging in the Liver Vasculature.” *Nature Communications* 6: 1–13. https://doi.org/10.1038/ncomms7673.

Kolaczkowska, Elzbieta, and Paul Kubes. 2013. “Neutrophil Recruitment and Function in Health and Inflammation.” *Nature Reviews. Immunology* 13 (3): 159–75. https://doi.org/10.1038/nri3399.

Kondo, Motonari, Irving L. Weissman, and Koichi Akashi. 1997. “Identification of Clonogenic Common Lymphoid Progenitors in Mouse Bone Marrow.” *Cell* 91 (5): 661–72. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80453-5.

Kopf, Manfred, Frank Brombacher, and Martin F. Bachmann. 2002. “Role of IgM Antibodies versus B Cells in Influenza Virus-Specific Immunity.” *European Journal of Immunology* 32 (8): 2229–36. https://doi.org/10.1002/1521-4141(200208)32:8<2229::AID-IMMU2229>3.0.CO;2-T.

Kowanetz, Marcin, Xiumin Wu, John Lee, Martha Tan, Thijs Hagenbeek, Xueping Qu, Lanlan Yu, et al. 2010. “Granulocyte-Colony Stimulating Factor Promotes Lung Metastasis through Mobilization of Ly6G+Ly6C+ Granulocytes.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (50): 21248–55.

https://doi.org/10.1073/pnas.1015855107.

Kremserova, Silvie, and William M. Nauseef. 2018. “Staphylococcus Aureus Promotes Receptor-interacting Protein Kinase 3- and Protease-dependent Production of IL-1β in Human Neutrophils.” *Journal of Leukocyte Biology* 105 (3): JLB.4HI0918-346R. https://doi.org/10.1002/JLB.4HI0918-346R.

Kulkarni, Suhasini, Cassian Sitaru, Zoltan Jakus, Karen E. Anderson, George Damoulakis, Keith Davidson, Misa Hirose, et al. 2011. “PI3Kβ Plays a Critical Role in Neutrophil Activation by Immune Complexes.” *Science Signaling* 4 (168): 1–12. https://doi.org/10.1126/scisignal.2001617.

Kumagai, Yutaro, Osamu Takeuchi, Hiroki Kato, Himanshu Kumar, Kosuke Matsui, Eiichi Morii, Katsuyuki Aozasa, Taro Kawai, and Shizuo Akira. 2007. “Alveolar Macrophages Are the Primary Interferon-α Producer in Pulmonary Infection with RNA Viruses.” *Immunity* 27 (2): 240–52. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.07.013.

Kutter, D., P. Devaquet, G. Vanderstocken, J.M. M Paulus, V. Marchal, and A. Gothot. 2000. “Consequences of Total and Subtotal Myeloperoxidase Deficiency: Risk or Benefit ?” *Acta Haematologica* 104 (1): 10–15. https://doi.org/10.1159/000041062.

L

Lakadamyali, Melike, Michael J. Rust, Hazen P. Babcock, and Xaowei Zhuang. 2003. “Visualizing Infection of Individual Influenza Viruses.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (16): 9280–85. https://doi.org/10.1073/pnas.0832269100.

Lande, Roberto, Dipyaman Ganguly, Valeria Facchinetti, Loredana Frasca, Curdin Conrad, Josh Gregorio, Stephan Meller, et al. 2011. “Neutrophils Activate Plasmacytoid Dendritic Cells by Releasing Self-DNA-Peptide Complexes in Systemic Lupus Erythematosus.” *Science Translational Medicine* 3 (73). https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001180.

Lang, Melissa A., Sultan A. Jenkins, Phillip Balzano, Adeyinka Owoyelejj, Akshay Patel, and Anil K. Bamezai. 2017. “Engaging Ly-6A/Sca-1 Triggers Lipid Raft-Dependent and -Independent Responses in CD4+ T-Cell Lines.” *Immunity Inflammation and Disease* 5 (4): 448–60. https://doi.org/10.1002/iid3.182.

Lecot, Pacôme, Matthieu Sarabi, Manuela Pereira Abrantes, Julie Mussard, Leo Koenderman, Christophe Caux, Nathalie Bendriss-Vermare, and Marie-Cécile Michallet. 2019. “Neutrophil Heterogeneity in Cancer: From Biology to Therapies.” *Frontiers in Immunology* 10 (September): 1–19. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02155.

Lee, Byung O., Javier Rangel-Moreno, Juan E. Moyron-Quiroz, Louise Hartson, Melissa Makris, Frank Sprague, Frances E. Lund, and Troy D. Randall. 2005. “CD4 T Cell-Independent Antibody Response Promotes Resolution of Primary Influenza Infection and Helps to Prevent Reinfection.” *The Journal of Immunology* 175 (9): 5827–38. https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.9.5827.

Legge, Kevin L., and Thomas J. Braciale. 2003.

"Accelerated Migration of Respiratory Dendritic Cells to the Regional Lymph Nodes Is Limited to the Early Phase of Pulmonary Infection." *Immunity* 18 (2): 265–77. https://doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00023-2.

Leliefeld, Pieter H.C., Leo Koenderman, and Janesh Pillay. 2015. "How Neutrophils Shape Adaptive Immune Responses." *Frontiers in Immunology* 6 (SEP): 1–8. https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00471.

Lessler, Justin, Steven Riley, Jonathan M. Read, Shuying Wang, Huachen Zhu, Gavin J.D. Smith, Yi Guan, Chao Qiang Jiang, and Derek A.T. Cummings. 2012. "Evidence for Antigenic Seniority in Influenza A (H3N2) Antibody Responses in Southern China." *PLoS Pathogens* 8 (7): 26. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002802.

Levin, Roni, Sergio Grinstein, and Johnathan Canton. 2016. "The Life Cycle of Phagosomes: Formation, Maturation, and Resolution." *Immunological Reviews* 273 (1): 156–79. https://doi.org/10.1111/imr.12439.

Ley, Klaus, Emily Smith, and Matthew A. Stark. 2006. "IL-17A-Producing Neutrophil-Regulatory Tn Lymphocytes." *Immunologic Research* 34 (3): 229–42. https://doi.org/10.1385/IR:34:3:229.

Li, Haitao, Xiaoting Zhou, Hongyi Tan, Yongbin Hu, Lemeng Zhang, Shuai Liu, Minhui Dai, et al. 2018. "Neutrophil Extracellular Traps Contribute to the Pathogenesis of Acid-Aspiration-Induced ALI/ARDS." *Oncotarget* 9 (2): 1772–84. https://doi.org/10.18632/oncotarget.22744.

Li, Wen Chen, Shin Ru Shih, Yhu Chering Huang, Guang Wu Chen, Shih Cheng Chang, Mei Jen Hsiao, Kuo Chien Tsao, and Tzou Yien Lin. 2008. "Clinical and Genetic Characterization of Severe Influenza B-Associated Diseases during an Outbreak in Taiwan." *Journal of Clinical Virology* 42 (1): 45–51. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2007.11.026.

Li, YONGZHONG, ZHONG-YING Chen, WEIRONG Wang, Carl C. BAKER, and ROBERT M. Krug. 2001. "The 3'-End-Processing Factor CPSF Is Required for the Splicing of Single-Intron Pre-MRNAs in Vivo." *RNA* 7 (6): S1355838201010226. https://doi.org/10.1017/S1355838201010226.

Lim, Kihong, Y.-M. Young Min Hyun, Kris Lambert-Emo, Tara Capece, Seyeon Bae, Richard Miller, David J. Topham, and Minsoo Kim. 2015. "Neutrophil Trails Guide Influenza-Specific CD8+ T Cells in the Airways." *Science* 349 (6252): aaa4352–aaa4352. https://doi.org/10.1126/science.aaa4352.

Lindau, Dennis, Viktoria Rönnefarth, Annika Erbacher, Hans Georg Rammensee, and Patrice Decker. 2011. "Nucleosome-Induced Neutrophil Activation Occurs Independently of TLR9 and Endosomal Acidification: Implications for Systemic Lupus Erythematosus." *European Journal of Immunology* 41 (3): 669–81. https://doi.org/10.1002/eji.201040593.

Liu, Jinping, Zhiqiang Pang, Guoqiang Wang, Xuewa Guan, Keyong Fang, Ziyan Wang, and Fang Wang. 2017. "Advanced Role of Neutrophils in Common Respiratory Diseases." *Journal of Immunology Research* 2017: 1–21. https://doi.org/10.1155/2017/6710278.

Liu, Lu, and Bingwei Sun. 2019. “Neutrophil Pyroptosis: New Perspectives on Sepsis.” *Cellular and Molecular Life Sciences*, no. 0123456789. https://doi.org/10.1007/s00018-019-03060-1.

Liu, Mingyong, Jianhua Zhao, Keqiang Chen, Xiuwu Bian, Chunyan Wang, Ying Shi, and Ji Ming Wang. 2012. “G Protein-Coupled Receptor FPR1 as a Pharmacologic Target in Inflammation and Human Glioblastoma.” *International Immunopharmacology* 14 (3): 283–88. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2012.07.015.

Liu, Qiang, Yuan Hong Zhou, and Zhan Qiu Yang. 2016. “The Cytokine Storm of Severe Influenza and Development of Immunomodulatory Therapy.” *Cellular and Molecular Immunology* 13 (1): 3–10. https://doi.org/10.1038/cmi.2015.74.

Liu, Yong-Jun -J, Jun Zhang, Peter J.L. Lane, Eric Y.-T Chan, and Ian C.M. Maclennan. 1991. “Sites of Specific B Cell Activation in Primary and Secondary Responses to T Cell-dependent and T Cell-independent Antigens.” *European Journal of Immunology* 21 (12): 2951–62. https://doi.org/10.1002/eji.1830211209.

Lomas-Neira, Joanne, Sean F. Monaghan, Xin Huang, Eleanor A. Fallon, Chun-Shiang Shiang Chung, and Alfred Ayala. 2018. “Novel Role for PD-1:PD-L1 as Mediator of Pulmonary Vascular Endothelial Cell Functions in Pathogenesis of Indirect ARDS in Mice.” *Frontiers in Immunology* 9 (December): 1–13. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03030.

Loughner, Chelsea L., Elspeth A. Bruford, Monica S. McAndrews, Emili E. Delp, Sudha Shivalingappa K. Swamynathan, and Sudha Shivalingappa K. Swamynathan. 2016. “Organization, Evolution and Functions of the Human and Mouse Ly6/UPAR Family Genes.” *Human Genomics* 10 (April): 10. https://doi.org/10.1186/s40246-016-0074-2.

Luo, Qing, Zikun Huang, Jianqing Ye, Yating Deng, Le Fang, Xue Li, Yang Guo, et al. 2016. “PD-L1-Expressing Neutrophils as a Novel Indicator to Assess Disease Activity and Severity of Systemic Lupus Erythematosus.” *Arthritis Research and Therapy* 18 (1): 1–11. https://doi.org/10.1186/s13075-016-0942-0.

M

Ma, Qing, Dan Jones, Paul R. Borghesani, Rosalind A. Segal, Takashi Nagasawa, Tadamitsu Kishimoto, Roderick T. Bronson, and Timothy A. Springer. 1998. “Impaired B-Lymphopoiesis, Myelopoiesis, and Derailed Cerebellar Neuron Migration in CXCR4- and SDF-1-Deficient Mice.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (16): 9448–53. https://doi.org/10.1073/pnas.95.16.9448.

Ma, W., D. Brenner, Z. Wang, B. Dauber, C. Ehrhardt, K. Hogner, S. Herold, et al. 2010. “The NS Segment of an H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus (HPAIV) Is Sufficient To Alter Replication Efficiency, Cell Tropism, and Host Range of an H7N1 HPAIV.” *Journal of Virology* 84 (4): 2122–33. https://doi.org/10.1128/jvi.01668-09.

Ma, Xiaoqian, Kam-Wing Wing Ling, and Elaine Dzierzak. 2001. “Cloning of the Ly-6A (Sca-1) Gene Locus and Identification of a 3’ Distal Fragment Responsible for High-Level γ-Interferon-Induced Expression in Vitro.” *British Journal of Haematology* 114 (3): 724–30. https://doi.org/10.1046/j.1365-

2141.2001.02986.x.

Maeda, H., and Takaaki Akaike. 1991. “Oxygen Free Radicals as Pathogenic Molecules in Viral Diseases.” *Experimental Biology and Medicine* 198 (2): 721–27. https://doi.org/10.3181/00379727-198-43309C.

Malachowa, Natalia, Scott D. Kobayashi, Mark T. Quinn, and Frank R. DeLeo. 2016. “NET Confusion.” *Frontiers in Immunology* 7 (JUN): 1–10. https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00259.

Man, Si Ming, and Thirumala Devi Kanneganti. 2015. “Regulation of Inflammasome Activation.” *Immunological Reviews* 265 (1): 6–21. https://doi.org/10.1111/imr.12296.

Mandelboim, Ofer, Niva Lieberman, Marianna Lev, Lada Paul, Tal I. Arnon, Yuri Bushkin, Daniel M. Davis, Jack L. Strominger, Jonathan W. Yewdell, and Angel Porgador. 2001. “Recognition of Haemagglutinins on Virus-Infected Cells by NKp46 Activates Lysis by Human NK Cells.” *Nature* 409 (6823): 1055–60. https://doi.org/10.1038/35059110.

Mantovani, Alberto, Marco A. Cassatella, Claudio Costantini, and Sébastien Jaillon. 2011. “Neutrophils in the Activation and Regulation of Innate and Adaptive Immunity.” *Nature Reviews Immunology* 11 (8): 519–31. https://doi.org/10.1038/nri3024.

Manz, Markus G., and Steffen Boettcher. 2014. “Emergency Granulopoiesis.” *Nature Reviews Immunology* 14 (5): 302–14. https://doi.org/10.1038/nri3660.

Marazzi, Ivan, Jessica S.Y. Ho, Jaehoon Kim, Balaji Manicassamy, Scott Dewell, Randy A. Albrecht, Chris W. Seibert, et al. 2012. “Suppression of the Antiviral Response by an Influenza Histone Mimic.” *Nature* 483 (7390): 428–33. https://doi.org/10.1038/nature10892.

Martin, Kayleigh J.S. S, Michelle J. Muessel, Christine E. Pullar, Gary B. Willars, and Andrew J. Wardlaw. 2015. “The Role of Phosphoinositide 3-Kinases in Neutrophil Migration in 3D Collagen Gels.” *PLoS ONE* 10 (2): 1–18. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116250.

Martin, Kelsey, and Ari Heleniust. 1991. “Nuclear Transport of Influenza Virus Ribonucleoproteins: The Viral Matrix Protein (M1) Promotes Export and Inhibits Import.” *Cell* 67 (1): 117–30. https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90576-K.

Matrosovich, Mikhail, Alexander Tuzikov, Nikolai Bovin, Alexandra Gambaryan, Alexander Klimov, Maria R. Castrucci, Isabella Donatelli, and Yoshihiro Kawaoka. 2000. “Early Alterations of the Receptor-Binding Properties of H1, H2, and H3 Avian Influenza Virus Hemagglutinins after Their Introduction into Mammals.” *Journal of Virology* 74 (18): 8502–12. https://doi.org/10.1128/jvi.74.18.8502-8512.2000.

Mazanec, Mary B., Charlotte S. Kaetzel, Michael E. Lamm, David Fletcher, and John G. Nedrud. 1992. “Intracellular Neutralization of Virus by Immunoglobulin A Antibodies.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (15): 6901–5. https://doi.org/10.1073/pnas.89.15.6901.

McGrath, Emmet E., Helen M. Marriott, Allan Lawrie, Sheila E. Francis, Ian Sabroe, Stephen A. Renshaw, David H. Dockrell, and Moira K. B.

Whyte. 2011. “TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) Regulates Inflammatory Neutrophil Apoptosis and Enhances Resolution of Inflammation.” *Journal of Leukocyte Biology* 90 (5): 855–65. https://doi.org/10.1189/jlb.0211062.

McKinstry, K. Kai, Tara M. Strutt, Amanda Buck, Jonathan D. Curtis, John P. Dibble, Gail Huston, Michael Tighe, et al. 2009. “IL-10 Deficiency Unleashes an Influenza-Specific Th17 Response and Enhances Survival against High-Dose Challenge.” *The Journal of Immunology* 182 (12): 7353–63. https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900657.

Mechetina, Ludmila V., Alexander M. Najakshin, Boris Y. Alabyev, Nikolai A. Chikaev, and Alexander V. Taranin. 2002. “Identification of CD16-2, a Novel Mouse Receptor Homologous to CD16/FcγRIII.” *Immunogenetics* 54 (7): 463–68. https://doi.org/10.1007/s00251-002-0486-0.

Megiovanni Maria, Anna, Françoise Sanchez, Macarena Robledo-Sarmiento, Céline Morel, Jean Claude Gluckman, and Sarah Boudaly. 2006. “Polymorphonuclear Neutrophils Deliver Activation Signals and Antigenic Molecules to Dendritic Cells : A New Link between Leukocytes Upstream of T Lymphocytes and Mutually Influence the Two Leukocyte Popula- Cesses Occurring Upstream of the Interactions Be.” *Journal of Leukocyte Biology* 79 (May): 977–88. https://doi.org/10.1189/jlb.0905526.1.

Meher, Akshaya K., Michael Spinosa, John P. Davis, Nicolas Pope, Victor E. Laubach, Gang Su, Vlad Serbulea, Norbert Leitinger, Gorav Ailawadi, and Gilbert R. Upchurch. 2018. “Novel Role of IL (Interleukin)-1β in Neutrophil Extracellular Trap Formation and Abdominal Aortic Aneurysms.” *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 38 (4): 843–53. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.117.309897.

Mehl, Anne, Peyman Ghorbani, David Douda, Hailu Huang, Nades Palaniyar, Felix Ratjen, and Hartmut Grasemann. 2014. “Effect of Arginase Inhibition on Pulmonary L-Arginine Metabolism in Murine Pseudomonas Pneumonia.” *PLoS ONE* 9 (3): 4–9. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090232.

Meijer, Mariska, Ger T. Rijkers, and Frans J. Van Overveld. 2013. “Neutrophils and Emerging Targets for Treatment in Chronic Obstructive Pulmonary Disease.” *Expert Review of Clinical Immunology* 9 (11): 1055–68. https://doi.org/10.1586/1744666X.2013.851347.

Meinderts, Sanne M., Gabriella Baker, Stan Van Wijk, Boukje M. Beuger, Judy Geissler, Machiel H. Jansen, Anno Saris, et al. 2019. “Neutrophils Acquire Antigen-Presenting Cell Features after Phagocytosis of IgG-Opsonized Erythrocytes.” *Blood Advances* 3 (11): 1761–73. https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2018028753.

Menegazzi, Renzo, Eva Decleva, and Pietro Dri. 2012. “Killing by Neutrophil Extracellular Traps: Fact or Folklore?” *Blood* 119 (5): 1214–16. https://doi.org/10.1182/blood-2011-07-364604.

Metchnikoff, Elias. 1891. *LECTURES ON THE COMPARATIVE PATHOLOGY OF INFLAMMATION*. Kegan Paul, Trench, Trubner & Co. Ltd, London.

Meyer, M., R. Schreck, and P.A. Baeuerle. 1993. "H2O2 and Antioxidants Have Opposite Effects on Activation of NF-Kappa B and AP-1 in Intact Cells: AP-1 as Secondary Antioxidant-Responsive Factor." *The EMBO Journal* 12 (5): 2005–15. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb05850.x.

Mikhak, Zamaneh, James P. Strassner, and Andrew D. Luster. 2013. "Lung Dendritic Cells Imprint T Cell Lung Homing and Promote Lung Immunity through the Chemokine Receptor CCR4." *Journal of Experimental Medicine* 210 (9): 1855–69. https://doi.org/10.1084/jem.20130091.

Miller, Iain, Mingwei Min, Chen Yang, Chengzhe Tian, Sara Gookin, Dylan Carter, and Sabrina L. Spencer. 2018. "Ki67 Is a Graded Rather than a Binary Marker of Proliferation versus Quiescence." *Cell Reports* 24 (5): 1105-1111.e6. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.06.110.

Miller, Matthew S., Thomas J. Gardner, Florian Krammer, Lauren C. Aguado, Domenico Tortorella, Christopher F. Basler, and Peter Palese. 2013. "Neutralizing Antibodies Against Previously Encountered Influenza Virus Strains Increase over Time: A Longitudinal Analysis." *Science Translational Medicine* 5 (198): 198ra107-198ra107. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3006637.

Milton, Donald K., M. Patricia Fabian, Benjamin J. Cowling, Michael L. Grantham, and James J. McDevitt. 2013. "Influenza Virus Aerosols in Human Exhaled Breath: Particle Size, Culturability, and Effect of Surgical Masks." *PLoS Pathogens* 9 (3). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003205.

Mishalian, Inbal, Rachel Bayuh, Liran Levy, Lida Zolotarov, Janna Michaeli, and Zvi Gregorio Fridlender. 2013. "Tumor-Associated Neutrophils (TAN) Develop pro-Tumorigenic Properties during Tumor Progression." *Cancer Immunology, Immunotherapy* 62 (11): 1745–56. https://doi.org/10.1007/s00262-013-1476-9.

Mittal, Manish, Mohammad Rizwan Siddiqui, Khiem Tran, Sekhar P. Reddy, and Asrar B. Malik. 2014. "Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury." *Antioxidants & Redox Signaling* 20 (7): 1126–67. https://doi.org/10.1089/ars.2012.5149.

Mócsai, Attila, Jürgen Ruland, and Victor L.J. Tybulewicz. 2010. "The SYK Tyrosine Kinase: A Crucial Player in Diverse Biological Functions." *Nature Reviews Immunology* 10 (6): 387–402. https://doi.org/10.1038/nri2765.

Mohler, Jacqueline, Esther Azoulay-Dupuis, Cécile Amory-Rivier, Jean Xavier Mazoit, Jean Pierre P. Bédos, Véronique Rieux, and Pierre Moine. 2003. "Streptococcus Pneumoniae Strain-Dependent Lung Inflammatory Responses in a Murine Model of Pneumococcal Pneumonia." *Intensive Care Medicine* 29 (5): 808–16. https://doi.org/10.1007/s00134-003-1699-x.

Morawska, L. 2006. "Droplet Fate in Indoor Environments, or Can We Prevent the Spread of Infection?" *Indoor Air* 16 (5): 335–47. https://doi.org/10.1111/j.1600-0668.2006.00432.x.

Morens, David M., Jeffery K. Taubenberger, and Anthony S. Fauci. 2008. "Predominant Role of Bacterial Pneumonia as a Cause of Death in Pandemic Influenza: Implications for Pandemic

Influenza Preparedness." *The Journal of Infectious Diseases* 198 (7): 962–70. https://doi.org/10.1086/591708.

Morens, David M., Michael North, and Jeffery K. Taubenberger. 2010. "Eyewitness Accounts of the 1510 Influenza Pandemic in Europe." *The Lancet* 376 (9756): 1894–95. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)62204-0.

Morens, David M., and Jeffery K. Taubenberger. 2010. "Historical Thoughts on Influenza Viral Ecosystems, or Behold a Pale Horse, Dead Dogs, Failing Fowl, and Sick Swine." *Influenza and Other Respiratory Viruses* 4 (6): 327–37. https://doi.org/10.1111/j.1750-2659.2010.00148.x.

Moro, Kazuyo, Taketo Yamada, Masanobu Tanabe, Tsutomu Takeuchi, Tomokatsu Ikawa, Hiroshi Kawamoto, Jun Ichi Furusawa, Masashi Ohtani, Hideki Fujii, and Shigeo Koyasu. 2010. "Innate Production of T H 2 Cytokines by Adipose Tissue-Associated c-Kit + Sca-1 + Lymphoid Cells." *Nature* 463 (7280): 540–44. https://doi.org/10.1038/nature08636.

Moses, Katrin, and Sven Brandau. 2016. "Human Neutrophils: Their Role in Cancer and Relation to Myeloid-Derived Suppressor Cells." *Seminars in Immunology* 28 (2): 187–96. https://doi.org/10.1016/j.smim.2016.03.018.

Mougiakakos, Dimitrios, C. Christian Johansson, and Rolf Kiessling. 2009. "Naturally Occurring Regulatory T Cells Show Reduced Sensitivity toward Oxidative Stress-Induced Cell Death." *Blood* 113 (15): 3542–45. https://doi.org/10.1182/blood-2008-09-181040.

Munder, Markus, Henriette Schneider, Claudia Luckner, Thomas Giese, Claus Dieter Langhans, Jose M. Fuentes, Pascale Kropf, et al. 2006. "Suppression of T-Cell Functions by Human Granulocyte Arginase." *Blood* 108 (5): 1627–34. https://doi.org/10.1182/blood-2006-11-010389.

Muramoto, Y., T. Noda, E. Kawakami, R. Akkina, and Y. Kawaoka. 2013. "Identification of Novel Influenza A Virus Proteins Translated from PA MRNA." *Journal of Virology* 87 (5): 2455–62. https://doi.org/10.1128/jvi.02656-12.

N

Naghavi, Mohsen, Amanuel Alemu Abajobir, Cristiana Abbafati, Kaja M. Abbas, Foad Abd-Allah, Semaw Ferede Abera, Victor Aboyans, et al. 2017. "Global, Regional, and National Age-Sex Specifc Mortality for 264 Causes of Death, 1980-2016: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2016." *The Lancet* 390 (10100): 1151–1210. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32152-9.

Naik, Edwina, and Vishva M. Dixit. 2011. "Mitochondrial Reactive Oxygen Species Drive Proinflammatory Cytokine Production." *Journal of Experimental Medicine* 208 (3): 417–20. https://doi.org/10.1084/jem.20110367.

Naito, Mikihiko, Kimie Nagashima, Tetsuo Mashima, and Takashi Tsuruo. 1997. "Phosphatidylserine Externalization Is a Downstream Event of Interleukin-1β–Converting Enzyme Family Protease Activation During Apoptosis." *Blood* 89 (6): 2060–66. https://doi.org/10.1182/blood.V89.6.2060.

Nakano, Hideki, Kaifeng Lisa Lin, Manabu Yanagita, Chantal Charbonneau, Donald N. Cook,

Terutaka Kakiuchi, and Michael D. Gunn. 2009. "Blood-Derived Inflammatory Dendritic Cells in Lymph Nodes Stimulate Acute T Helper Type 1 Immune Responses." *Nature Immunology* 10 (4): 394–402. https://doi.org/10.1038/ni.1707.

Namkoong, Ho, Makoto Ishii, Hideki Fujii, Kazuma Yagi, Takahiro Asami, Takanori Asakura, Shoji Suzuki, et al. 2018. "Clarithromycin Expands CD11b + Gr-1 + Cells via the STAT3/Bv8 Axis to Ameliorate Lethal Endotoxic Shock and Post-Influenza Bacterial Pneumonia." *PLoS Pathogens* 14 (4): 1–30. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006955.

Narasaraju, Teluguakula, Edwin Yang, Ramar Perumal Samy, Huey Hian Ng, Wee Peng Poh, Audrey Ann Liew, Meng Chee Phoon, Nico Van Rooijen, and Vincent T. Chow. 2011. "Excessive Neutrophils and Neutrophil Extracellular Traps Contribute to Acute Lung Injury of Influenza Pneumonitis." *American Journal of Pathology* 179 (1): 199–210. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.03.013.

Navegantes, Kely Campos, Rafaelli Souza Gomes, Priscilla Aparecida Tártari Pereira, Paula Giselle Czaikoski, Carolina Heitmann Mares Azevedo, Marta Chagas Monteiro, Rafaelli De Souza Gomes, et al. 2017. "Immune Modulation of Some Autoimmune Diseases: The Critical Role of Macrophages and Neutrophils in the Innate and Adaptive Immunity." *Journal of Translational Medicine* 15 (1): 1–21. https://doi.org/10.1186/s12967-017-1141-8.

Nguyen-Jackson, Hoainam T., Haiyan S. Li, Huiyuan Zhang, Erika Ohashi, and Stephanie S. Watowich. 2012. "G-CSF-Activated STAT3 Enhances Production of the Chemokine MIP-2 in Bone Marrow Neutrophils." *Journal of Leukocyte Biology* 92 (6): 1215–25. https://doi.org/10.1189/jlb.0312126.

Nguyen, Giang T., Erin R. Green, and Joan Mecsas. 2017. "Neutrophils to the ROScue: Mechanisms of NADPH Oxidase Activation and Bacterial Resistance." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7 (August). https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00373.

Niehaus, Gary D., Elyce Ervin, Amit Patel, Kamal Khanna, Vincent W. Vanek, and Diana L. Fagan. 2002. "Circadian Variation in Cell-Adhesion Molecule Expression by Normal Human Leukocytes." *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 80 (10): 935–40. https://doi.org/10.1139/y02-121.

Nishio, Naomi, Yayoi Okawa, Hidetoshi Sakurai, and Ken Ichi Isobe. 2008. "Neutrophil Depletion Delays Wound Repair in Aged Mice." *Age* 30 (1): 11–19. https://doi.org/10.1007/s11357-007-9043-y.

Nitto, Takeaki, Yoshihiko Araki, Yuji Takeda, and Fujiro Sendo. 2002. "Pharmacological Analysis for Mechanisms of GPI-80 Release from Tumour Necrosis Factor-α-Stimulated Human Neutrophils." *British Journal of Pharmacology* 137 (3): 353–60. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704860.

Nobusawa, E., and K. Sato. 2006. "Comparison of the Mutation Rates of Human Influenza A and B Viruses." *Journal of Virology* 80 (7): 3675–78. https://doi.org/10.1128/jvi.80.7.3675-3678.2006.

Nogales, Aitor, Luis Martinez-Sobrido, David J. Topham, and Marta L. Dediego. 2018. "Modulation of Innate Immune Responses by the Influenza a NS1 and PA-X Proteins." *Viruses*

10 (12). https://doi.org/10.3390/v10120708.

Nordenfelt, Pontus, and Hans Tapper. 2011. "Phagosome Dynamics during Phagocytosis by Neutrophils." *Journal of Leukocyte Biology* 90 (2): 271–84. https://doi.org/10.1189/jlb.0810457.

Noton, Sarah L., Elizabeth Medcalf, Dawn Fisher, Anne E. Mullin, Debra Elton, and Paul Digard. 2007. "Identification of the Domains of the Influenza A Virus M1 Matrix Protein Required for NP Binding, Oligomerization and Incorporation into Virions." *Journal of General Virology* 88 (8): 2280–90. https://doi.org/10.1099/vir.0.82809-0.

O

O'neill, Robert E., Julie Talon, and Peter Palese. 1998. "The Influenza Virus NEP (NS2 Protein) Mediates the Nuclear Export of Viral Ribonucleoproteins." *EMBO Journal* 17 (1): 288–96. https://doi.org/10.1093/emboj/17.1.288.

O'Shea, John J., and Robert Plenge. 2012. "JAK and STAT Signaling Molecules in Immunoregulation and Immune-Mediated Disease." *Immunity* 36 (4): 542–50. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.03.014.

Oda, Tatsuya, Takaaki Akaike, Takayoshi Hamamoto, Fujio Suzuki, Takashi Hirano, and Hiroshi Maeda. 1989. "Oxygen Radicals in Influenza-Induced Pathogenesis and Treatment with Pyran Polymer-Conjugated SOD." *Science* 244 (4907): 974–76. https://doi.org/10.1126/science.2543070.

Ohsaka, Akimichi, Katsu Saionji, Tomoaki Kuwaki, Toshisuke Takeshima, and Jun Igari. 1995. "Granulocyte Colony-stimulating Factor Administration Modulates the Surface Expression of Effector Cell Molecules on Human Monocytes." *British Journal of Haematology* 89 (3): 465–72. https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1995.tb08350.x.

Oliveira, S. H.P., C. Canetti, R. A. Ribeiro, and F. Q. Cunha. 2008. "Neutrophil Migration Induced by IL-1β Depends upon LTB4 Released by Macrophages and upon TNF-α and IL-1β Released by Mast Cells." *Inflammation* 31 (1): 36–46. https://doi.org/10.1007/s10753-007-9047-x.

Ostuni, Renato, Gioacchino Natoli, Marco A. Cassatella, and Nicola Tamassia. 2016. "Epigenetic Regulation of Neutrophil Development and Function." *Seminars in Immunology* 28 (2): 83–93. https://doi.org/10.1016/j.smim.2016.04.002.

Otten, Marielle A., and Marjolein Van Egmond. 2004. "The Fc Receptor for IgA (FcαRI, CD89)." *Immunology Letters* 92 (1–2): 23–31. https://doi.org/10.1016/j.imlet.2003.11.018.

Ottonello, Luciano, Fabrizio Montecucco, Maria Bertolotto, Nicoletta Arduino, Marina Mancini, Anna Corcione, Vito Pistoia, and Franco Dallegri. 2005. "CCL3 (MIP-1α) Induces in Vitro Migration of GM-CSF-Primed Human Neutrophils via CCR5-Dependent Activation of ERK 1/2." *Cellular Signalling* 17 (3): 355–63. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2004.08.002.

Oyoshi, Michiko K., Rui He, Yitang Li, Subhanjan Mondal, Juhan Yoon, Roshi Afshar, Mei Chen, et al. 2012. "Leukotriene B4-Driven Neutrophil Recruitment to the Skin Is Essential for Allergic Skin Inflammation." *Immunity* 37 (4): 747–58.

https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.06.018.

P

Paget, Christophe, Stoyan Ivanov, Josette Fontaine, Fany Blanc, Muriel Pichavant, Joelle Renneson, Emilie Bialecki, Julien Pothlichet, Catherine Vendeville, Giovanna Barba-Speath, Michel-René Huerre, Christelle Faveeuw, Mustapha Si-Tahar, François Trottein, et al. 2011. "Correction: Potential Role of Invariant NKT Cells in the Control of Pulmonary Inflammation and CD8+ T Cell Response during Acute Influenza A Virus H3N2 Pneumonia." *The Journal of Immunology* 187 (3): 1515–1515. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1190034.

Paget, Christophe, Stoyan Ivanov, Josette Fontaine, Fany Blanc, Muriel Pichavant, Joelle Renneson, Emilie Bialecki, Julien Pothlichet, Catherine Vendeville, Giovanna Barba-Speath, Michel-René Huerre, Christelle Faveeuw, Mustapha Si-Tahar, and François Trottein. 2011. "Potential Role of Invariant NKT Cells in the Control of Pulmonary Inflammation and CD8 + T Cell Response during Acute Influenza A Virus H3N2 Pneumonia." *The Journal of Immunology* 186 (10): 5590–5602. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002348.

Paget, Christophe, Thierry Mallevaey, Anneliese O. Speak, David Torres, Josette Fontaine, Kathleen C.F. Sheehan, Monique Capron, et al. 2007. "Activation of Invariant NKT Cells by Toll-like Receptor 9-Stimulated Dendritic Cells Requires Type I Interferon and Charged Glycosphingolipids." *Immunity* 27 (4): 597–609. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.08.017.

Paige, Candler, Gayathri Batchalli Maruthy, Galo Mejia, Gregory Dussor, and Theodore Price. 2018. "Spinal Inhibition of P2XR or P38 Signaling Disrupts Hyperalgesic Priming in Male, but Not Female, Mice." *Neuroscience* 385: 133–42. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.06.012.

Palacios, Gustavo, Mady Hornig, Daniel Cisterna, Nazir Savji, Ana Valeria Bussetti, Vishal Kapoor, Jeffrey Hui, et al. 2009. "Streptococcus Pneumoniae Coinfection Is Correlated with the Severity of H1N1 Pandemic Influenza." *PLoS ONE* 4 (12): 1–5. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008540.

Park, Jong Sung, John Arcaroli, Huan Ho-Kee Kee Yum, Huan Haichao Yang, Haichao Wang, Kuang-Yao Yao Kang-Hyeon Yang, Kang-Hyeon Hyeon Choe, et al. 2003. "Activation of Gene Expression in Human Neutrophils by High Mobility Group Box 1 Protein." *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 284 (4 53-4): 870–79. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00322.2002.-High.

Parvin, J D, Anne Moscona, W T Pan, Jason M Leider, and P Palese. 1986. "Measurement of the Mutation Rates of Animal Viruses: Influenza A Virus and Poliovirus Type 1." *Journal of Virology* 59 (2): 377–83. http://jvi.asm.org/.

Peasah, Samuel K., Eduardo Azziz-baumgartner, Joseph Breese, Martin I. Meltzer, and Marc-alain Widdowson. 2013. "Influenza Cost and Cost-Effectiveness Studies Globally – A Review." *Vaccine* 31 (46): 5339–48. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.09.013.

Pelletier, Martin, Laura Maggi, Alessandra Micheletti, Elena Lazzeri, Nicola Tamassia, Claudio Costantini, Lorenzo Cosmi, et al. 2010. "Evidence for a Cross-Talk between Human Neutrophils and Th17 Cells." *Blood* 115 (2): 335–43. https://doi.org/10.1182/blood-2009-04-216085.

Penvose, Ashley, and Karen A. Westerman. 2012. "Sca-1 Is Involved in the Adhesion of Myosphere Cells to AVβ3 Integrin." *Biology Open* 1 (9): 839–47. https://doi.org/10.1242/bio.20121222.

Peper, Randall L., and Hana Van Campen. 1995. "Tumor Necrosis Factor as a Mediator of Inflammation in Influenza a Viral Pneumonia." *Microbial Pathogenesis* 19 (3): 175–83. https://doi.org/10.1006/mpat.1995.0056.

Perianayagam, M. C., V. S. Balakrishnan, B. J.G. Pereira, Bertrand L. Jaber, B J G Pereira, Bertrand L. Jaber, B J G Pereira B L Jaber, and Bertrand L. Jaber. 2004. "C5a Delays Apoptosis of Human Neutrophils via an Extracellular Signal-Regulated Kinase and Bad-Mediated Signalling Pathway." *European Journal of Clinical Investigation* 34 (1): 50–56. https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2004.01273.x.

Petrova, Velislava N., and Colin A. Russell. 2018. "The Evolution of Seasonal Influenza Viruses." *Nature Reviews Microbiology* 16 (1): 47–60. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.118.

Pflugh, David L., Stephen E. Maher, Alfred L. M. Bothwell, L M Alfred, Alfred L. M. Bothwell, and L M Alfred. 2002. "Ly-6 Superfamily Members Ly-6A/E, Ly-6C, and Ly-6I Recognize Two Potential Ligands Expressed by B Lymphocytes." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 169 (9): 5130–36. https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.9.5130.

Pichlmair, Andreas, Oliver Schulz, Choon Ping Tan, Tanja I. Näslund, Peter Liljeström, Friedemann Weber, and Caetano Reis E Sousa. 2006. "RIG-I-Mediated Antiviral Responses to Single-Stranded RNA Bearing 5'-Phosphates." *Science* 314 (5801): 997–1001. https://doi.org/10.1126/science.1132998.

Pillai, Padmini S, Ryan D Molony, Kimberly Martinod, Huiping Dong, Iris K Pang, Michal C Tal, Angel G Solis, et al. 2016. "Mx1 Reveals Innate Pathways to Antiviral Resistance and Lethal Influenza Disease." *Science* 352 (6284): 463–66. https://doi.org/10.1126/science.aaf3926.

Pillay, Janesh, Ineke Den Braber, Nienke Vrisekoop, Lydia M Kwast, Rob J De Boer, A M Borghans, Kiki Tesselaar, and Leo Koenderman. 2010. "Brief Report In Vivo Labeling with 2 H 2 O Reveals a Human Neutrophil Lifespan of 5 . 4 Days." *Blood* 116 (4): 625–27. https://doi.org/10.1182/blood-2010-01-259028.

Pillay, Janesh, Vera M. Kamp, Els van Hoffen, Tjaakje Visser, Tamar Tak, Jan-Willem Willem Lammers, Laurien H. Ulfman, Luke P. Leenen, Peter Pickkers, and Leo Koenderman. 2012. "A Subset of Neutrophils in Human Systemic Inflammation Inhibits T Cell Responses through Mac-1." *Journal of Clinical Investigation* 122 (1): 327–36. https://doi.org/10.1172/JCI57990.

Pillay, Janesh, Tamar Tak, Vera M. Kamp, and Leo Koenderman. 2013. "Immune Suppression by Neutrophils and Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells: Similarities and Differences."

Cellular and Molecular Life Sciences 70 (20): 3813–27. https://doi.org/10.1007/s00018-013-1286-4.

Pinto, L. A., V. Blazevic, B. K. Patterson, C. Mac Trubey, M. J. Dolan, and G. M. Shearer. 2000. "Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication Prior to Reverse Transcription by Influenza Virus Stimulation." *Journal of Virology* 74 (10): 4505–11. https://doi.org/10.1128/jvi.74.10.4505-4511.2000.

Pirhonen, J, T Sareneva, M Kurimoto, I Julkunen, and S Matikainen. 1999. "Virus Infection Activates IL-1 Beta and IL-18 Production in Human Macrophages by a Caspase-1-Dependent Pathway." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 162 (12): 7322–7739.

Pleschka, Stephan. 2012. "Overview of Influenza Viruses." In *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 0:1–20. https://doi.org/10.1007/82_2012_272.

Plotch, Stephen J., Michele Bouloy, Lsmo Ulmanen, Robert M. Krug, Ismo Ulmanen, and Robert M. Krug. 1981. "A Unique Cap(M7GpppXm)-Dependent Influenza Virion Endonuclease Cleaves Capped RNAs to Generate the Primers That Initiate Viral RNA Transcription." *Cell* 23 (3): 847–58. https://doi.org/10.1016/0092-8674(81)90449-9.

Pobezinskaya, Yelena L., You Sun Kim, Swati Choksi, Michael J. Morgan, Tao Li, Chengyu Liu, and Zhenggang Liu. 2008. "The Function of TRADD in Signaling through Tumor Necrosis Factor Receptor 1 and TRIF-Dependent Toll-like Receptors." *Nature Immunology* 9 (9): 1047–54. https://doi.org/10.1038/ni.1639.

Poon, L. L. M., E. Fodor, and G. G. Brownlee. 2000. "Polyuridylated MRNA Synthesized by a Recombinant Influenza Virus Is Defective in Nuclear Export." *Journal of Virology* 74 (1): 418–27. https://doi.org/10.1128/jvi.74.1.418-427.2000.

Poon, L L, D C Pritlove, E Fodor, and G G Brownlee. 1999. "Direct Evidence That the Poly(A) Tail of Influenza A Virus MRNA Is Synthesized by Reiterative Copying of a U Track in the Virion RNA Template." *Journal of Virology* 73 (4): 3473–76. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10074205%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC104115.

Poon, L L, D C Pritlove, J Sharps, and G G Brownlee. 1998. "The RNA Polymerase of Influenza Virus, Bound to the 5' End of Virion RNA, Acts in Cis to Polyadenylate MRNA." *Journal of Virology* 72 (10): 8214–19. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9733864%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC110172.

Porteu, F., and C. F. Nathan. 1992. "Mobilizable Intracellular Pool of P55 (Type I) Tumor Necrosis Factor Receptors in Human Neutrophils." *Journal of Leukocyte Biology* 52 (1): 122–24. https://doi.org/10.1002/jlb.52.1.122.

Porto, Bárbara Nery, and Renato Tetelbom Stein. 2016. "Neutrophil Extracellular Traps in Pulmonary Diseases: Too Much of a Good Thing?" *Frontiers in Immunology* 7 (AUG): 1–13. https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00311.

Potter, Chris W., and Roy Jennings. 2011. "A Definition for Influenza Pandemics Based on Historial Records." *Journal of Infection* 63 (4):

252–59. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2011.04.013.

Preston, Gloria A., Christopher S. Zarella, William F. Pendergraft, Earl H. Rudolph, Jia Jin Yang, Stephen B. Sekura, J. Charles Jennette, and Ronald J. Falk. 2002. "Novel Effects of Neutrophil-Derived Proteinase 3 and Elastase on the Vascular Endothelium Involve in Vivo Cleavage of NF-KB and Proapoptotic Changes in JNK, ERK, and P38 MAPK Signaling Pathways." *Journal of the American Society of Nephrology* 13 (12): 2840–49. https://doi.org/10.1097/01.ASN.0000034911.03334.C3.

Prieto, A., E. Reyes, E. D. Bernstein, B. Martinez, J. Monserrat, J. L. Izquierdo, L. Callol, et al. 2001. "Defective Natural Killer and Phagocytic Activities in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Are Restored by Glycophosphopeptical (Inmunoferón)." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 163 (7): 1578–83. https://doi.org/10.1164/ajrccm.163.7.2002015.

Puga, Irene, Montserrat Cols, Carolina M. Barra, Bing He, Linda Cassis, Maurizio Gentile, Laura Comerma, et al. 2012. "B Cell-Helper Neutrophils Stimulate the Diversification and Production of Immunoglobulin in the Marginal Zone of the Spleen." *Nature Immunology* 13 (2): 170–80. https://doi.org/10.1038/ni.2194.

Q

Qi, Li, John C. Kash, Vivien G. Dugan, Brett W. Jagger, Yuk Fai Lau, Zhong Mei Sheng, Erika C. Crouch, Kevan L. Hartshorn, and Jeffery K. Taubenberger. 2011. "The Ability of Pandemic Influenza Virus Hemagglutinins to Induce Lower Respiratory Pathology Is Associated with Decreased Surfactant Protein D Binding." *Virology* 412 (2): 426–34. https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.01.029.

Qi, Yan, Jingyan Ge, Chunhui Ma, Na Wu, Xueling Cui, and Zhonghui Liu. 2017. "Activin A Regulates Activation of Mouse Neutrophils by Smad3 Signalling." *Open Biology* 7 (5). https://doi.org/10.1098/rsob.160342.

R

Rabiet, Marie Josèphe, Emilie Huet, and François Boulay. 2007. "The N-Formyl Peptide Receptors and the Anaphylatoxin C5a Receptors: An Overview." *Biochimie* 89 (9): 1089–1106. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2007.02.015.

Rajao, Daniela S., Amy L. Vincent, and Daniel R. Perez. 2019. "Adaptation of Human Influenza Viruses to Swine." *Frontiers in Veterinary Science* 5 (January): 1–12. https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00347.

Ramsey, Clare, and Anand Kumar. 2011. "H1N1: Viral Pneumonia as a Cause of Acute Respiratory Distress Syndrome." *Current Opinion in Critical Care* 17 (1): 64–71. https://doi.org/10.1097/MCC.0b013e3283427259.

Rangel-Moreno, Javier, Damian M. Carragher, Ravi S. Misra, Kim Kusser, Louise Hartson, Amy Moquin, Frances E. Lund, and Troy D. Randall. 2008. "B Cells Promote Resistance to Heterosubtypic Strains of Influenza via Multiple Mechanisms." *The Journal of Immunology* 180 (1): 454–63. https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.1.454.

Rasheed, Zafar. 2008. "Hydroxyl Radical Damaged

Immunoglobulin G in Patients with Rheumatoid Arthritis: Biochemical and Immunological Studies." *Clinical Biochemistry* 41 (9): 663–69. https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2008.02.013.

Reddy, Venkateshwar A., Atsushi Iwama, Guergana Iotzova, Mathias Schulz, Annika Elsasser, Rajani K. Vangala, Daniel G. Tenen, Wolfgang Hiddemann, and Gerhard Behre. 2002. "Granulocyte Inducer C/EBPα Inactivates the Myeloid Master Regulator PU.1: Possible Role in Lineage Commitment Decisions." *Blood* 100 (2): 483–90. https://doi.org/10.1182/blood.V100.2.483.

Reeth, Kristien Van. 2000. "Cytokines in the Pathogenesis of Influenza." *Veterinary Microbiology* 74 (1–2): 109–16. https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00171-1.

Reid, Ann H., Thomas G. Fanning, Johan V. Hultin, and Jeffery K. Taubenberger. 1999. "Origin and Evolution of the 1918 'Spanish' Influenza Virus Hemagglutinin Gene." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (4): 1651–56. https://doi.org/10.1073/pnas.96.4.1651.

Renshaw, S. A., S. J. Timmons, V. Eaton, L. R. Usher, M. Akil, C. D. Bingle, and M. K.B. Whyte. 2000. "Inflammatory Neutrophils Retain Susceptibility to Apoptosis Mediated via the Fas Death Receptor." *Journal of Leukocyte Biology* 67 (5): 662–68. https://doi.org/10.1002/jlb.67.5.662.

Repp, R., T. Th Valerius, A. Sendler, M. Gramatzki, H. Iro, J. R. Kalden, and E. Platzer. 1991. "Neutrophils Express the High Affinity Receptor for IgG (FcγRI, CD64) after in Vivo Application of Recombinant Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor." *Blood* 78 (4): 885–89. www.bloodjournal.org.

Rewar, Suresh, Dashrath Mirdha, and Prahlad Rewar. 2016. "Treatment and Prevention of Pandemic H1N1 Influenza." *Annals of Global Health* 81 (5): 645. https://doi.org/10.1016/j.aogh.2015.08.014.

Rhyne, J. A., S. B. Mizel, R. G. Taylor, M. Chedid, and C. E. McCall. 1988. "Characterization of the Human Interleukin 1 Receptor on Human Polymorphonuclear Leukocytes." *Clinical Immunology and Immunopathology* 48 (3): 354–61. https://doi.org/10.1016/0090-1229(88)90029-3.

Riedel, Detlev D., and Stefan H.E. E Kaufmann. 1997. "Chemokine Secretion by Human Polymorphonuclear Granulocytes after Stimulation with Mycobacterium Tuberculosis and Lipoarabinomannan." *Infection and Immunity* 65 (11): 4620–23. http://iai.asm.org/.

Riegel, Alexander, Thomas Maurer, Birgit Prior, Sabine Stegmaier, Volkmar Heppert, Christof Wagner, and G. Maria Hänsch. 2012. "Human Polymorphonuclear Neutrophils Express RANK and Are Activated by Its Ligand, RANKL." *European Journal of Immunology* 42 (4): 975–81. https://doi.org/10.1002/eji.201141786.

Rieger, Michael a, Philipp S Hoppe, Benjamin M Smejkal, Andrea C Eitelhuber, and Timm Schroeder. 2009. "Hematopoietic Cytokines Can Instruct Lineage Choice." *Science* 325 (July): 217–18.

Riffelmacher, Thomas, Alexander Clarke, Felix C. Richter, Amanda Stranks, Sumeet Pandey, Sara

Danielli, Philip Hublitz, et al. 2017. “Autophagy-Dependent Generation of Free Fatty Acids Is Critical for Normal Neutrophil Differentiation.” *Immunity* 47 (3): 466-480.e5. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.08.005.

Roach, Jared C, Gustavo Glusman, Lee Rowen, Amardeep Kaur, Maureen K Purcell, Kelly D Smith, Leroy E Hood, and Alan Aderem. 2005. “The Evolution of Vertebrate Toll-like Receptors. - Big Phylogeny Paper Mainly Mammals.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (27): 9577–82. https://doi.org/10.1073/pnas.0502272102.

Roberts, Andrew W. 2005. “G-CSF: A Key Regulator of Neutrophil Production, but That’s Not All!” *Growth Factors* 23 (1): 33–41. https://doi.org/10.1080/08977190500055836.

Rogers, Gary N., James C. Paulson, and James C Paulson’. 1983. “Receptor Determinants of Human and Animal Influenza Virus Isolates: Differences in Receptor Specificity of the H3 Hemagglutinin Based on Species of Origin.” *Virology* 127 (2): 361–73. https://doi.org/10.1016/0042-6822(83)90150-2.

Rørvig, Sara, Ole Østergaard, Niels H. H. Heegaard, and Niels Borregaard. 2013. “Proteome Profiling of Human Neutrophil Granule Subsets, Secretory Vesicles, and Cell Membrane: Correlation with Transcriptome Profiling of Neutrophil Precursors.” *Journal of Leukocyte Biology* 94 (4): 711–21. https://doi.org/10.1189/jlb.1212619.

Roth, Gregory A., Degu Abate, Kalkidan Hassen Abate, Solomon M. Abay, Cristiana Abbafati, Nooshin Abbasi, Hedayat Abbastabar, et al. 2018a. “Global, Regional, and National Age-Sex-Specific Mortality for 282 Causes of Death in 195 Countries and Territories, 1980–2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2017.” *The Lancet* 392 (10159): 1736–88. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32203-7.

Roth, Gregory A, Degu Abate, Kalkidan Hassen Abate, Solomon M Abay, Cristiana Abbafati, Nooshin Abbasi, Hedayat Abbastabar, et al. 2018b. “Global, Regional, and National Age-Sex-Specific Mortality for 282 Causes of Death in 195 Countries and Territories, 1980–2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2017.” *The Lancet* 392 (10159): 1736–88. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32203-7.

Rothberg, Michael B., Sarah D. Haessler, and Richard B. Brown. 2008. “Complications of Viral Influenza.” *American Journal of Medicine* 121 (4): 258–64. https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2007.10.040.

Rouvier, Eric, Marie Françoise Luciani, and Pierre Golstein. 1993. “Fas Involvement in Ca2+-Independent T Cell-Mediated Cytotoxicity.” *Journal of Experimental Medicine* 177 (1): 195–200. https://doi.org/10.1084/jem.177.1.195.

Rowe, R. Grant, and Stephen J. Weiss. 2008. “Breaching the Basement Membrane: Who, When and How?” *Trends in Cell Biology* 18 (11): 560–74. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2008.08.007.

Rožman, S., S. Yousefi, K. Oberson, T. Kaufmann, C. Benarafa, and H. U. Simon. 2015. “The

Generation of Neutrophils in the Bone Marrow Is Controlled by Autophagy." *Cell Death and Differentiation* 22 (3): 445–56. https://doi.org/10.1038/cdd.2014.169.

Rudd, Jennifer M., Sivasami Pulavendran, Harshini K. Ashar, Jerry W. Ritchey, Timothy A. Snider, Jerry R. Malayer, Montelongo Marie, Vincent T.K. K. Chow, and Teluguakula Narasaraju. 2019. "Neutrophils Induce a Novel Chemokine Receptors Repertoire During Influenza Pneumonia." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 9 (April): 1–12. https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00108.

Ruigrok, Rob W.H., Annie Barge, Peter Durrer, Josef Brunner, Kai Ma, and Gary R. Whittaker. 2000. "Membrane Interaction of Influenza Virus M1 Protein." *Virology* 267 (2): 289–98. https://doi.org/10.1006/viro.1999.0134.

S

Sabbione, Florencia, María L. Gabelloni, Glenda Ernst, María S. Gori, Gabriela Salamone, Matías Oleastro, Analía Trevani, Jorge Geffner, and Carolina C. Jancic. 2014. "Neutrophils Suppress Γδ T-Cell Function." *European Journal of Immunology* 44 (3): 819–30. https://doi.org/10.1002/eji.201343664.

Sabroe, Ian, Elizabeth C. Jones, Lynne R. Usher, Moira K. B. Whyte, and Steven K. Dower. 2002. "Toll-Like Receptor (TLR)2 and TLR4 in Human Peripheral Blood Granulocytes: A Critical Role for Monocytes in Leukocyte Lipopolysaccharide Responses." *The Journal of Immunology* 168 (9): 4701–10. https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.9.4701 .

Saffar, Arash Shoja, Martin P. Alphonse, Lianyu Shan, Kent T. HayGlass, F. Estelle R. Simons, and Abdelilah Soussi Gounni. 2007. "IgE Modulates Neutrophil Survival in Asthma: Role of Mitochondrial Pathway." *The Journal of Immunology* 178 (4): 2535–41. https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.4.2535 .

Sagiv, Jitka Y., Janna Michaeli, Simaan Assi, Inbal Mishalian, Hen Kisos, Liran Levy, Pazzit Damti, et al. 2015. "Phenotypic Diversity and Plasticity in Circulating Neutrophil Subpopulations in Cancer." *Cell Reports* 10 (4): 562–74. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.12.039.

Saijo, Kaoru, Christian Schmedt, I. hsin Su, Hajime Karasuyama, Clifford A. Lowell, Michael Reth, Takahiro Adachi, Alina Patke, Angela Santana, and Alexander Tarakhovsky. 2003. "Essential Role of Src-Family Protein Tyrosine Kinases in NF-KB Activation during B Cell Development." *Nature Immunology* 4 (3): 274–79. https://doi.org/10.1038/ni893.

Saitoh, Tatsuya, Jun Komano, Yasunori Saitoh, Takuma Misawa, Michihiro Takahama, Tatsuya Kozaki, Takuya Uehata, et al. 2012. "Neutrophil Extracellular Traps Mediate a Host Defense Response to Human Immunodeficiency Virus-1." *Cell Host & Microbe* 12 (1): 109–16. https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.05.015.

Sanjuan, Miguel A., Navin Rao, Kuei Tai A. Lai, Yin Gu, Siquan Sun, Anja Fuchs, Wai Ping Fung-Leung, Marco Colonna, and Lars Karlsson. 2006. "CpG-Induced Tyrosine Phosphorylation Occurs via a TLR9-Independent Mechanism and Is Required for Cytokine Secretion." *Journal of Cell Biology* 172 (7): 1057–68. https://doi.org/10.1083/jcb.200508058.

Santo, Carmela De, Ramon Arscott, Sarah Booth,

Ioannis Karydis, Margaret Jones, Ruth Asher, Mariolina Salio, Mark Middleton, and Vincenzo Cerundolo. 2010. "Invariant NKT Cells Modulate the Suppressive Activity of IL-10-Secreting Neutrophils Differentiated with Serum Amyloid A." *Nature Immunology* 11 (11): 1039–46. https://doi.org/10.1038/ni.1942.

Santo, Carmela De, Mariolina Salio, S. Hajar Masri, Laurel Yong-hwa Hwa Lee, Tao Dong, Anneliese O. Speak, Stefan Porubsky, et al. 2008. "Invariant NKT Cells Reduce the Immunosuppressive Activity of Influenza A Virus–Induced Myeloid-Derived Suppressor Cells in Mice and Humans." *Journal of Clinical Investigation* 118 (12): 4036–48. https://doi.org/10.1172/JCI36264.

Scapini, P., J. A. Lapinet-Vera, S. Gasperini, F. Calzetti, F. Bazzoni, and M. A. Cassatella. 2000. "The Neutrophil as a Cellular Source of Chemokines." *Immunological Reviews* 177 (4): 195–203. https://doi.org/10.1034/j.1600-065X.2000.17706.x.

Scapini, Patrizia, Carlo Laudanna, Cristina Pinardi, Paola Allavena, Alberto Mantovani, Silvano Sozzani, and Marco Antonio Cassatella. 2001. "Neutrophils Produce Biologically Active Macrophage Inflammatory Protein-3α (MIP-3α)/CCL20 and MIP-3β/CCL19." *European Journal of Immunology* 31 (7): 1981–88. https://doi.org/10.1002/1521-4141(200107)31:7<1981::AID-IMMU1981>3.0.CO;2-X.

Scapini, Patrizia, Olivia Marini, Cristina Tecchio, and Marco A. Cassatella. 2016. "Human Neutrophils in the Saga of Cellular Heterogeneity: Insights and Open Questions." *Immunological Reviews* 273 (1): 48–60. https://doi.org/10.1111/imr.12448.

Schoenborn, Jamie R., and Christopher B. Wilson. 2007. "Regulation of Interferon-γ During Innate and Adaptive Immune Responses." *Advances in Immunology* 96 (07): 41–101. https://doi.org/10.1016/S0065-2776(07)96002-2.

Scholtissek, C., W. Rohde, V. Von Hoyningen, and R. Rott. 1978. "On the Origin of the Human Influenza Virus Subtypes H2N2 and H3N2." *Virology* 87 (1): 13–20. https://doi.org/10.1016/0042-6822(78)90153-8.

Schülke, Stefan. 2018. "Induction of Interleukin-10 Producing Dendritic Cells as a Tool to Suppress Allergen-Specific T Helper 2 Responses." *Frontiers in Immunology* 9 (MAR). https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00455.

Schultze, Max. 1865. "Ein Heizbarer Objecttisch Und Seine Verwendung Bei Untersuchungen Des Blutes." *Archiv Für Microskopik Anatomie* 1: 1–42.

Schwarzenberger, Paul, Weitao Huang, Peng Ye, Peter Oliver, Misty Manuel, Zili Zhang, Gregory Bagby, Steve Nelson, and Jay K. Kolls. 2000. "Requirement of Endogenous Stem Cell Factor and Granulocyte-Colony-Stimulating Factor for IL-17-Mediated Granulopoiesis." *The Journal of Immunology* 164 (9): 4783–89. https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.9.4783.

Segal, A W, J Dorling, and S Coade. 1980. "Kinetics of Fusion of the Cytoplasmic Granules with Phagocytic Vacuoles in Human Polymorphonuclear Phagocytes." *J. Cell Biol.* 85 (April): 42–59.

Seibert, C. W., S. Rahmat, J. C. Krause, D. Eggink, R.

A. Albrecht, P. H. Goff, F. Krammer, et al. 2013. “Recombinant IgA Is Sufficient To Prevent Influenza Virus Transmission in Guinea Pigs.” *Journal of Virology* 87 (14): 7793–7804. https://doi.org/10.1128/jvi.00979-13.

Seita, Jun, and Irving L. Weissman. 2010. “Hematopoietic Stem Cell: Self-Renewal versus Differentiation.” *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine* 2 (6): 640–53. https://doi.org/10.1002/wsbm.86.

Sell, Stewart, Karl Kai McKinstry, and Tara M. Strutt. 2019. “Mouse Models Reveal Role of T-Cytotoxic and t-Reg Cells in Immune Response to Influenza: Implications for Vaccine Design.” *Viruses* 11 (1): 1–14. https://doi.org/10.3390/v11010052.

Semerad, Craig L., Fulu Liu, Alyssa D. Gregory, Katherine Stumpf, and Daniel C. Link. 2002. “G-CSF Is an Essential Regulator of Neutrophil Trafficking from the Bone Marrow to the Blood.” *Immunity* 17 (4): 413–23. https://doi.org/10.1016/S1074-7613(02)00424-7.

Senju, Hiroaki, Asuka Kumagai, Yoichi Nakamura, Hiroyuki Yamaguchi, Katsumi Nakatomi, Shota Fukami, Kengo Shiraishi, et al. 2018. “Effect of IL-18 on the Expansion and Phenotype of Human Natural Killer Cells: Application to Cancer Immunotherapy.” *International Journal of Biological Sciences* 14 (3): 331–40. https://doi.org/10.7150/ijbs.22809.

Serhan, Charles N., and John Savill. 2005. “Resolution of Inflammation: The Beginning Programs the End.” *Nature Immunology* 6 (12): 1191–97. https://doi.org/10.1038/ni1276.

Shao, Wenhan, Xinxin Li, Mohsan Ullah Goraya, Song Wang, and Ji Long Chen. 2017. “Evolution of Influenza a Virus by Mutation and Re-Assortment.” *International Journal of Molecular Sciences* 18 (8). https://doi.org/10.3390/ijms18081650.

Shaul, Merav E., and Zvi G. Fridlender. 2017. “Neutrophils as Active Regulators of the Immune System in the Tumor Microenvironment.” *Journal of Leukocyte Biology* 102 (August): jlb.5MR1216-508R. https://doi.org/10.1189/jlb.5MR1216-508R.

Shinya, Kyoko, Masahito Ebina, Shinya Yamada, Masao Ono, Noriyuki Kasai, and Yoshihiro Kawaoka. 2006. “Influenza Virus Receptors in the Human Airway.” *Nature* 440 (7083): 435–36. https://doi.org/10.1038/440435a.

Shojaei, Farbod, Mallika Singh, Jennifer D. Thompson, and Napoleone Ferrara. 2008. “Role of Bv8 in Neutrophil-Dependent Angiogenesis in a Transgenic Model of Cancer Progression.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (7): 2640–45. https://doi.org/10.1073/pnas.0712185105.

Shornick, Laurie P., Audrey G. Wells, Yong Zhang, Anand C. Patel, Guangming Huang, Kazutaka Takami, Moises Sosa, Nikhil A. Shukla, Eugene Agapov, and Michael J. Holtzman. 2008. “Airway Epithelial versus Immune Cell Stat1 Function for Innate Defense against Respiratory Viral Infection.” *The Journal of Immunology* 180 (5): 3319–28. https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.5.3319.

Short, Kirsty R., Edwin J.B.Veldhuis Kroeze, Ron A.M. Fouchier, and Thijs Kuiken. 2014. “Pathogenesis of Influenza-Induced Acute Respiratory Distress Syndrome.” *The Lancet*

Infectious Diseases 14 (1): 57–69. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70286-X.

Silva, Eliezer, John Arcaroli, Qianbin He, Daiva Svetkauskaite, Christopher Coldren, Jerry A. Nick, Katie Poch, Jong Sung Park, Anirban Banerjee, and Edward Abraham. 2007. "HMGB1 and LPS Induce Distinct Patterns of Gene Expression and Activation in Neutrophils from Patients with Sepsis-Induced Acute Lung Injury." *Intensive Care Medicine* 33 (10): 1829–39. https://doi.org/10.1007/s00134-007-0748-2.

Singhal, Sunil, Pratik S. Bhojnagarwala, Shaun O'Brien, Edmund K. Moon, Alfred L. Garfall, Abhishek S. Rao, Jon G. Quatromoni, et al. 2016. "Origin and Role of a Subset of Tumor-Associated Neutrophils with Antigen-Presenting Cell Features in Early-Stage Human Lung Cancer." *Cancer Cell* 30 (1): 120–35. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.06.001.

Skehel, John J., and Don C. Wiley. 2000. "Receptor Binding and Membrane Fusion in Virus Entry: The Influenza Hemagglutinin." *Annual Review of Biochemistry* 69 (1): 531–69. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.531.

Smith, Gavin J.D., Dhanasekaran Vijaykrishna, Justin Bahl, Samantha J. Lycett, Michael Worobey, Oliver G. Pybus, Siu Kit Ma, et al. 2009. "Origins and Evolutionary Genomics of the 2009 Swine-Origin H1N1 Influenza a Epidemic." *Nature* 459 (7250): 1122–25. https://doi.org/10.1038/nature08182.

Smith, Logan K., Giselle M. Boukhaled, Stephanie A. Condotta, Sabrina Mazouz, Jenna J. Guthmiller, Rahul Vijay, Noah S. Butler, et al. 2018. "Interleukin-10 Directly Inhibits CD8+ T Cell Function by Enhancing N-Glycan Branching to Decrease Antigen Sensitivity." *Immunity* 48 (2): 299-312.e5. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.01.006.

Snelgrove, Robert J., Lorna Edwards, Aaron J. Rae, and Tracy Hussell. 2006. "An Absence of Reactive Oxygen Species Improves the Resolution of Lung Influenza Infection." *European Journal of Immunology* 36 (6): 1364–73. https://doi.org/10.1002/eji.200635977.

Soehnlein, Oliver, and Lennart Lindbom. 2010. "Phagocyte Partnership during the Onset and Resolution of Inflammation." *Nature Reviews Immunology* 10 (6): 427–39. https://doi.org/10.1038/nri2779.

Sooryanarain, Harini, and Subbiah Elankumaran. 2015. "Environmental Role in Influenza Virus Outbreaks." *Annual Review of Animal Biosciences* 3 (1): 347–73. https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022114-111017.

Sørensen, Ole E, and Niels Borregaard. 2016. "Neutrophil Extracellular Traps — the Dark Side of Neutrophils." *Journal of Clinical Investigation* 126 (5): 1612–20. https://doi.org/10.1172/JCI84538.

Spitznagel, J. K. 1990. "Antibiotic Proteins of Human Neutrophils." *Journal of Clinical Investigation* 86 (5): 1381–86. https://doi.org/10.1172/JCI114851.

Spörri, Roman, Nicole Joller, Hubert Hilbi, and Annette Oxenius. 2008. "A Novel Role for Neutrophils As Critical Activators of NK Cells." *The Journal of Immunology* 181 (10): 7121–30. https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.10.712

1.

Spriggs, Melanie K, Pamela J Nevens, Kenneth Grabstein, Steven K Dower, David Cosman, Richard J Armitage, Catherine J Mcmahan, and John E Sims. 1992. “Melanie K. Spriggs,’” Pamela J. Nevens,’ Kenneth Grabstein, Steven K. Dower,2 David Cosman,’ Richard J. Armitage,3 Catherine J. McMahan,’ John E. Sims’.” *Steroids* 4 (2): 90–95.

Srivastava, Shivani, David Pelloso, Hailin Feng, Larry Voiles, David Lewis, Zdenka Haskova, Margaret Whitacre, et al. 2013. “Effects of Interleukin-18 on Natural Killer Cells: Costimulation of Activation through Fc Receptors for Immunoglobulin.” *Cancer Immunology, Immunotherapy* 62 (6): 1073–82. https://doi.org/10.1007/s00262-013-1403-0.

Staerck, Cindy, Amandine Gastebois, Patrick Vandeputte, Alphonse Calenda, Gérald Larcher, Louiza Gillmann, Nicolas Papon, Jean Philippe Bouchara, and Maxime J.J. Fleury. 2017. “Microbial Antioxidant Defense Enzymes.” *Microbial Pathogenesis* 110 (September): 56–65. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.06.015.

Stafforini, Diana M., Thomas M. McIntyre, Guy A. Zimmerman, and Stephen M. Prescott. 2003. “Platelet-Activating Factor, a Pleiotrophic Mediator of Physiological and Pathological Processes.” *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 40 (6): 643–72. https://doi.org/10.1080/714037693.

Stanford, William L., Salma Haque, Robert Alexander, Xuemei Liu, Anne M. Latour, H. Ralph Snodgrass, Beverly H. Koller, and Patrick M. Flood. 1997. “Altered Proliferative Response by T Lymphocytes of Ly-6A (Sca-1) Null Mice.” *Journal of Experimental Medicine* 186 (5): 705–17. https://doi.org/10.1084/jem.186.5.705.

Stark, Matthew A., Yuqing Huo, Tracy L. Burcin, Margaret A. Morris, Timothy S. Olson, and Klaus Ley. 2005. “Phagocytosis of Apoptotic Neutrophils Regulates Granulopoiesis via IL-23 and IL-17.” *Immunity* 22 (3): 285–94. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.01.011.

Stasia, Marie José, and Xing Jun Li. 2008. “Genetics and Immunopathology of Chronic Granulomatous Disease.” *Seminars in Immunopathology* 30 (3): 209–35. https://doi.org/10.1007/s00281-008-0121-8.

Stauffer, S., Y. Feng, F. Nebioglu, R. Heilig, P. Picotti, and A. Helenius. 2014. “Stepwise Priming by Acidic PH and a High K+ Concentration Is Required for Efficient Uncoating of Influenza A Virus Cores after Penetration.” *Journal of Virology* 88 (22): 13029–46. https://doi.org/10.1128/jvi.01430-14.

Stojkov, Darko, Poorya Amini, Kevin Oberson, Christiane Sokollik, Andrea Duppenthaler, Hans Uwe Simon, and Shida Yousefi. 2017. “ROS and Glutathionylation Balance Cytoskeletal Dynamics in Neutrophil Extracellular Trap Formation.” *Journal of Cell Biology* 216 (12): 4073–90. https://doi.org/10.1083/jcb.201611168.

Stringer, Kathleen A., Meghan Tobias, Heidi C. O’Neill, Christopher C. Franklin, Heidi C O, and Christopher C. Franklin. 2007. “Cigarette Smoke Extract-Induced Suppression of Caspase-3-like Activity Impairs Human Neutrophil Phagocytosis.” *American Journal of*

Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology 292 (6): 1572–79. https://doi.org/10.1152/ajplung.00325.2006.

Stříž, Ilja, and I. Trebichavský. 2004. "Calprotectin - A Pleiotropic Molecule in Acute and Chronic Inflammation." *Physiological Research* 53 (3): 245–53.

Su, Shuo, Xinliang Fu, Gairu Li, Fiona Kerlin, and Michael Veit. 2017. "Novel Influenza D Virus: Epidemiology, Pathology, Evolution and Biological Characteristics." *Virulence* 8 (8): 1580–91. https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1365216.

Su, Shuo, Min Gu, Di Liu, Jie Cui, George F. Gao, Jiyong Zhou, and Xiufan Liu. 2017. "Epidemiology, Evolution, and Pathogenesis of H7N9 Influenza Viruses in Five Epidemic Waves since 2013 in China." *Trends in Microbiology* 25 (9): 713–28. https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.06.008.

Su, Wen Chi, Yung Chia Chen, Chung Hsin Tseng, Paul Wei Che Hsu, Kuo Feng Tung, King Song Jeng, and Michael M.C. Lai. 2013. "Pooled RNAi Screen Identifies Ubiquitin Ligase Itch as Crucial for Influenza A Virus Release from the Endosome during Virus Entry." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (43): 17516–21. https://doi.org/10.1073/pnas.1312374110.

Summers, Charlotte, Sara M. Rankin, Alison M. Condliffe, Nanak Singh, A. Michael Peters, and Edwin R. Chilvers. 2010. "Neutrophil Kinetics in Health and Disease." *Trends in Immunology* 31 (8): 318–24. https://doi.org/10.1016/j.it.2010.05.006.

Sun, Jie, Rajat Madan, Christopher L. Karp, and Thomas J. Braciale. 2009. "Effector T Cells Control Lung Inflammation during Acute Influenza Virus Infection by Producing IL-10." *Nature Medicine* 15 (3): 277–84. https://doi.org/10.1038/nm.1929.

Sun, K., L. Torres, and D. W. Metzger. 2010. "A Detrimental Effect of Interleukin-10 on Protective Pulmonary Humoral Immunity during Primary Influenza A Virus Infection." *Journal of Virology* 84 (10): 5007–14. https://doi.org/10.1128/jvi.02408-09.

Suntres, Zacharias E., Abdelwahab Omri, and Pang N. Shek. 2002. "Pseudomonas Aeruginosa-Induced Lung Injury: Role of Oxidative Stress." *Microbial Pathogenesis* 32 (1): 27–34. https://doi.org/10.1006/mpat.2001.0475.

Swamydas, Muthulekha, Yi Luo, Martin E. Dorf, and Michail S. Lionakis. 2015. "Isolation of Mouse Neutrophils." *Current Protocols in Immunology* 2015: 3.20.1-3.20.15. https://doi.org/10.1002/0471142735.im0320s110.

Sweeney, Rob Mac, and Daniel F. McAuley. 2016. "Acute Respiratory Distress Syndrome." *The Lancet* 6736 (10058): 2416–30. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00578-X.

Szretter, K. J., S. Gangappa, X. Lu, C. Smith, W.-J. Shieh, S. R. Zaki, S. Sambhara, T. M. Tumpey, and J. M. Katz. 2007. "Role of Host Cytokine Responses in the Pathogenesis of Avian H5N1 Influenza Viruses in Mice." *Journal of Virology* 81 (6): 2736–44. https://doi.org/10.1128/jvi.02336-06.

T

Tak, Tamar, Tomasz P. Rygiel, Guruswamy Karnam, Okan W. Bastian, Louis Boon, Marco Viveen, Frank E. Coenjaerts, Linde Meyaard, Leo Koenderman, and Janesh Pillay. 2018. "Neutrophil-Mediated Suppression of Influenza-Induced Pathology Requires CD11b/CD18 (MAC-1)." *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 58 (4): 492–99. https://doi.org/10.1165/rcmb.2017-0021OC.

Tak, Tamar, Patrick Wijten, Marjolein Heeres, Peter Pickkers, Arjen Scholten, Albert J.R. R. Heck, Nienke Vrisekoop, et al. 2017. "Human CD62L Dim Neutrophils Identified as a Separate Subset by Proteome Profiling and in Vivo Pulse-Chase Labeling." *Blood* 129 (26): 3476–85. https://doi.org/10.1182/blood-2016-07-727669.

Takahashi, Ken, Taro Kawai, Himanshu Kumar, Shintaro Sato, Shin Yonehara, and Shizuo Akira. 2006. "Cutting Edge: Roles of Caspase-8 and Caspase-10 in Innate Immune Responses to Double-Stranded RNA." *The Journal of Immunology* 176 (8): 4520–24. https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.8.4520.

Takeuchi, Osamu, and Shizuo Akira. 2010. "Pattern Recognition Receptors and Inflammation." *Cell* 140 (6): 805–20. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022.

Tamassia, Nicola, Fabio Arruda-Silva, Federica Calzetti, Silvia Lonardi, Sara Gasperini, Elisa Gardiman, Francisco Bianchetto-Aguilera, et al. 2018. "A Reappraisal on the Potential Ability of Human Neutrophils to Express and Produce IL-17 Family Members in Vitro: Failure to Reproducibly Detect It." *Frontiers in Immunology* 9 (APR): 1–19. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00795.

Tamoutounour, Samira, Martin Guilliams, Frédéric MontananaSanchis, Hong Liu, Dorothea Terhorst, Camille Malosse, Emeline Pollet, et al. 2013. "Origins and Functional Specialization of Macrophages and of Conventional and Monocyte-Derived Dendritic Cells in Mouse Skin." *Immunity* 39 (5): 925–38. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.10.004.

Tang, Benjamin M., Maryam Shojaei, Sally Teoh, Adrienne Meyers, John Ho, T. Blake Ball, Yoav Keynan, et al. 2019. "Neutrophils-Related Host Factors Associated with Severe Disease and Fatality in Patients with Influenza Infection." *Nature Communications* 10 (1): 1–13. https://doi.org/10.1038/s41467-019-11249-y.

Tate, Michelle D., Andrew G. Brooks, Patrick C. Reading, and Justine D. Mintern. 2012. "Neutrophils Sustain Effective CD8+ T-Cell Responses in the Respiratory Tract Following Influenza Infection." *Immunology and Cell Biology* 90 (2): 197–205. https://doi.org/10.1038/icb.2011.26.

Tate, Michelle D., Y.-M. Yi-Mo Deng, Jessica E. Jones, Gary P. Anderson, Andrew G. Brooks, and Patrick C. Reading. 2009. "Neutrophils Ameliorate Lung Injury and the Development of Severe Disease during Influenza Infection." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 183 (11): 7441–50. https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902497.

Tate, Michelle D., Lisa J. Ioannidis, Ben Croker, Lorena E. Brown, Andrew G. Brooks, and Patrick C. Reading. 2011. "The Role of

Neutrophils during Mild and Severe Influenza Virus Infections of Mice." *PLoS ONE* 6 (3): 2–11. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017618.

Taubenberger, J. K., A. H. Reid, and T. G. Fanning. 2000. "The 1918 Influenza Virus: A Killer Comes into View." *Virology* 274 (2): 241–45. https://doi.org/10.1006/viro.2000.0495.

Tavares, Luciana P., Mauro M. Teixeira, and Cristiana C. Garcia. 2017. "The Inflammatory Response Triggered by Influenza Virus: A Two Edged Sword." *Inflammation Research* 66 (4): 283–302. https://doi.org/10.1007/s00011-016-0996-0.

Taylor, Patricia R., Sanhita Roy, Sixto M. Leal, Yan Sun, Scott J. Howell, Brian A. Cobb, Xiaoxia Li, and Eric Pearlman. 2014. "Activation of Neutrophils by Autocrine IL-17A-IL-17RC Interactions during Fungal Infection Is Regulated by IL-6, IL-23, RORγt and Dectin-2." *Nature Immunology* 15 (2): 143–51. https://doi.org/10.1038/ni.2797.

Tecchio, Cristina, and Marco A. Cassatella. 2016. "Neutrophil-Derived Chemokines on the Road to Immunity." *Seminars in Immunology* 28 (2): 119–28. https://doi.org/10.1016/j.smim.2016.04.003.

Tecle, Tesfaldet, Mitchell R. White, Don Gantz, Erika C. Crouch, and Kevan L. Hartshorn. 2007. "Human Neutrophil Defensins Increase Neutrophil Uptake of Influenza A Virus and Bacteria and Modify Virus-Induced Respiratory Burst Responses." *The Journal of Immunology* 178 (12): 8046–52. https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.12.8046.

Tellier, Raymond. 2009. "Aerosol Transmission of Influenza A Virus: A Review of New Studies." *Journal of the Royal Society Interface* 6 (SUPPL. 6). https://doi.org/10.1098/rsif.2009.0302.focus.

Thomas, Christina J., and Kate Schroder. 2013. "Pattern Recognition Receptor Function in Neutrophils." *Trends in Immunology* 34 (7): 317–28. https://doi.org/10.1016/j.it.2013.02.008.

Thomas, Richard James. 2013. "Particle Size and Pathogenicity in the Respiratory Tract." *Virulence* 4 (8): 847–58. https://doi.org/10.4161/viru.27172.

Tian, Feng, Yong Han, Jian Song, Jie Lei, Xiaolong Yan, Nianlin Xie, Jian Wang, et al. 2016. "Pulmonary Resident Neutrophils Regulate the Production of GM-CSF and Alveolar Macrophages." *FEBS Journal* 283 (8): 1465–74. https://doi.org/10.1111/febs.13684.

Tillack, Kati, Petra Breiden, Roland Martin, and Mireia Sospedra. 2012. "T Lymphocyte Priming by Neutrophil Extracellular Traps Links Innate and Adaptive Immune Responses." *The Journal of Immunology* 188 (7): 3150–59. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103414.

Tillman, Bryan W., Jeremy Kelly, Tara D. Richards, Alex F. Chen, Albert D. Donnenberg, Vera S. Donnenberg, and Edith Tzeng. 2016. "A Depleting Antibody toward Sca-1 Mitigates a Surge of CD34+/c-Kit+progenitors and Reduces Vascular Restenosis in a Murine Vascular Injury Model." *Journal of Vascular Surgery* 64 (4): 1084–92. https://doi.org/10.1016/j.jvs.2015.05.002.

Ting, A. T., F. X. Pimentel-Muiños, and B. Seed. 1996. "RIP Mediates Tumor Necrosis Factor Receptor 1 Activation of NF-KappaB but Not Fas/APO-1-

Initiated Apoptosis." *The EMBO Journal* 15 (22): 6189–96. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb01007.x.

Tourneur, Léa, and Véronique Witko-Sarsat. 2019. "Inflammasome Activation: Neutrophils Go Their Own Way." *Journal of Leukocyte Biology* 105 (3): 433–36. https://doi.org/10.1002/JLB.3CE1118-433R.

Towstyka, Nadia Yasmín, Carolina Maiumi Shiromizu, Irene Keitelman, Florencia Sabbione, Gabriela Verónica Salamone, Jorge Raúl Geffner, Analía Silvina Trevani, and Carolina Cristina Jancic. 2018. "Modulation of Γδ T-Cell Activation by Neutrophil Elastase." *Immunology* 153 (2): 225–37. https://doi.org/10.1111/imm.12835.

Trellakis, Sokratis, Kirsten Bruderek, Claudia A. Dumitru, Hossein Gholaman, Xiang Gu, Agnes Bankfalvi, André Scherag, et al. 2011. "Polymorphonuclear Granulocytes in Human Head and Neck Cancer: Enhanced Inflammatory Activity, Modulation by Cancer Cells and Expansion in Advanced Disease." *International Journal of Cancer* 129 (9): 2183–93. https://doi.org/10.1002/ijc.25892.

Tripathi, Shweta, Tesfaldet Tecle, Anamika Verma, Erika Crouch, Mitchell White, and Kevan L. Hartshorn. 2013. "The Human Cathelicidin LL-37 Inhibits Influenza a Viruses through a Mechanism Distinct from That of Surfactant Protein d or Defensins." *Journal of General Virology* 94 (PART11): 40–49. https://doi.org/10.1099/vir.0.045013-0.

Tripathi, Shweta, Mitchell R. White, and Kevan L. Hartshorn. 2015. "The Amazing Innate Immune Response to Influenza A Virus Infection." *Innate Immunity* 21 (1): 73–98. https://doi.org/10.1177/1753425913508992.

Troeger, Christopher, Brigette Blacker, Ibrahim A. Khalil, Puja C. Rao, Jackie Cao, Stephanie R.M. Zimsen, Samuel B. Albertson, et al. 2018. "Estimates of the Global, Regional, and National Morbidity, Mortality, and Aetiologies of Lower Respiratory Infections in 195 Countries, 1990–2016: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2016." *The Lancet Infectious Diseases* 18 (11): 1191–1210. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30310-4.

Troeger, Christopher E., Brigette F. Blacker, Ibrahim A. Khalil, Stephanie R.M. M Zimsen, Samuel B. Albertson, Degu Abate, Jemal Abdela, et al. 2018. "Mortality, Morbidity, and Hospitalisations Due to Influenza Lower Respiratory Tract Infections, 2017: An Analysis for the Global Burden of Disease Study 2017." *The Lancet Respiratory Medicine* 7 (1): 69–89. https://doi.org/10.1016/S2213-2600(18)30496-X.

Tsuboi, Naotake, Kenichi Asano, Michael Lauterbach, and Tanya N. Mayadas. 2008. "Human Neutrophil Fcγ Receptors Initiate and Play Specialized Nonredundant Roles in Antibody-Mediated Inflammatory Diseases." *Immunity* 28 (6): 833–46. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.04.013.

Turner, Martin, Edina Schweighoffer, Francesco Colucci, James P. Di Santo, and Victor L. Tybulewicz. 2000. "Tyrosine Kinase SYK: Essential Functions for Immunoreceptor Signalling." *Immunology Today* 21 (3): 148–54. https://doi.org/10.1016/S0167-5699(99)01574-1.

Turner, Stephen J., Elvia Olivas, Astrid Gutierrez, Gabriela Diaz, and Peter C. Doherty. 2007. " Disregulated Influenza A Virus-Specific CD8 + T Cell Homeostasis in the Absence of IFN-γ Signaling ." *The Journal of Immunology* 178 (12): 7616–22. https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.12.7616.

Tuttle, Kathryn D., S. Harsha Krovi, Jingjing Zhang, Romain Bedel, Laura Harmacek, Lisa K. Peterson, Leonard L. Dragone, et al. 2018. "TCR Signal Strength Controls Thymic Differentiation of INKT Cell Subsets." *Nature Communications* 9 (1): 2650. https://doi.org/10.1038/s41467-018-05026-6.

U

Uhl, Bernd, Yannick Vadlau, Gabriele Zuchtriegel, Katharina Nekolla, Kariem Sharaf, Florian Gaertner, Steffen Massberg, Fritz Krombach, and Christoph A Reichel. 2016. "Aged Neutrophils Contribute to the First Line of Defense in the Acute Inflammatory Response." *Blood* 128 (19): 2327–37. https://doi.org/10.1182/blood-2016-05-718999.

Unkel, Barbara, Katrin Hoegner, Björn E. Clausen, Peter Lewe-Schlosser, Johannes Bodner, Stefan Gattenloehner, Hermann Janßen, Werner Seeger, Juergen Lohmeyer, and Susanne Herold. 2012. "Alveolar Epithelial Cells Orchestrate DC Function in Murine Viral Pneumonia." *Journal of Clinical Investigation* 122 (10): 3652–64. https://doi.org/10.1172/JCI62139.

Upadhyay, Geeta, Yuzhi Yin, Hongyan Yuan, Xin Li, Rik Derynck, and Robert I. Glazer. 2011. "Stem Cell Antigen-1 Enhances Tumorigenicity by Disruption of Growth Differentiation Factor-10 (GDF10)-Dependent TGF- Signaling." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (19): 7820–25. https://doi.org/10.1073/pnas.1103441108.

Utomo, Ahmad, Xavier Cullere, Michael Glogauer, Wojciech Swat, and Tanya N. Mayadas. 2006. "Vav Proteins in Neutrophils Are Required for FcγR-Mediated Signaling to Rac GTPases and Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase Component P40(Phox)." *The Journal of Immunology* 177 (9): 6388–97. https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.9.6388.

V

Valleron, Alain Jacques, Anne Cori, Sophie Valtat, Sofia Meurisse, Fabrice Carrat, and Pierre Yves Boëlle. 2010. "Transmissibility and Geographic Spread of the 1889 Influenza Pandemic." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (19): 8778–81. https://doi.org/10.1073/pnas.1000886107.

Varga, Zsuzsanna T., and Peter Palese. 2011. "The Influenza A Virus Protein PB1-F2: Killing Two Birds with One Stone?" *Virulence* 2 (6): 542–46. https://doi.org/10.4161/viru.2.6.17812.

Veen, Betty S. van der, Menno P.J. de Winther, and Peter Heeringa. 2009. "Myeloperoxidase: Molecular Mechanisms of Action and Their Relevance to Human Health and Disease." *Antioxidants & Redox Signaling* 11 (11): 2899–2937. https://doi.org/10.1089/ars.2009.2538.

Vella, Antonio, Paolo Bellavite, Alessandra Adami, Riccardo Ortolani, Giuseppina Benoni, Antonio Carletto, Domenico Biasi, et al. 1999.

"Expression of FCεII/CD23 on Human Neutrophils Isolated from Rheumatoid Arthritis Patients." *Inflammation* 23 (5): 471–79. https://doi.org/10.1023/A:1021969127489.

Viboud, Cécile, and Lone Simonsen. 2012. "Global Mortality of 2009 Pandemic Influenza A H1N1." *The Lancet Infectious Diseases* 12 (9): 651–53. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70152-4.

Vidy, Aurore, Pauline Maisonnasse, Bruno Da Costa, Bernard Delmas, Christophe Chevalier, and Ronan Le Goffic. 2016. "The Influenza Virus Protein PB1-F2 Increases Viral Pathogenesis through Neutrophil Recruitment and NK Cells Inhibition." *PLoS ONE* 11 (10): 1–19. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165361.

Vietinghoff, Sibylle von, and Klaus Ley. 2008. "Homeostatic Regulation of Blood Neutrophil Counts." *The Journal of Immunology* 181 (8): 5183–88. https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.8.5183.

Vines, Angela, K Wells, Mikhail Matrosovich, Maria R Castrucci, Toshihiro Ito, Yoshihiro Kawaoka, † Krisna Wells, et al. 1998. "The Role of Influenza A Virus Hemagglutinin Residues 226 and 228 in Receptor Specificity and Host Range Restriction." *Journal of Virology* 72 (9): 7626–31. http://jvi.asm.org/.

Vlugt, Corey De, Dorota Sikora, and Martin Pelchat. 2018. "Insight into Influenza: A Virus Cap-Snatching." *Viruses* 10 (11). https://doi.org/10.3390/v10110641.

Vono, Maria, Ang Lin, Anna Norrby-Teglund, Richard A. Koup, Frank Liang, Karin Loré, Lor´ Loré, Maria Vono, Ang Lin, and Anna Norrby-Teglund. 2017. "Neutrophils Acquire the Capacity for Antigen Presentation to Memory CD4 + T Cells in Vitro and Ex Vivo." *Blood* 129 (14): 1991–2001. https://doi.org/10.1182/blood-2016-10-744441.

W

Walasek, Marta A., Leonid V. Bystrykh, Sandra Olthof, Gerald de Haan, and Ronald Van Os. 2013. "Sca-1 Is an Early-Response Target of Histone Deacetylase Inhibitors and Marks Hematopoietic Cells with Enhanced Function." *Experimental Hematology* 41 (1): 113-123.e2. https://doi.org/10.1016/j.exphem.2012.09.004.

Wareing, Mark D., Ashley L. Shea, Chandra A. Inglis, Peter B. Dias, and Sally R. Sarawar. 2007. "CXCR2 Is Required for Neutrophil Recruitment to the Lung during Influenza Virus Infection, but Is Not Essential for Viral Clearance." *Viral Immunology* 20 (3): 369–77. https://doi.org/10.1089/vim.2006.0101.

Warnatsch, A., M. Ioannou, Q. Wang, and V. Papayannopoulos. 2015. "Neutrophil Extracellular Traps License Macrophages for Cytokine Production in Atherosclerosis." *Science* 349 (6245): 316–20. https://doi.org/10.1126/science.aaa8064.

Waterhouse, Nigel J., Karin A. Sedelies, Kylie A. Browne, Michelle E. Wowk, Andrea Newbold, Vivien R. Sutton, Chris J.P. Clarke, et al. 2005. "A Central Role for Bid in Granzyme B-Induced Apoptosis." *Journal of Biological Chemistry* 280 (6): 4476–82. https://doi.org/10.1074/jbc.M410985200.

Weber-Gerlach, Michaela, and Friedemann Weber. 2016. “To Conquer the Host, Influenza Virus Is Packing It In: Interferon-Antagonistic Strategies beyond NS1.” *Journal of Virology* 90 (19): 8389–94. https://doi.org/10.1128/jvi.00041-16.

Webster, Robert G. 1999. “1918 Spanish Influenza: The Secrets Remain Elusive.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (4): 1164–66. https://doi.org/10.1073/pnas.96.4.1164.

Weinrauch, Yvette, Doreen Drujan, Steven D. Shapiro, Jerrold Weiss, and Arturo Zychlinsky. 2002. “Neutrophil Elastase Targets Virulence Factors of Enterobacteria.” *Nature* 417 (6884): 91–94. https://doi.org/10.1038/417091a.

Weiskopf, Kipp, Peter J Schnorr, Wendy W Pang, Mark P Chao, Akanksha Chhabra, J U N Seita, Mingye Feng, and Irving L Weissman. 2016. “Myeloid Cell Origins, Differentiation, and Clinical Implications.” *Microbiology Spectrum* 4 (5): 1–18. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MCHD-0031-2016.

Weiss, Ido D., Ori Wald, Hanna Wald, Katia Beider, Michal Abraham, Eithan Galun, Arnon Nagler, and Amnon Peled. 2010. “IFN-γ Treatment at Early Stages of Influenza Virus Infection Protects Mice from Death in a NK Cell-Dependent Manner.” *Journal of Interferon and Cytokine Research* 30 (6): 439–49. https://doi.org/10.1089/jir.2009.0084.

Werner, Jessica L., Melissa A. Gessner, Lauren M. Lilly, Michael P. Nelson, Allison E. Metz, Dawn Horn, Chad W. Dunaway, et al. 2011. “Neutrophils Produce Interleukin 17A (IL-17A) in a Dectin-1- and IL-23-Dependent Manner during Invasive Fungal Infection.” *Infection and Immunity* 79 (10): 3966–77. https://doi.org/10.1128/IAI.05493-11.

White, J., J. Kartenbeck, and A. Helenius. 1982. “Membrane Fusion Activity of Influenza Virus.” *The EMBO Journal* 1 (2): 217–22. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1982.tb01150.x.

Whitmire, Jason K., Boreth Eam, and J. Lindsay Whitton. 2009. “Mice Deficient in Stem Cell Antigen-1 (Sca1, Ly-6A/E) Develop Normal Primary and Memory CD4+ and CD8+ T-Cell Responses to Virus Infection.” *European Journal of Immunology* 39 (6): 1494–1504. https://doi.org/10.1002/eji.200838959.

Wiley, James A., Adelheid Cerwenka, Jack R. Harkema, Richard W. Dutton, and Allen G. Harmsen. 2001. “Production of Interferon-γ by Influenza Hemagglutinin-Specific CD8 Effector T Cells Influences the Development of Pulmonary Immunopathology.” *American Journal of Pathology* 158 (1): 119–30. https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63950-8.

Wilson, Sarah S., Mayim E. Wiens, and Jason G. Smith. 2013. “Antiviral Mechanisms of Human Defensins.” *Journal of Molecular Biology* 425 (24): 4965–80. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.09.038.

Wimmer, Nadin, Barbara Huber, Nicola Barabas, Johann Röhrl, Klaus Pfeffer, and Thomas Hehlgans. 2012. “Lymphotoxin β Receptor Activation on Macrophages Induces Cross-Tolerance to TLR4 and TLR9 Ligands.” *The Journal of Immunology* 188 (7): 3426–33. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103324.

Wingender, Gerhard, Marcus Hiss, Isaac Engel,

Konrad Peukert, Klaus Ley, Hermann Haller, Mitchell Kronenberg, and Sibylle von Vietinghoff. 2012. “Neutrophilic Granulocytes Modulate Invariant NKT Cell Function in Mice and Humans.” *The Journal of Immunology* 188 (7): 3000–3008. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101273.

Wise, H. M., A. Foeglein, J. Sun, R. M. Dalton, S. Patel, W. Howard, E. C. Anderson, W. S. Barclay, and P. Digard. 2009. “A Complicated Message: Identification of a Novel PB1-Related Protein Translated from Influenza A Virus Segment 2 MRNA.” *Journal of Virology* 83 (16): 8021–31. https://doi.org/10.1128/jvi.00826-09.

Wise, Helen M., Edward C. Hutchinson, Brett W. Jagger, Amanda D. Stuart, Zi H. Kang, Nicole Robb, Louis M. Schwartzman, et al. 2012. “Identification of a Novel Splice Variant Form of the Influenza A Virus M2 Ion Channel with an Antigenically Distinct Ectodomain.” *PLoS Pathogens* 8 (11). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002998.

Wolters, Paul J., Charlie Wray, Rachel E. Sutherland, Sophia S. Kim, Jon Koff, Ying Mao, and James A. Frank. 2009. “Neutrophil-Derived IL-6 Limits Alveolar Barrier Disruption in Experimental Ventilator-Induced Lung Injury.” *The Journal of Immunology* 182 (12): 8056–62. https://doi.org/10.4049/jimmunol.0801323.

Worobey, Michael, Guan Zhu G.-Z. Han, and Andrew Rambaut. 2014a. “Genesis and Pathogenesis of the 1918 Pandemic H1N1 Influenza A Virus.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (22): 8107–12. https://doi.org/10.1073/pnas.1324197111.

Worobey, Michael, Guan Zhu Han, and Andrew Rambaut. 2014b. “A Synchronized Global Sweep of the Internal Genes of Modern Avian Influenza Virus.” *Nature* 508 (7495): 254–57. https://doi.org/10.1038/nature13016.

Wu, Zu Qun, Yi Zhang, Na Zhao, Zhao Yu, Hao Pan, Ta Chien Chan, Zhi Ruo Zhang, and She Lan Liu. 2017. “Comparative Epidemiology of Human Fatal Infections with Novel, High (H5N6 and H5N1) and Low (H7N9 and H9N2) Pathogenicity Avian Influenza a Viruses.” *International Journal of Environmental Research and Public Health* 14 (3): 1–20. https://doi.org/10.3390/ijerph14030263.

X

Xia, Zong Ping, Lijun Sun, Xiang Chen, Gabriel Pineda, Xiaomo Jiang, Anirban Adhikari, Wenwen Zeng, and Zhijian J. Chen. 2009. “Direct Activation of Protein Kinases by Unanchored Polyubiquitin Chains.” *Nature* 461 (7260): 114–19. https://doi.org/10.1038/nature08247.

Xu, Xiyan, Catherine B. B Smith, Bruce A. A Mungall, Stephen E. E Lindstrom, Henrietta E. E Hall, Kanta Subbarao, Nancy J. J Cox, and Alexander Klimov. 2002. “Intercontinental Circulation of Human Influenza A(H1N2) Reassortant Viruses during the 2001–2002 Influenza Season.” *The Journal of Infectious Diseases* 186 (10): 1490–93. https://doi.org/10.1086/344738.

Y

Yamamoto, K., K. Suzuki, K Suzuklt, S Mizunot, K. Suzuki, S. Mizuno, K Suzuklt, and S Mizunot. 1989. “Phagocytosis and Ingestion of Influenza Virus by Human Polymorphonuclear Leucocytes in Vitro: Electronmicroscopy Studies.” *Journal of Medical Microbiology* 28 (3): 191–98.

https://doi.org/10.1099/00222615-28-3-191.

Yamasaki, Sho, Makoto Matsumoto, Osamu Takeuchi, Tetsuhiro Matsuzawa, Eri Ishikawa, Machie Sakuma, Hiroaki Tateno, et al. 2009. "C-Type Lectin Mincle Is an Activating Receptor for Pathogenic Fungus, Malassezia." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (6): 1897–1902. https://doi.org/10.1073/pnas.0805177106.

Yang, Chiao-Wen, Beverly S. I. Strong, Mark J. Miller, and Emil R. Unanue. 2010. "Neutrophils Influence the Level of Antigen Presentation during the Immune Response to Protein Antigens in Adjuvants." *The Journal of Immunology* 185 (5): 2927–34. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001289.

Ye, Zhiping, Teresa Liu, D P Offringa, J McInnis, and R A Levandowski. 1999. "Association of Influenza Virus Matrix Protein with Ribonucleoproteins." *Journal of Virology* 73 (9): 7467–73. https://doi.org/10.1006/viro.2002.1669.

Yipp, Bryan G., Björn Petri, Davide Salina, Craig N. Jenne, Brittney N.V. Scott, Lori D. Zbytnuik, Keir Pittman, et al. 2012. "Infection-Induced NETosis Is a Dynamic Process Involving Neutrophil Multitasking in Vivo." *Nature Medicine* 18 (9): 1386–93. https://doi.org/10.1038/nm.2847.

Yipp, Bryan G, and Paul Kubes. 2013. "NETosis: How Vital Is It?" *Blood* 122 (16): 2784–94. https://doi.org/10.1182/blood-2013-04-457671.

Yoon, Sun Woo, Richard J. Webby, and Robert G. Webster. 2014. "Evolution and Ecology of Influenza a Viruses." *Current Topics in Microbiology and Immunology* 385 (1): 359–75. https://doi.org/10.1007/82_2014_396.

Yousefi, Shida, and Hans Uwe Simon. 2016. "NETosis - Does It Really Represent Nature's 'Suicide Bomber'?" *Frontiers in Immunology* 7 (AUG): 1–4. https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00328.

Yousefi, Shida, Darko Stojkov, Nina Germic, Dagmar Simon, Xiaoliang Wang, Charaf Benarafa, and Hans Uwe Simon. 2019. "Untangling 'NETosis' from NETs." *European Journal of Immunology* 49 (2): 221–27. https://doi.org/10.1002/eji.201747053.

Yutoku, M, A L Grossberg, and D Pressman. 1974. "A Cell Surface Antigenic Determinant Present on Mouse Plasmacytes and Only about Half of Mouse Thymocytes." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 112 (5): 1774–81. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4131875.

Z

Zea, Arnold H., Kirk S. Culotta, Juzar Ali, Carol Mason, Hae-Joon Park, Jovanny Zabaleta, Luis F. Garcia, and Augusto C. Ochoa. 2006. "Decreased Expression of CD3ζ and Nuclear Transcription Factor KB in Patients with Pulmonary Tuberculosis: Potential Mechanisms and Reversibility with Treatment." *The Journal of Infectious Diseases* 194 (10): 1385–93. https://doi.org/10.1086/508200.

Zegeye, Mulugeta M., Madelene Lindkvist, Knut Fälker, Ashok K. Kumawat, Geena Paramel, Magnus Grenegård, Allan Sirsjö, and Liza U. Ljungberg. 2018. "Activation of the JAK/STAT3 and PI3K/AKT Pathways Are Crucial for IL-6 Trans-Signaling-Mediated pro-Inflammatory

Response in Human Vascular Endothelial Cells." *Cell Communication and Signaling* 16 (1): 1–10. https://doi.org/10.1186/s12964-018-0268-4.

Zhang, Hongfeng, and Weiguo Xiao. 2017. "TNFR1 and TNFR2 Differentially Mediate TNF-α-Induced Inflammatory Responses in Rheumatoid Arthritis Fibroblast-like Synoviocytes." *Cell Biology International* 41 (4): 415–22. https://doi.org/10.1002/cbin.10735.

Zhang, Xu, and Wenrong Xu. 2017. "Neutrophils Diminish T-Cell Immunity to Foster Gastric Cancer Progression: The Role of GM-CSF/PD-L1/PD-1 Signalling Pathway." *Gut* 66 (11): 1878–80. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-313923.

Zhou, Shao Lai, Zheng Jun Zhou, Zhi Qiang Hu, Xiao Wu Huang, Zheng Wang, Er Bao Chen, Jia Fan, Ya Cao, Zhi Dai, and Jian Zhou. 2016. "Tumor-Associated Neutrophils Recruit Macrophages and T-Regulatory Cells to Promote Progression of Hepatocellular Carcinoma and Resistance to Sorafenib." *Gastroenterology* 150 (7): 1646-1658.e17. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.02.040.

Zigmond, Ehud, Chen Varol, Julia Farache, Elinor Elmaliah, Ansuman T. Satpathy, Gilgi Friedlander, Matthias Mack, et al. 2012. "Ly6C Hi Monocytes in the Inflamed Colon Give Rise to Proinflammatory Effector Cells and Migratory Antigen-Presenting Cells." *Immunity* 37 (6): 1076–90. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.08.026.

Annexe

MucosalImmunology

www.nature.com/mi

ARTICLE

Interleukin-7 protects against bacterial respiratory infection by promoting IL-17A-producing innate T-cell response

Maya Hassane[1], Youenn Jouan[2,3,4], Florent Creusat[2,3], Daphnée Soulard[1], Chloé Boisseau[2,3], Loïc Gonzalez[2,3], Emmanuel C. Patin[1], Nathalie Heuzé-Vourc'h[2,3], Jean-Claude Sirard[1], Christelle Faveeuw[1], François Trottein[1], Mustapha Si-Tahar[2,3], Thomas Baranek[2,3] and Christophe Paget[1,2,3]

Q1 Interleukin-7 (IL-7) is a critical cytokine in B- and T-lymphocyte development and maturation. Recent evidence suggests that IL-7 is a preferential homeostatic and survival factor for RORγt$^+$ innate T cells such as natural killer T (NKT) cells, γδT cells, and mucosal-associated invariant T (MAIT) cells in the periphery. Given the important contribution of these populations in antibacterial immunity at barrier sites, we questioned whether IL-7 could be instrumental in boosting the local host immune response against respiratory bacterial infection. By using a cytokine–monoclonal antibody approach, we illustrated a role for topical IL-7 delivery in increasing the pool of RORγt$^+$ IL-17A-producing innate T cells. Prophylactic IL-7 treatment prior to *Streptococcus pneumoniae* infection led to better bacterial containment, a process associated with increased neutrophilia and that depended on γδT cells and IL-17A. Last, combined delivery of IL-7 and α-galactosylceramide (α-GalCer), a potent agonist for invariant NKT (*i*NKT) cells, conferred an almost total protection in terms of survival, an effect associated with enhanced IL-17 production by innate T cells and neutrophilia. Collectively, we provide a proof of concept that IL-7 enables fine-tuning of innate T- cell functions. This might pave the way for considering IL-7 as an innovative "biodrug" against bacterial infection.

Mucosal Immunology _####################_; https://doi.org/10.1038/s41385-019-0212-y

INTRODUCTION

Innate T cells represent a class of thymus-derived T lymphocytes that comprise three main lineages, namely natural killer T (NKT) cells, γδT cells, and mucosal-associated invariant T (MAIT) cells.[1] These preset cells play a role in a large panel of immune responses including cancer, infection, inflammation, and metabolic disorders.[2–5] This is mainly due to their versatile nature including immunomodulation and cytotoxic properties. In this respect, attempts to harness their functions for therapeutic purposes are currently under intense investigation. Selective exogenous activation of innate T-cell subsets has been rendered possible by using various T-cell receptor (TCR)-specific antigens (Ags) of non-peptide nature.[6–9] For instance, the glycolipid α-galactosylceramide (α-GalCer), a potent and selective Ag for invariant NKT (*i*NKT) cells, has proven fruitful in preclinical models of cancer and infection.[7,10] Prophylactic i.n. instillation of α-GalCer protects mice in various models of lung infections, including pneumococcus-induced pneumonia,[11,12] a mechanism that relies on cognate *i*NKT cell activation and transactivation of innate effector cells such as neutrophils.[12] However, the possibility to harness all innate T-cell lineages at once (e.g., by using a combination of specific Ags or a Q2 universal innate T-cell activator) has never been explored.

Interleukin-7 (IL-7) is a pleiotropic cytokine, mainly produced by stromal cells,[13] that greatly contributes to B- and T-cell development in primary lymphoid organs, as well as the regulation of mature T-cell proliferation in the periphery.[14] IL-7 signals through a heterodimer receptor (IL-7R) consisting of two chains: the α chain (CD127) and the common γ chain (CD132), which is shared with many other cytokine receptors.[15] Several IL-7-based clinical studies have been initiated in various conditions including bone marrow transplantation, cancer, sepsis, and chronic viral infections.[16] While IL-7 treatment appears to ameliorate the clinical outcomes,[16] its systemic administration has been often associated with side effects.[17] These secondary effects are likely a consequence of the high doses injected to achieve a biological response, considering the relatively short half-life of the protein.[18] To deal with this major drawback, various approaches have been attempted to increase in vivo IL-7 half-life. Among those, binding of IL-7 to an anti-IL-7 mAb prior to in vivo administration was shown to increase its biological activity and pharmacokinetics.[19] Q3 Q4

Interestingly, IL-7 has been shown as an important factor for RAR-related orphan receptor gamma t (RORγt)$^+$ IL-17-producing innate T-cell survival and homeostasis in the periphery including γδT17[20] and *i*NKT17[21] cells. An earlier study also revealed that IL-7 could increase IL-4 production by splenic *i*NKT-like cells.[22] In addition, recent evidence points toward a preferential role for IL-7 in MAIT17 cells biology.[23–26] This preferential response relies in large part on the high-density surface expression of IL-7R (CD127) on these subsets, awarding them an undeniable advantage to uptake the limited levels of IL-7 in non-lymphoid tissues.

[1]Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, Inserm U1019, CNRS UMR 8204, University of Lille, CHU Lille- Institut Pasteur de Lille, 59000 Lille, France; [2]INSERM, Centre d'Etude des Pathologies Respiratoires (CEPR), UMR, 1100 Tours, France; [3]Université de Tours, Faculté de Médecine de Tours, Tours, France and [4]Service de Médecine Intensive et Réanimation, Centre Hospitalier Régional Universitaire, Tours, France
Correspondence: Christophe Paget (christophe.paget@inserm.fr)
These authors contributed equally: Maya Hassane, Youenn Jouan

Received: 29 May 2019 Revised: 24 September 2019 Accepted: 28 September 2019

© Society for Mucosal Immunology 2019

Mechanistically, IL-7R signaling in these cells led to the engagement of either STAT3[20,25] (for γδT17 and MAIT17 cells) or the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway[21] (for *i*NKT cells) culminating in enhanced survival and proliferation. Given the contribution of IL-17-producing innate T cells in antimicrobial response at barrier sites,[27,28] we hypothesized that local IL-7 pretreatment could bolster, in an innate T-cell-dependent manner, host defense against bacterial respiratory tract infection.

We demonstrate that intranasal (i.n.) instillation of IL-7/anti-IL-7 complex to naive mice increased the cellular pool of lung IL-17A-producing innate T cells, with no detectable systemic effects. Upon *Streptococcus pneumoniae* infection, IL-7 pretreatment instigates an innate IL-17A-enriched environment into the lungs that boosts the early host antibacterial response. In addition, the combination of IL-7 with α-GalCer conferred better protection against lethal pneumonia compared with stand-alone treatments. We conclude that IL-7 can be instrumental to locally manipulate pulmonary innate T-cell functions, an observation that could be the basis for future strategies to fight against lethal bacterial infections.

RESULTS

Intranasal instillation of IL-7/M25 complex induces proliferation of lung RORγt$^+$ innate T cells

To investigate the effects of IL-7 instillation on lung lymphocyte homeostasis, we treated naive mice with the IL-7/M25 complex by the i.n. route (Fig. 1a). Three days after treatment cessation, we assessed the frequency and absolute number of lung immune populations. IL-7/M25 treatment did not influence the total number of live leukocytes or affect the relative proportion of conventional B and T cells in the lung tissue (Supplementary Fig. 1a, b). In contrast, it induced a significant increase in the three innate T-cell lineages, namely *i*NKT cells, γδT cells, and MAIT cells (Fig. 1b) by 2.1-, 3.3-, and 8.8-fold, respectively. Of note, stand-alone treatments with IL-7 or anti-IL-7 (M25) did not induce any modulation in innate T-cell frequencies (Supplementary Fig. 1c). Regarding the potential side effects associated with IL-7,[17] it is worth mentioning that this treatment did not lead to measurable signs of hepatic toxicity (Supplementary Fig. 1d).

These differential effects on innate T-cell lineages may be linked to their divergent constitutive expression of IL-7R (CD127) (Supplementary Fig. 1e). Furthermore, consistent with CD127 expression (Fig. 1c), IL-7/M25 treatment preferentially increased RORγt$^+$ innate T cells, although an effect was also observed on their RORγt$^-$ counterparts (Fig. 1d). It is worth mentioning that the effect observed on RORγt$^-$ cells was restricted to the T-bet$^-$ subset (Supplementary Fig. 1f).

Consistent with a proliferative effect for IL-7,[20,21] innate T cells displayed higher levels of Ki67 upon IL-7/M25 treatment (Supplementary Fig. 1g). Importantly, this effect was observed on both RORγt$^-$ and RORγt$^+$ *i*NKT and γδT cells early after treatment cessation, but was restricted to the RORγt$^+$ subsets later on (Fig. 1e). Of note, reminiscent with their higher constitutive expression of CD127 (Fig. 1c), both RORγt$^-$ and RORγt$^+$ MAIT cells conserved a phenotype of proliferative cells even 3 days after IL-7/M25 treatment (Fig. 1e).

The elevated frequency of RORγt$^+$ innate T cells was sustained over 2 weeks after treatment cessation, while the effect on their RORγt$^-$ counterparts appeared more transient (Fig. 1f). In addition, no modulation in total innate T-cell frequencies or RORγt$^{+/-}$ subset proportions was detected in the spleen of IL-7/M25-treated mice (Supplementary Fig. 1h) suggesting a local effect. Altogether, these results indicate that i.n. instillation of IL-7/M25 leads to a local and prolonged elevated frequency/number of lung RORγt$^+$ innate T cells, an effect likely due to enhanced proliferation.

IL-7 treatment increases the capacity of pulmonary innate T cells to produce IL-17A

To assess the effects of IL-7/M25 treatment on innate T cell's cytokine profile, total lung leukocytes from control or IL-7/M25-treated mice were stimulated ex vivo by using PMA/ionomycin for 4 h. Intracellular staining indicated increased frequency (Fig. 2a) and absolute numbers (Fig. 2b) of IL-17A-producing innate T cells in lungs from IL-7/M25-treated mice. On the other hand, IFN-γ production by innate T cells was unchanged upon IL-7/M25 treatment (Supplementary Fig. 2a). In addition, the relative proportions of IL-17A-producing innate T-cell populations were unchanged upon IL-7/M25 treatment, suggesting no significant preferential effects on a peculiar lineage (Fig. 2c). Of note, no significant production of IL-17A$^+$ by innate T cells could be observed between groups without restimulation (Supplementary Fig. 2b), suggesting that IL-7 supports their homeostasis rather than providing activation cues. In line, in vitro stimulation of total lung mononuclear cells from IL-7/M25-treated mice resulted in higher levels of IL-17A, but not IFN-γ in culture supernatants compared with controls (Fig. 2d). To assess the relative contribution of innate T-cell lineages in this pro-IL-17A effect, lung leukocytes from saline- or IL-7/M25-treated WT, γδT cell-deficient (*Tcrd*$^{-/-}$), and *i*NKT cell-deficient (*Traj18*$^{-/-}$) mice were stimulated ex vivo. While both γδT cell- and *i*NKT cell deficiencies significantly reduced IL-17A production in PBS-treated mice, the IL-7-driven pro-IL-17A effect was significantly reduced in *Tcrd*$^{-/-}$ mice while being only slightly impacted in *Ja18*$^{-/-}$ mice (Fig. 2e). Collectively, our data suggest that IL-7/M25 treatment increases IL-17A secretion in lungs, an effect partially dependent on γδT cells.

IL-7/M25 treatment increases IL-17A production by innate T cells in response to pneumococcal infection

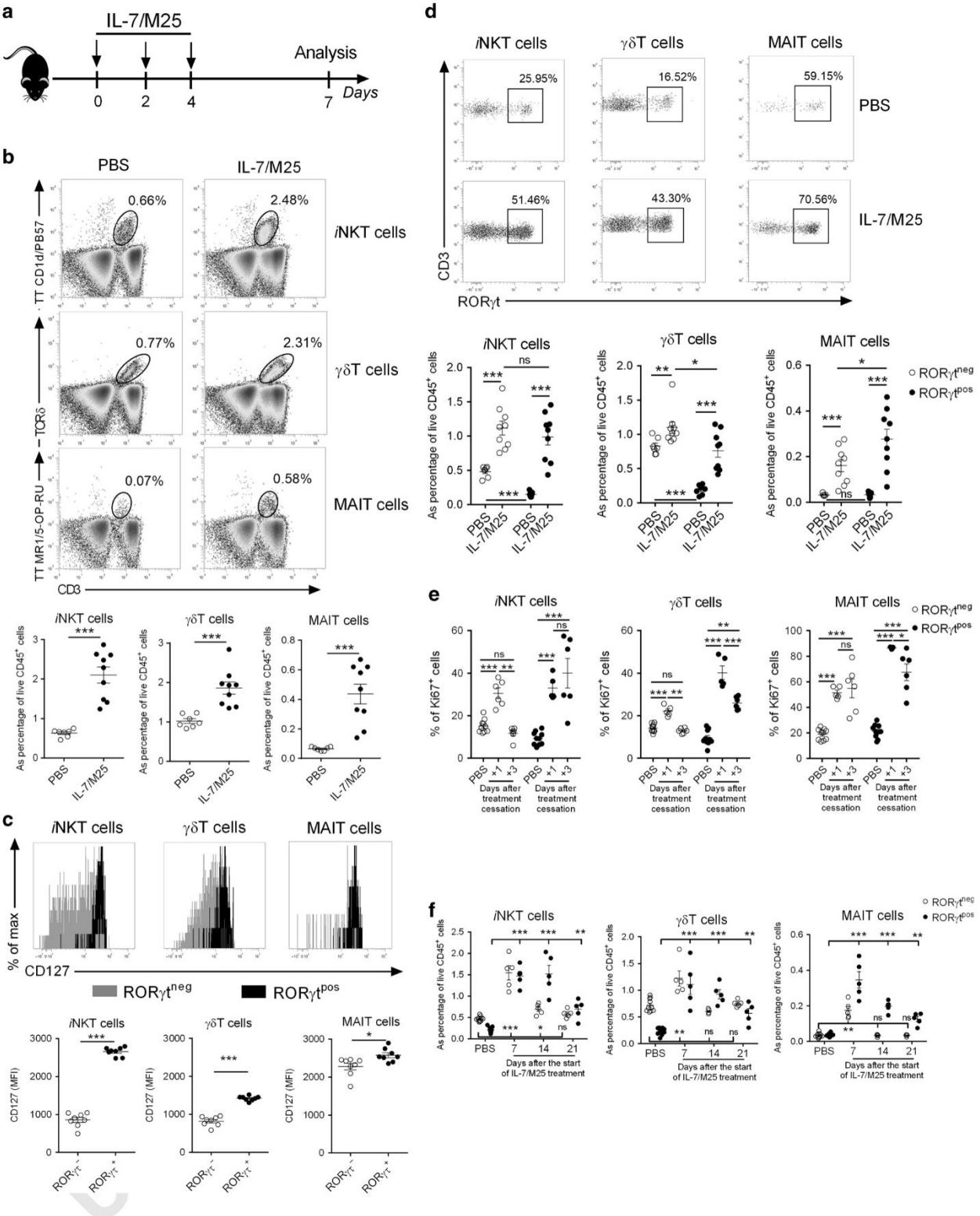
Early IL-17A production by innate T cells is essential for bacterial containment and mouse survival during pneumococcal infection.[11,29–33] Thus, we assessed the effects of IL-7/M25 on host innate immune response to pneumococcus-induced pneumonia, by using a pathogenic strain of *S. pneumoniae* serotype 1, a major serotype associated with invasive disease in humans.[34] By using intracellular cytokine staining, we observed that innate T cells were able to produce IL-17A following *S. pneumoniae* infection (Fig. 3a). An increase in the relative proportion and absolute number of IL-17A-producing innate T cells was observed in IL-7/M25-pretreated infected mice (Fig. 3a). Of note, the relative proportion of IL-17A-producing MAIT cells was not influenced upon treatment (Fig. 3a). On the other hand, no change in IFN-γ-producing innate T cells was observed upon IL-7/M25 treatment (Fig. 3b).

IL-23 and IL-1β greatly contribute to IL-17A production by innate T cells.[25,35,36] Of note, IL-7/M25 pretreatment did not modulate the levels of these cytokines in the lungs of infected mice (Fig. 3c). In line with the positive effect of IL-17A on neutrophil recruitment,[37] we observed higher levels of the neutrophil chemoattractant CXCL1 in lung homogenates of IL-7/M25-treated infected mice (Fig. 3d). In addition, a higher number of neutrophils (Fig. 3e) and increased myeloperoxidase release (Fig. 3f) were detected in the lung of IL-7/M25-pretreated infected mice. Taken as a whole, these results indicate that IL-7/M25 prophylactic treatment leads to an increase in IL-17A production by innate T cells and neutrophil recruitment/activity upon *S. pneumoniae* infection.

IL-7/M25 treatment reduces bacterial burden in an IL-17A-, neutrophil-, and γδT cell-dependent manner

In addition to the immunological parameters, we also evaluated the outcome of IL-7/M25 pretreatment on bacterial burden and survival following lethal pneumococcus-induced pneumonia. IL-7/M25 treatment significantly reduced bacterial burden in the lungs as well as bacterial dissemination (Fig. 4a). Of note, the anti-

UNCORRECTED PROOF



pneumococcus effect could still be observed in mice that were infected a week after treatment cessation (Supplementary Fig. 3a). To address the mechanisms involved in this antibacterial response, *Il17a*$^{-/-}$ mice were pretreated with IL-7/M25 before *S. pneumoniae* infection. The protective effect of IL-7/M25 on bacterial loads was abrogated in *Il17a*$^{-/-}$ mice (Fig. 4b). Since neutrophils greatly contribute to pneumococcus clearance, the antibacterial effect of IL-7/M25 pretreatment was evaluated in the absence of neutrophils. Neutrophil depletion in saline-treated controls led to enhanced bacterial outgrowth in lungs and spleen (Fig. 4c). In addition, the protective antibacterial effect of IL-7/M25 was blunted in the absence of neutrophils (Fig. 4c). As our data suggest a preferential role for γδT cells in the pro-IL-17A effect mediated by IL-7/M25 (Fig. 2e), we evaluated their contribution in

SPRINGER NATURE
SOCIETY FOR MUCOSAL IMMUNOLOGY

Fig. 1 Intranasal instillation of IL-7/M25 potentiates IL-17A-producing lung innate T cells. **a** WT C57BL/6J mice received three intranasal doses of IL-7/M25 or saline every other day. Mice were euthanized at day 7, and organs were collected for further analysis. **b–h** Mice were treated as depicted in panel **a**. **b** Frequencies of lung *i*NKT ($CD45^+$, $CD3^+$, and PBS57/CD1d $tetramer^+$), γδT ($CD45^+$, $CD3^+$, and $TCR\delta^+$), and MAIT ($CD45^+$, $CD3^+$, and 5-OP-RU/MR1 $tetramer^+$) cells in PBS- or IL-7/M25-treated mice were evaluated by flow cytometry. Representative dot plots are shown in the upper panel. Individual values and means ± SEM of innate T-cell frequencies from two independent experiments are shown (8–9 mice/group) in the lower panel. **c** Expression of CD127 on $ROR\gamma t^-$ (gray line) and $ROR\gamma t^+$ (black line) innate T cells. Representative histograms are shown in the upper panel. Individual values and means ± SEM of mean fluorescence intensity from two independent experiments are shown (eight mice/group) in the lower panel. **d** Expression of RORγt in innate T cells. Representative dot plots of RORγt expression in innate T cells are shown in the upper panel. Individual values and means ± SEM from two independent experiments are shown (8–9 mice/group) in the lower panel. **e** Frequencies of $Ki67^+$ cells in innate T-cell $ROR\gamma t^-$ versus $ROR\gamma t^+$ subsets at day+1 and +3 after treatment cessation. Individual values and means ± SEM from one representative experiment out of two is shown (five mice/group). **f** Kinetics of lung $ROR\gamma t^-$ and $ROR\gamma t^+$ innate T cells after IL-7/M25 treatment cessation. Individual values and means ± SEM from one representative experiment out of two is shown (five mice/group). ns not significant, $^*P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$; $^{***}P < 0.001$

the IL-7/M25-dependent control of bacterial growth. In line with recent reports,[29,30] γδT-cell deficiency resulted in increased bacterial loads in the lungs and spleen (Fig. 4d). Furthermore, IL-7/M25 failed to lower the number of pneumococci in lungs and spleen of γδT-cell-deficient mice. Conversely, IL-7-dependent antibacterial response was not affected in *Traj18*$^{-/-}$ mice (Supplementary Fig. 3b). We next turned to analyze the effect of IL-7 treatment on survival. Although IL-7/M25 pretreatment resulted in improved bacterial containment in WT mice, this was not associated with any benefit on survival (Fig. 4e). Taken together, IL-7/M25 prophylactic treatment allows bacterial containment in an IL-17A-, γδT cell-, and neutrophil-dependent manner, but does not positively influence mouse survival.

Intranasal instillation of a low dose of α-GalCer confers partial protection against *S. pneumoniae*-induced pneumonia with limited lung *i*NKT cell hyporesponsiveness

Since IL-7/M25 treatment did not positively influence survival, we postulated that its combination with an innate T-cell stimulator such as α-GalCer could lead to increased protective effects. In previous studies, high doses of α-GalCer conferred, a *i*NKT cell-dependent, complete protection against pneumococcal infection,[11,12] offering no room for a potential synergistic effect when combined with IL-7/M25. Thus, we searched for a suboptimal dose enabling *i*NKT cell activation and partial protection against *S. pneumoniae*-induced pneumonia. To this aim, mice were i.n. exposed to a high (2 µg) or low (25 ng) dose of α-GalCer, and the ensuing local innate immune response was evaluated. Treatment with the high—but not with low—dose resulted in a decrease in lung *i*NKT cell frequencies (Fig. 5a), a phenomenon likely due to activation-induced TCR downmodulation.[38] Moreover, *i*NKT cells presented a phenotype of activated cells as judged by CD69 overexpression (Fig. 5b). Low and high doses of α-GalCer induced IFN-γ and IL-17A production by lung *i*NKT cells (Fig. 5c) albeit in a dose-dependent manner. Next, the protective effect of the two doses of α-GalCer was evaluated. Consistent with previous reports,[11,12] we observed that instillation of a high dose of α-GalCer 16 h prior to *S. pneumoniae* inoculation conferred a complete protection, while low dose only protected a small proportion of the mice (Fig. 5d).

Importantly, α-GalCer-mediated *i*NKT cell activation culminates in a long-term state of hypo- or unresponsiveness.[39,40] Thus, we evaluated whether the dose of α-GalCer might influence the appearance of such a phenomenon (Fig. 5e). Lung *i*NKT cells from α-GalCer-experienced mice displayed lower ability to produce IFN-γ upon in vivo α-GalCer rechallenge compared with vehicle-pretreated mice (Fig. 5f), although this effect was less marked with the low dose. Surprisingly, *i*NKT cells retained their capacity to produce IL-17A upon α-GalCer rechallenge (Fig. 5f). In addition, *i*NKT cells from α-GalCer-treated mice overexpressed programmed cell death 1 (PD-1) at cell surface (Fig. 5g), a marker of *i*NKT cell anergy.[41] This effect was significantly lower with the low dose of α-GalCer (Fig. 5g). In addition, transactivation of γδT and MAIT cells was almost maintained in mice that were pretreated with a low dose of α-GalCer while being blunted with the high dose (Fig. 5h). However, this effect was unlikely due to anergy, but rather the consequence of *i*NKT hyporesponsiveness, since the levels of PD-1 on γδT and MAIT cells remained constant after α-GalCer treatment (Supplementary Fig. 4). Collectively, these data indicate that i.n. instillation of a low dose of α-GalCer confers partial protection against lethal pneumococcus-induced pneumonia, but limits the appearance of long-term *i*NKT cell hyporesponsiveness.

Combination of IL-7 with a suboptimal dose of α-GalCer enhances the survival of *S. pneumoniae*-infected mice

Having determined a suboptimal dose of α-GalCer, its activating capacity on lung innate T cells was evaluated in IL-7/M25-pretreated mice (Fig. 6a). IL-7/M25 pretreatment led to a higher proportion of $IL\text{-}17A^+$ innate T cells in response to α-GalCer (Fig. 6b) while their $IFN\text{-}\gamma^+$ counterparts remained unchanged (Supplementary Fig. 5). In concert, α-GalCer-induced neutrophilia was increased after IL-7 instillation (Fig. 6c). Thus, the survival of mice upon *S. pneumoniae* infection was followed upon IL-7/α-GalCer combinatorial prophylactic treatment. While stand-alone treatments with IL-7/M25 or α-GalCer conferred little to any protection (0 and 27%, respectively), their combination significantly improved mouse survival (76%) (Fig. 6d). Altogether, these results indicate that combinatorial treatment with IL-7 and α-GalCer led to an enhanced IL-17 innate response and allows synergistic protective effects upon *S. pneumoniae*-induced lethal pneumonia compared with stand-alone treatments.

DISCUSSION

Harnessing innate T cells for clinical purposes is currently under important investigations. To date, most of the studies aiming at manipulating innate T-cell functions used molecules (e.g., specific TCR agonists) that enable strong and swift activation of a particular innate T-cell lineage. Here, we reported that IL-7 instillation can be instrumental to foster the pool of lung innate T cells endowed with IL-17A production, including γδT, *i*NKT, and MAIT cells. IL-7 triggers innate $ROR\gamma t^+$ T-cell proliferation culminating in a long-term pre-armed IL-17A-enriched local environment. This pool of preset cells with specific functions can thus be activated "on-demand" conferring to the host a timely advantage especially during infections.

Understanding the mechanisms underlying the preferential effect of IL-7 on IL-17A-producing innate T cells will require further investigations. However, the high-density expression of IL-7R on $ROR\gamma t^+$ innate T cells can partially explain this phenomenon. A differential localization of innate T-cell subsets (e.g., $ROR\gamma t^+$ vs. $ROR\gamma t^-$) within the lung tissue might also be important. In line, previous reports indicated that IL-17A-producing *i*NKT and γδT cells mainly populate the lung parenchyma, while the vasculature contains their IFN-γ-producing counterparts.[29,42] Thus,

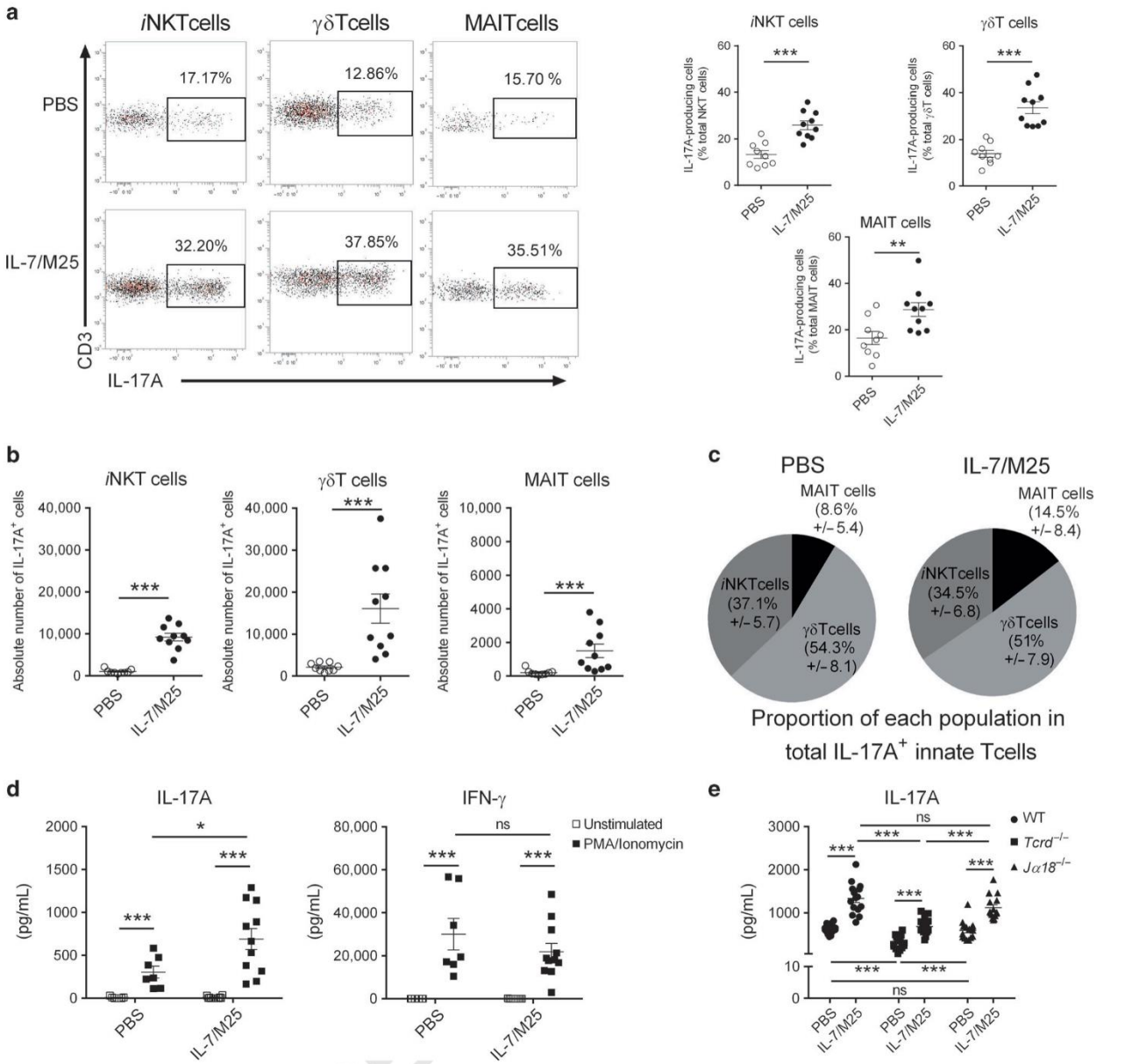


Fig. 2 IL-7/M25 increases IL-17A production by lung innate T cells. **a–c** Lung leukocytes from PBS- or IL-7/M25-treated mice were cultured for 4 h in complete RPMI 1640 medium in the presence of PMA/ionomycin. **a** Frequencies of IL-17A-producing innate T cells were evaluated by intracellular flow cytometry. Representative dot plots are shown in the left panel. Individual values and means ± SEM from two independent experiments are shown (9–10 mice/group) in the right panel. **b** Absolute numbers of IL-17A-producing innate T cells. Individual values and means ± SEM from two independent experiments are shown (9–10 mice/group). **c** Relative proportions of innate T-cell subsets within total IL-17A-producing innate T cells in PBS- and IL-7/M25-treated mice. (**d–e**) Lung leukocytes from PBS- or IL-7/M25-treated mice were cultured in complete RPMI 1640 medium in the presence or not of PMA/ionomycin, and culture supernatants were collected after 20 h. **d** Levels of IL-17A and IFN-γ in culture supernatants. Individual values and means ± SEM from two independent experiments are shown (7–11 mice/group). **e** Levels of IL-17A in culture supernatants of lung leukocytes from WT, *Tcrd*$^{-/-}$, and *Traj18*$^{-/-}$ mice. Individual values and means ± SEM from three independent experiments are shown (7–15 mice/group). ns not significant, *$P < 0.05$; **$P < 0.01$; ***$P < 0.001$

RORγt^{+} innate T cells appear to be poised on the front line to react to IL-7 instillation.

Conversely, the frequency of adaptive T-lymphocyte cells was not modulated upon IL-7 treatment, although a more detailed analysis is required to precisely gauge the effects of this cytokine on adaptive T-cell functions. However, this observation is of importance regarding possible oversecretion of cytokines and subsequent development of auto-inflammatory responses. The biology of innate lymphoid cells (ILCs) was shown to critically rely on IL-7.[43,44] Thus, it is likely that lung RORγt^{+} ILCs also expand upon IL-7 instillation. Accordingly, it will be worth to evaluate the contribution of these lymphocytes in the pro-IL-17A effect of IL-7, although their scarce representation in the lung tissue[45] may restrict their role.

While IL-7 pretreatment elicited an innate T-cell-dependent control of *S. pneumoniae* outgrowth and dissemination, this approach failed to improve mouse survival. Previous studies have revealed the potent protective effect of innate T-cell stimulators such as α-GalCer on experimental pneumococcus-induced lethal pneumonia.[11,12] However, the use of high doses of α-GalCer is not

SPRINGER NATURE SOCIETY FOR MUCOSAL IMMUNOLOGY

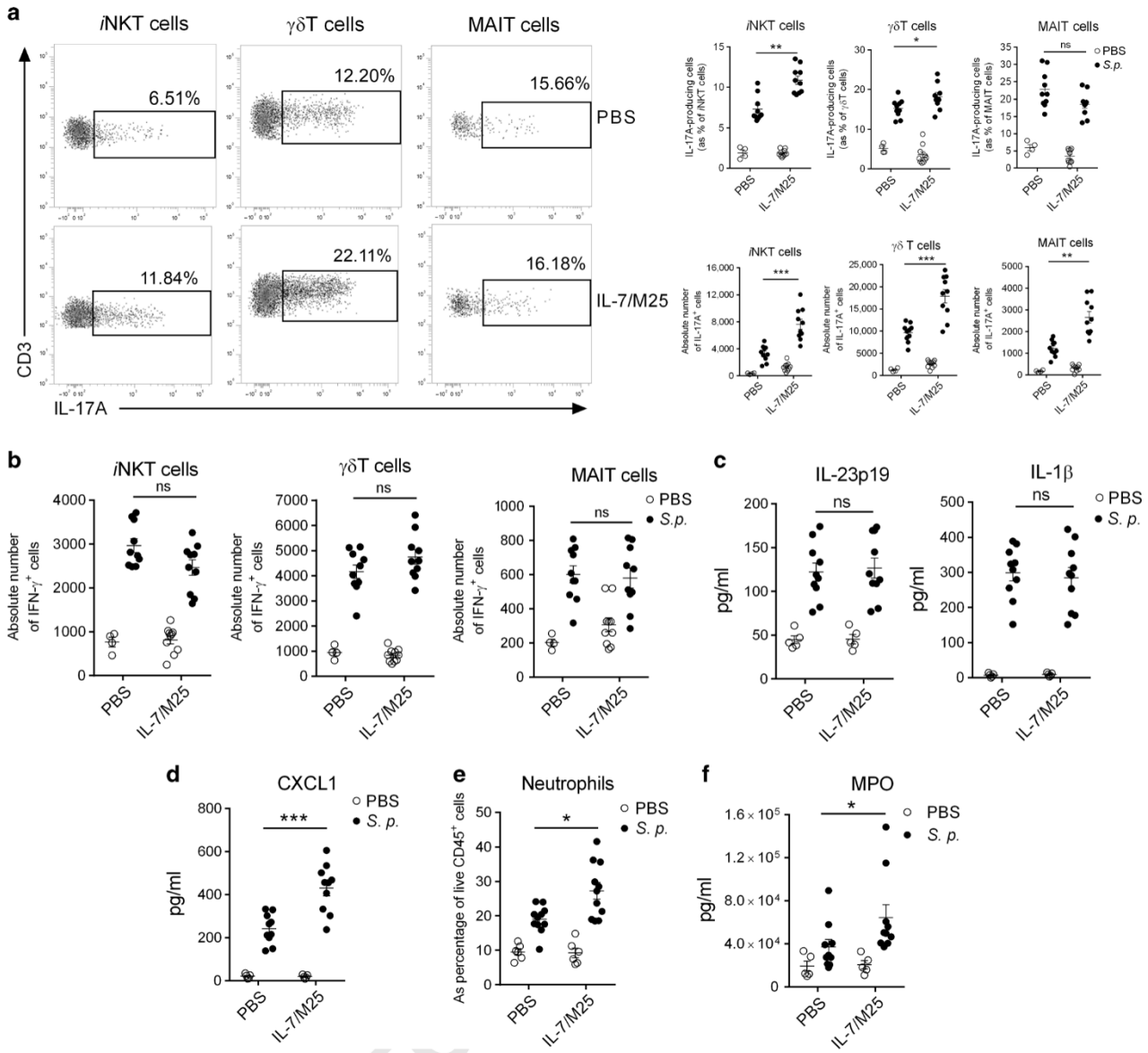


Fig. 3 IL-7/M25 treatment increases innate IL-17A response to pneumococcal infection. **a–b** PBS- or IL-7/M25-treated WT C57BL/6J mice were i.n. infected with *S. pneumoniae* (2×10^6 cfu) and euthanized 16 h post infection. **a** IL-17A production by lung innate T cells was evaluated by intracellular flow cytometry. Representative dot plots of IL-17A-producing innate T cells are shown in the left panel. Individual values and means ± SEM of the frequencies and absolute numbers of IL-17A-producing innate T cells from two independent experiments are shown (4–10 mice/group) in the right panel. **b** IFN-γ production by lung innate T cells was evaluated by intracellular flow cytometry. Individual values and means ± SEM of the number of IFN-γ-producing innate T cells from two independent experiments are shown (4–10 mice/group). **c–f** PBS- or IL-7/M25-treated WT C57BL/6J mice were i.n. infected with *S. pneumoniae* (2×10^6 cfu) and euthanized 16 h post infection. Levels of IL-23p19, IL-1β (**c**), CXCL1 (**d**), and MPO (**f**) proteins were evaluated in homogenized lung tissue. Individual values and means ± SEM from two independent experiments are shown (5–10 mice/group). **e** Frequencies of lung neutrophils (Siglec F^- $CD11b^+$ $Ly6G^+$ cells) were evaluated by flow cytometry. Individual values and means ± SEM from two independent experiments are shown (5–10 mice/group). ns not significant, $^*P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$; $^{***}P < 0.001$

without concern since it may lead to advert effects such as hyperinflammation,[46] including airway hyperresponsiveness[47] and/or long-term *i*NKT cell hyporesponsiveness.[39] Interestingly, our data indicated that the original combination of a low dose of α-GalCer with IL-7/M25 conferred an almost complete protection, while stand-alone treatments had marginal effects. From a translational point of view, limiting the appearance of *i*NKT cell hyporesponsiveness by using reduced dose of α-GalCer could be an interesting strategy to decrease the risk of secondary infections post treatment.[48] Consistent with our previous report,[49] α-GalCer led to a γδT cell transactivation culminating in a substantial increase production of IL-17A. Although the activation mechanisms need to be further investigated, it is also worth mentioning that our study reveals that MAIT cells get activated in α-GalCer-induced immune response. This should be considered in clinics in the context of α-GalCer-based therapies regarding the abundance of this population in humans.[50]

Clinically, manipulating IL-17 biology by means of IL-7 during lung infection has to be considered with caution, given the versatile nature of this cytokine. Thus, one can anticipate that IL-7

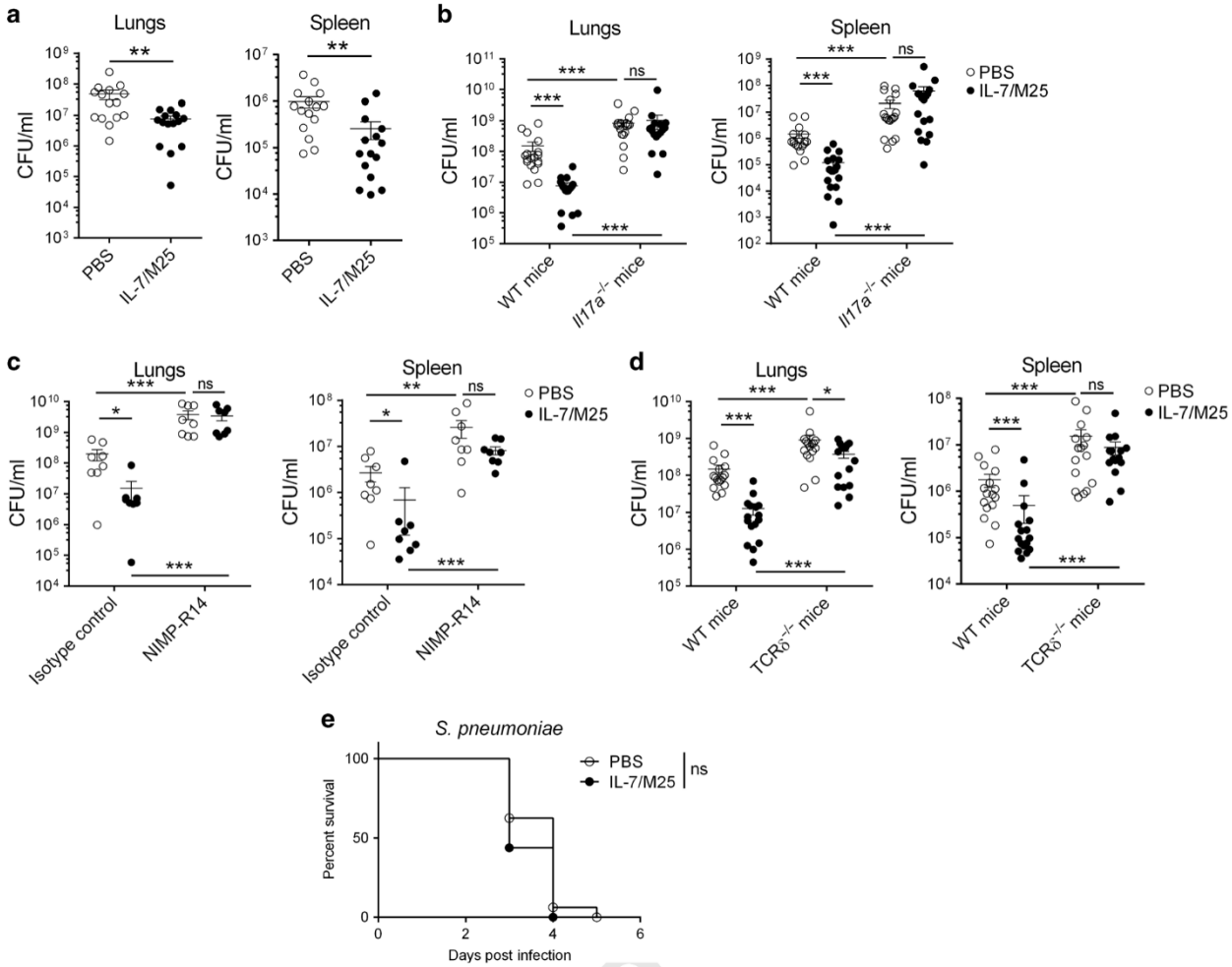


Fig. 4 Mechanisms involved in the antibacterial effect of IL-7/M25. **a** PBS- or IL-7/M25-treated WT C57BL/6J mice were i.n. infected with *S. pneumoniae* (2×10^6 cfu), and the number of CFU was determined 60 h post infection in the lungs (left panel) and in the spleen (right panel). Individual counts and means ± SEM of two independent experiments are shown (15 mice/group). **b** PBS- or IL-7/M25-treated WT or *Il17a*$^{-/-}$ C57BL/6J mice were i.n. infected with *S. pneumoniae* (2×10^6 cfu), and the number of CFU was determined 60 h post infection in the lungs (left panel) and in the spleen (right panel). Individual counts and means ± SEM of two independent experiments are shown (18 mice/group). **c** PBS- or IL-7/M25-treated WT C57BL/6J mice treated i.p. with LTF2 or NIMP-R14 were i.n. infected with *S. pneumoniae* (2×10^6 cfu), and the number of CFU was determined 60 h post infection in the lungs (left panel) and in the spleen (right panel). Individual counts and means ± SEM of one representative experiment out of two are shown (eight mice/group). **d** PBS- or IL-7/M25-treated WT or *Tcrd*$^{-/-}$ C57BL/6 J mice were i.n. infected with *S. pneumoniae* (2×10^6 cfu), and the number of CFU was determined 60 h post infection in the lungs (left panel) and in the spleen (right panel). Individual counts and means ± SEM of two independent experiments are shown (16 mice/group). **e** PBS- or IL-7/M25-treated WT C57BL/6J mice were i.n. infected with *S. pneumoniae* (2×10^6 cfu). Survival of mice was monitored daily (16 mice/group). ns, not significant; *$P < 0.05$; **$P < 0.01$; ***$P < 0.001$

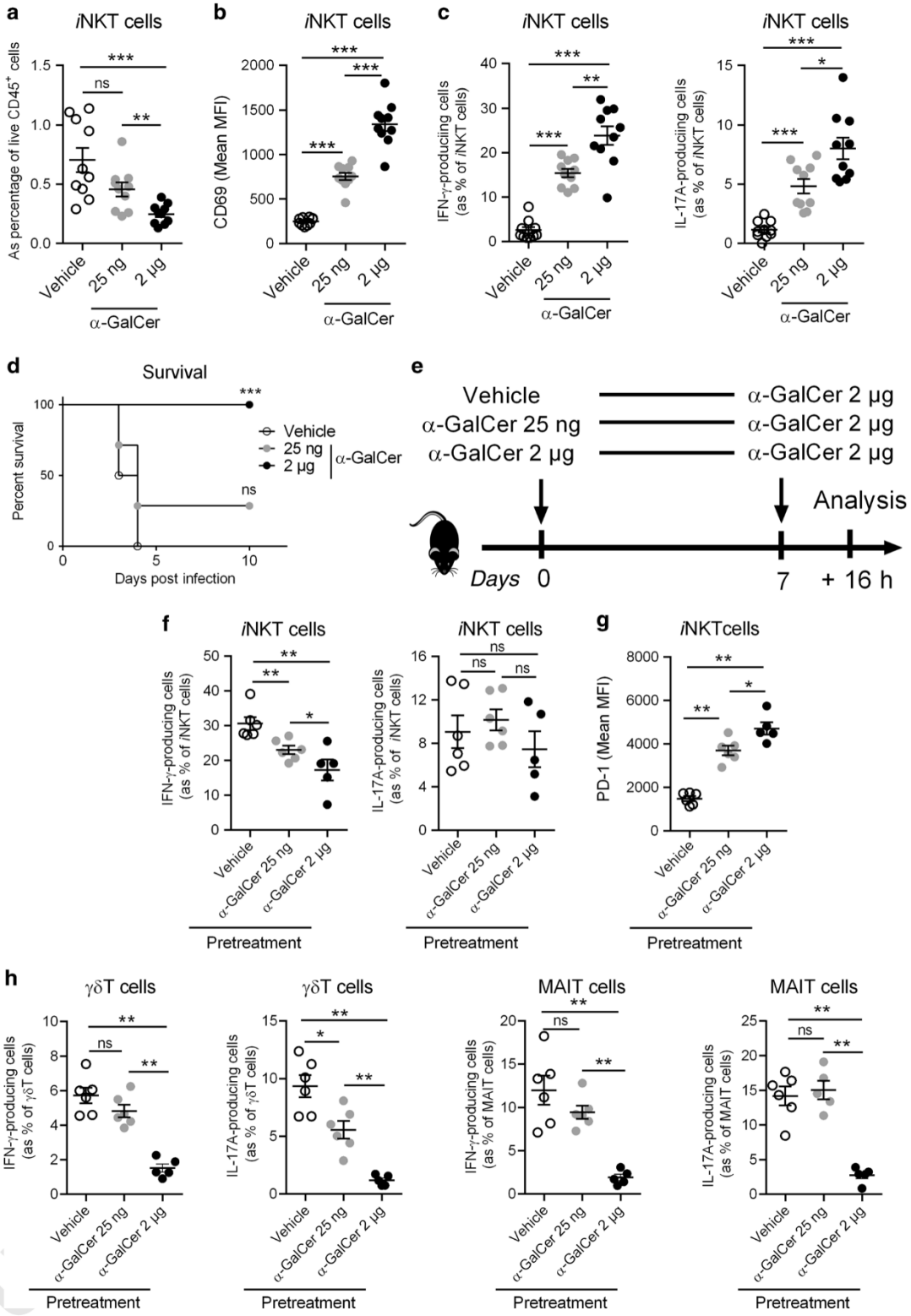
may fuel inflammation. For instance, influenza virus infection triggers an intense and deleterious inflammatory host response[51,52] that is partially mediated by IL-17A.[53] Thus, neutralization of the IL-7/IL-17 axis may be more appropriate in this specific pathological situation. Nevertheless, severe influenza infections are followed by a phase of immunosuppression, during which subjects are more prone to develop secondary bacterial infections.[54–57] The increased susceptibility to superinfections is partially due to the reduced IL-17A production by γδT cells in influenza virus-experienced hosts.[30] Altogether, the decision to either foster or alleviate the IL-7/IL-17 axis could be clearly different according to the type of infection, the time point of ongoing infection, and the anticipated outcome of the inflammatory immune response. In any case, this points toward a great potential for manipulating IL-7 biology during lung inflammation.

Some preclinical studies have previously shown a potential benefit for IL-7 during bacterial infections. For instance, repeated IL-7 injections during *Mycobacterium tuberculosis* infection improved mouse survival but did not influence granuloma formation and bacterial loads.[58] In addition, a vaccination protocol by using a recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing a *M. tuberculosis* Ag (Ag85B) was shown to increase Ag85B-specific $CD8^+$ T cells in the lungs when combined with IL-7, an effect that relied on γδT17 cells.[59]

Although few reports indicated its secretion upon acute infection, endogenous IL-7 was previously demonstrated critical during oral *Citrobacter rodentium* infection.[60] In this model, blockade of the IL-7R signaling led to an impaired bacterial clearance and enhanced colon epithelium damages.[60] Thus, the endogenous role of IL-7 in innate T-cell functions might be worth investigating in disease models in which its biological activity is modulated, such as in allergy or chronic viral infections.[61–63]

In conclusion, we reveal the ability of IL-7 i.n. instillation to preferentially fine-tune lung innate T-cell functions with a positive

SPRINGER NATURE SOCIETY FOR MUCOSAL IMMUNOLOGY



outcome on the host antibacterial response. This observation should be considered for the development of novel cytokine-based "immunointervention" strategies. By extension, neutralization of the IL-7/IL-17 axis may be pertinent in the context of IL-17-driven immunopathologies such as psoriasis, arthritis, and multiple sclerosis.

METHODS

Mice

Inbred C57BL/6J mice were purchased from Janvier (Le Genest-St-Isle, France). C57BL/6J *Il17a*$^{-/-}$,[64] C57BL/6J *Tcrd*$^{-/-}$,[65] and C57BL/6 *Traj18*$^{-/-}$ [66] mice were bred and maintained in-house either at the Pasteur Institute of Lille and/or at the University of Tours under

Fig. 5 Dose-dependent effect of α-GalCer instillation on lung innate immune response. **a–d** WT C57BL/6J mice were injected i.n. with vehicle or two doses of α-GalCer (25 ng and 2 µg). Lungs were collected 16 h after injection, and *i*NKT cell activation was evaluated. **a** Frequencies of lung *i*NKT cells were evaluated between groups by flow cytometry. Individual values and means ± SEM of *i*NKT cell frequencies from two independent experiments are shown (10 mice/group). **b** Expression of CD69 on lung *i*NKT cells. Individual values and means ± SEM of mean fluorescence intensity from two independent experiments are shown (10 mice/group). **c** IFN-γ and IL-17A production by lung *i*NKT cells was evaluated by intracellular flow cytometry. Individual values and means ± SEM of the frequencies of IFN-γ- and IL-17A-producing *i*NKT cells from two independent experiments are shown (10 mice/group). **d** Vehicle- or α-GalCer-treated WT C57BL/6J mice were i.n. infected 16 h later with *S. pneumoniae* (2×10^6 cfu). Survival of mice was monitored daily (6–7 mice/group). **e–g** Vehicle- or α-GalCer-pretreated WT C57BL/6J mice were challenged a week later with a high dose of α-GalCer (2 µg). Lung innate T-cell response was evaluated 16 h later. **e** Model to study *i*NKT cell hyporesponsiveness. **f** IFN-γ and IL-17A production by lung *i*NKT cells was evaluated by intracellular flow cytometry. Individual values and means ± SEM of the frequencies of IFN-γ- and IL-17A-producing *i*NKT cells from two independent experiments are shown (5–6 mice/group). **g** Expression of PD-1 on lung *i*NKT cells. Individual values and means ± SEM of mean fluorescence intensity from two independent experiments are shown (5–6 mice/group). **h** IFN-γ and IL-17A production by lung γδT and MAIT cells was evaluated by intracellular flow cytometry. Individual values and means ± SEM of the frequencies of IFN-γ- and IL-17A-producing γδT and MAIT cells from two independent experiments are shown (5–6 mice/group). ns not significant, $*P < 0.05$; $**P < 0.01$; $***P < 0.001$

specific pathogen-free conditions, and were sex and age (8–10 weeks) matched. All animal work was conformed to the French governmental and committee guidelines for the care and use of animals for scientific purposes, and was approved by the national ethics committee under approval numbers 20151217223764O5 and 201611151159949.

Reagents and Abs

Monoclonal antibodies against mouse CD45 (APC/Cy7- or AF700-conjugated), CD3 (BV421- or PerCp-Cy5.5-conjugated), TCRδ (PerCp-Cy5.5-conjugated), NK1.1 (PeCy7- or BB700- or FITC-conjugated), Ly6G (APC/Cy7- or AF700- or FITC-conjugated), CD11b (PerCP-Cy5.5- or FITC-conjugated), Siglec F (PE- or BV421-conjugated), CD4 (PE- or efluor 450- or PerCP-Cy5.5-conjugated), CD8α (FITC- or APC-conjugated), CD127 (PeCy7-conjugated), CD19 (APC- or FITC-conjugated), Ki67 (FITC- or BV421-conjugated), RORγt (APC-conjugated), IL-17A (PE-conjugated), IFN-γ (APC-conjugated), and appropriate isotype controls were purchased from BioLegend (San Diego, CA, USA), BD Pharmingen (San Diego, CA, USA), and eBioscience (San Diego, CA, USA). PBS57 glycolipid-loaded and control CD1d tetramers (APC- or PE-conjugated), as well as 5-OP-RU-loaded and control MR1 tetramers (BV421-conjugated), were obtained from the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Tetramer Facility (Emory University, Atlanta, GA). Mouse ELISA kits were purchased from R&D systems (Lille, France), eBioscience, and Clinisciences (Nanterre, France). α-GalCer (KRN7000) was purchased from Coger (Paris, France). Concanavalin (Con) A was purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France).

IL-7/M25 mAb complexes

rhIL-7 (Miltenyi Biotec, Paris, France) was mixed with anti-IL-7 mAb (M25, BioXCell, West Lebanon, NH) and incubated at 37 °C for 30 min as previously described.[21] Mice were injected i.n. with 400 ng of cytokine +2 µg of mAb in 40 µl of saline.

In vitro assays

Lungs were harvested from saline- or IL-7/M25-treated mice, and cell suspensions were prepared as previously described. Leukocytes were cultured for 20 h in complete RPMI 1640 medium containing or not phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (100 ng/ml) and ionomycin (1 µg/ml).

Infection with *S. pneumoniae* and bacterial counts

S. pneumoniae serotype 1 clinical isolate E1586 sequence type ST304 has been described elsewhere.[29] Mice were anesthetized and administered i.n. with 50 µl of PBS containing live bacteria (2×10^6 CFU). Viable bacteria in the lungs and spleen were counted 36 h after *S. pneumoniae* infection by plating serial tenfold dilutions of lung or spleen homogenates onto blood (5%) agar–agar-containing Petri dishes. The plates were incubated at 37 °C with 5% of CO_2, and CFUs were counted 24 h later.

Preparation of pulmonary immune cells

Mice were treated or not every other day with three doses of IL-7/M25 complex and/or α-GalCer i.n., and then infected or not with *S. pneumoniae*. Lung mononuclear cells (MNCs) were prepared as previously described.[29] Briefly, lungs were perfused with saline, harvested, and finely minced by using scissors. Lung pieces were then digested in a medium containing 1 mg/ml of collagenase type VIII (Sigma-Aldrich) and 1 µg/ml of DNase type I (Roche; Meylan, France) for 20 min at 37 °C under gentle agitation. After washes, lung homogenates were resuspended in a 20% Percoll gradient, and centrifuged without brake at 2000 rpm for 15 min at room temperature. Pellets were recovered in PBS 2% FCS, and erythrocytes were removed by using a red- blood cell lysis buffer (Sigma-Aldrich).

Measurement of cytokines in the lungs

Perfused lungs were collected in liquid nitrogen until processing. An anti-protease solution was prepared by dissolving one tablet of anti-protease (25×) 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 and then centrifuged at 10,000 rpm for 15 min. The supernatants were collected and stored at −20 °C until analysis.

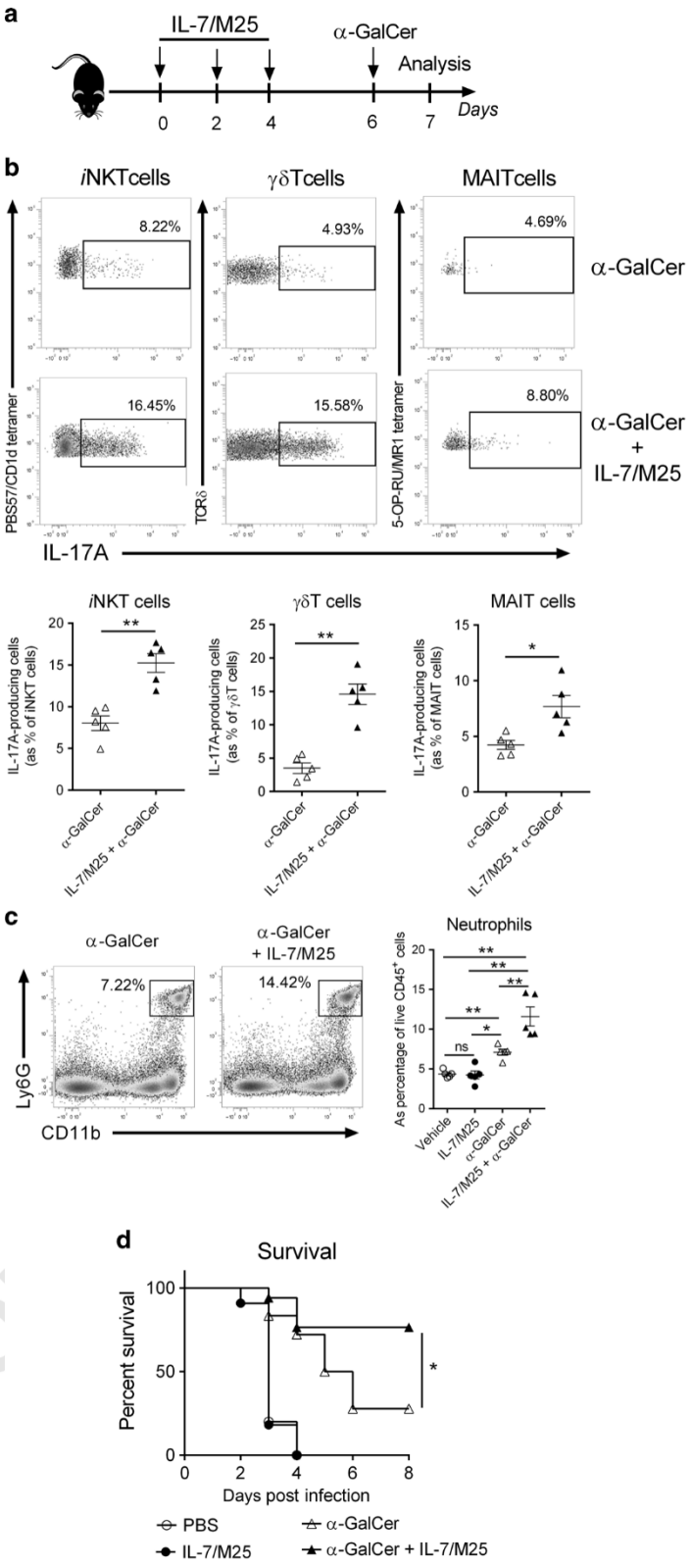
Assessment of lung Il7 expression by quantitative reverse transcription-PCR

Total RNA from whole lungs of PBS-treated or *S. pneumoniae*-infected mice was extracted and purified by using the NucleoSpin RNA Extraction Kit (Macherey-Nagel; Hoerdt, France) following the manufacturer's instructions. The cDNA was synthesized from total RNA by using the High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Thermofisher Scientific; Les Ulis, France). Gene expression was determined on the QuantStudio 12 K Flex Real-Time PCR System (Thermofisher Scientific) by using specific primers, as previously described,[67] and QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen; Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions. Gene expression was normalized to *Gapdh*.

Flow cytometry

Cells were incubated in RPMI 1640 5% FCS containing Golgi Plug/Golgi Stop (BD Biosciences) for 2 h at 37 °C. Then, cells were stained with appropriate dilutions of antibodies (30 min, 4 °C) in PBS 2% FCS. Cells were washed and fixed by using Intracellular Fixation Buffer (eBioscience, CliniSciences, Montrouge, France). Fixed cells were then permeabilized in Permeabilization Buffer (eBioscience) according to the manufacturer's instructions. Intranuclear staining was performed by using the True-Nuclear transcription factor buffer set (BioLegend) according to the manufacturer's instructions. Dead cells were stained with the LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Staining kit (Thermofisher Scientific). Cells were stained with PE-conjugated mAb against IL-

UNCORRECTED PROOF



17A or APC-conjugated mAb against IFN-γ, and acquired on either a LSR Fortessa cytometer (BD Biosciences) or a MACS Quant (Miltenyi Biotec). Analyses were performed by using the VenturiOne software (Applied Cytometry; Sheffield, UK).

Neutrophil depletion

Neutrophil-depleting anti-Ly6G monoclonal antibodies were purified in-house (by using protein G columns) from supernatants of the NIMP-R14 hybridoma. Neutrophils were depleted 24 h

Fig. 6 IL-7/M25 plus α-GalCer enhances IL-17A innate T-cell response and survival of *S. pneumoniae*-infected mice. **a** WT C57BL/6J mice received three intranasal doses of IL-7/M25 or saline every other day. Then, mice received α-GalCer (25 ng) at day 6 by i.n. route. **b** IL-17A production by lung innate T cells was evaluated by intracellular flow cytometry 16 h after α-GalCer instillation. Representative dot plots of IL-17A-producing innate T cells are shown in the upper panel. Individual values and means ± SEM from one representative experiment out of two are shown (five mice/group) in the lower panel. **c** Frequencies of lung neutrophils (Siglec F^- $CD11b^+$ $Ly6G^+$ cells) were evaluated 16 h after α-GalCer instillation. Representative dot plots are shown in the left panel. Individual values and means ± SEM from one representative experiment out of two are shown (five mice/group). **d** Mice were i.n. infected with *S. pneumoniae* (2×10^6 cfu) 16 h after α-GalCer instillation, and survival was monitored daily (11–18 mice/group). ns not significant, $^*P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$

before *S. pneumoniae* infection by using NIMP-R14 (100 µg per mouse i.p. in 200 µl of PBS). A rat IgG2b isotype control antibody (clone LTF2; BioXcell) was used as a control.

Statistical analysis

Q6 All statistical analysis was performed by using GraphPad Prism software. The statistical significance was evaluated by using nonparametric Mann–Whitney *U* tests or Kruskal–Wallis to compare the means of biological replicates in each experimental group. Survival rates after *S. pneumoniae* challenge were analyzed by using a log-rank test. The results with a *P* value of <0.05 were considered significant. ns: not significant; $^*p < 0.05$; $^{**}p < 0.01$; $^{***}p < 0.001$.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded with support by the Région Centre-Val de Loire under the program "ARD 2020 Biomédicaments" (Project 7UP) and by the French Higher Education and Research ministry under the program "Investissements d'avenir": LabEx MAbImprove (ANR-10-LABX-53-01). Y.J., N.H-V., J.C.S., C.F., M.Si-T., and C.P. are supported by Inserm. F.T. is supported by CNRS. T.B., L.G., and C.B. are supported by the University of Tours. D.S. is supported by the Pasteur Institute of Lille. M.H. was the recipient of a doctoral fellowship from the AZM foundation. Y.J. was the recipient of the "Antoine RABBAT" doctoral fellowship from the "Fonds de Recherche en Santé Respiratoire" under the support of the "Fondation du Souffle". E.C.P. was supported by a postdoctoral fellowship from the French Institute of cancer (INCa). We also thank the Pasteur Institute of Lille and University of Tours animal facilities for excellent mouse husbanding. We thank the NIH tetramer core facility (Emory University) for providing CD1d and MR1 tetramers. The MR1:5-OP-RU tetramer technology was developed jointly by J. McCluskey, J. Rossjohn, and D. Fairlie, and the material was produced by the NIH Tetramer Core Facility as permitted to be distributed by the University of Melbourne.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

M.H., Y.J., T.B., and C.P. designed the study, analyzed the data, and wrote the paper with input from the other authors. F.T. and M.Si-T. discussed the data and edited the paper. M.H., Y.J., F.C., D.S., C.B., L.G., E.C.P., T.B., and C.P. performed the experiments with assistance from N.H-V., J-C.S., and C.F. Important mice, reagents, experimental, and data analysis techniques were provided by J-C.S. and F.T.

ADDITIONAL INFORMATION

The online version of this article (https://doi.org/10.1038/s41385-019-0212-y) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Competing interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

REFERENCES

1. Godfrey, D. I., Uldrich, A. P., McCluskey, J., Rossjohn, J. & Moody, D. B. The burgeoning family of unconventional T cells. *Nat. Immunol.* **16**, 1114–1123 (2015).
2. Bendelac, A., Savage, P. B. & Teyton, L. The biology of NKT cells. *Annu. Rev. Immunol.* **25**, 297–336 (2007).
3. Bonneville, M., O'Brien, R. L. & Born, W. K. Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 467–478 (2010).
4. Le Bourhis, L. et al. Antimicrobial activity of mucosal-associated invariant T cells. *Nat. Immunol.* **11**, 701–708 (2010).
5. Rouxel, O. et al. Cytotoxic and regulatory roles of mucosal-associated invariant T cells in type 1 diabetes. *Nat. Immunol.* **18**, 1321–1331 (2017).
6. Godfrey, D. I., Le Nours, J., Andrews, D. M., Uldrich, A. P. & Rossjohn, J. Unconventional T cell targets for cancer immunotherapy. *Immunity* **48**, 453–473 (2018).
7. Cerundolo, V. & Salio, M. Harnessing NKT cells for therapeutic applications. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **314**, 325–340 (2007).
8. Cerundolo, V., Silk, J. D., Masri, S. H. & Salio, M. Harnessing invariant NKT cells in vaccination strategies. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 28–38 (2009).
9. Chiplunkar, S., Dhar, S., Wesch, D. & Kabelitz, D. Gammadelta T cells in cancer immunotherapy: current status and future prospects. *Immunotherapy* **1**, 663–678 (2009).
10. Bedard, M., Salio, M. & Cerundolo, V. Harnessing the power of invariant natural killer T cells in cancer immunotherapy. *Front. Immunol.* **8**, 1829 (2017).
11. Kawakami, K. et al. Critical role of Valpha14+ natural killer T cells in the innate phase of host protection against *Streptococcus pneumoniae* infection. *Eur. J. Immunol.* **33**, 3322–3330 (2003).
12. Ivanov, S. et al. Key role for respiratory CD103(+) dendritic cells, IFN-γ, and IL-17 in protection against Streptococcus pneumoniae infection in response to α-galactosylceramide. *J. Infect. Dis.* **206**, 723–734 (2012).
13. Wiles, M. V., Ruiz, P. & Imhof, B. A. Interleukin-7 expression during mouse thymus development. *Eur. J. Immunol.* **22**, 1037–1042 (1992).
14. Fry, T. J. & Mackall, C. L. The many faces of IL-7: from lymphopoiesis to peripheral T cell maintenance. *J. Immunol.* **174**, 6571–6576 (2005).
15. Palmer, M. J. et al. Interleukin-7 receptor signaling network: an integrated systems perspective. *Cell. Mol. Immunol.* **5**, 79–89 (2008).
16. Mackall, C. L., Fry, T. J. & Gress, R. E. Harnessing the biology of IL-7 for therapeutic application. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 330–342 (2011).
17. Gao, J., Zhao, L., Wan, Y. Y. & Zhu, B. Mechanism of action of IL-7 and its potential applications and limitations in cancer immunotherapy. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 10267–10280 (2015).
18. Finkelman, F. D. 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.* **151**, 1235–1244 (1993).
19. Boyman, O., Ramsey, C., Kim, D. M., Sprent, J. & Surh, C. D. IL-7/anti-IL-7 mAb complexes restore T cell development and induce homeostatic T Cell expansion without lymphopenia. *J. Immunol.* **180**, 7265–7275 (2008).
20. Michel, M.-L. et al. Interleukin 7 (IL-7) selectively promotes mouse and human IL-17-producing γδ cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **109**, 17549–17554 (2012).
21. Webster, K. E. et al. IL-17-producing NKT cells depend exclusively on IL-7 for homeostasis and survival. *Mucosal Immunol.* **7**, 1058–1067 (2014).
22. Hameg, A. et al. IL-7 up-regulates IL-4 production by splenic NK1.1+ and NK1.1- MHC class I-like/CD1-dependent CD4+ T cells. *J. Immunol.* **162**, 7067–7074 (1999).
23. Tang, X.-Z. et al. IL-7 licenses activation of human liver intrasinusoidal mucosal-associated invariant T cells. *J. Immunol.* **190**, 3142–3152 (2013).
24. Gracey, E. et al. IL-7 primes IL-17 in mucosal-associated invariant T (MAIT) cells, which contribute to the Th17-axis in ankylosing spondylitis. *Ann. Rheum. Dis.* **75**, 2124–2132 (2016).
25. Guggino, G. et al. IL-17 polarization of MAIT cells is derived from the activation of two different pathways. *Eur. J. Immunol.* **47**, 2002–2003 (2017).
26. Willing, A., Jäger, J., Reinhardt, S., Kursawe, N. & Friese, M. A. Production of IL-17 by MAIT cells is increased in multiple sclerosis and is associated with IL-7 receptor expression. *J. Immunol.* **200**, 974–982 (2018).
27. Nembrini, C., Marsland, B. J. & Kopf, M. IL-17-producing T cells in lung immunity and inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* **123**, 986–994 (2009).
28. Sutton, C. E., Mielke, L. A. & Mills, K. H. G. IL-17-producing γδ T cells and innate lymphoid cells. *Eur. J. Immunol.* **42**, 2221–2231 (2012).
29. Hassane, M. et al. Neutrophilic NLRP3 inflammasome-dependent IL-1β secretion regulates the γδT17 cell response in respiratory bacterial infections. *Mucosal. Immunol.* **10**, 1056–1068 (2017).

UNCORRECTED PROOF

30. Cao, J. et al. Activation of IL-27 signalling promotes development of postinfluenza pneumococcal pneumonia. *EMBO Mol. Med.* **6**, 120–140 (2014).
31. Paget, C. et al. CD3bright signals on γδ T cells identify IL-17A-producing Vγ6Vδ1+ T cells. *Immunol. Cell Biol.* **93**, 198–212 (2015).
32. Kurioka, A. et al. Diverse *Streptococcus pneumoniae* strains drive a mucosal-associated invariant T-cell response through major histocompatibility complex class I-related molecule-dependent and cytokine-driven pathways. *J. Infect. Dis.* **217**, 988–999 (2018).
33. Hartmann, N. et al. Riboflavin metabolism variation among clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* results in differential activation of MAIT cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* https://doi.org/10.1165/rcmb.2017-0290OC (2018).
34. Hausdorff, W. P., Feikin, D. R. & Klugman, K. P. Epidemiological differences among pneumococcal serotypes. *Lancet Infect. Dis.* **5**, 83–93 (2005).
35. 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).
36. Doisne, J.-M. 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.* **186**, 662–666 (2011).
37. Kolls, J. K. & Lindén, A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* **21**, 467–476 (2004).
38. Fujii, S., Shimizu, K., Kronenberg, M. & Steinman, R. M. Prolonged IFN-gamma-producing NKT response induced with alpha-galactosylceramide-loaded DCs. *Nat. Immunol.* **3**, 867–874 (2002).
39. Parekh, V. V. et al. Glycolipid antigen induces long-term natural killer T cell anergy in mice. *J. Clin. Invest.* **115**, 2572–2583 (2005).
40. Burdin, N., Brossay, L. & Kronenberg, M. Immunization with alpha-galactosylceramide polarizes CD1-reactive NK T cells towards Th2 cytokine synthesis. *Eur. J. Immunol.* **29**, 2014–2025 (1999).
41. Parekh, V. V. et al. PD-1/PD-L blockade prevents anergy induction and enhances the anti-tumor activities of glycolipid-activated invariant NKT cells. *J. Immunol.* **182**, 2816–2826 (2009).
42. Lee, Y. J. et al. Tissue-specific distribution of iNKT cells impacts their cytokine response. *Immunity* **43**, 566–578 (2015).
43. Vonarbourg, C. & Diefenbach, A. Multifaceted roles of interleukin-7 signaling for the development and function of innate lymphoid cells. *Semin. Immunol.* **24**, 165–174 (2012).
44. Satoh-Takayama, N. et al. IL-7 and IL-15 independently program the differentiation of intestinal CD3-NKp46+ cell subsets from Id2-dependent precursors. *J. Exp. Med.* **207**, 273–280 (2010).
45. Kim, C. H., Hashimoto-Hill, S. & Kim, M. Migration and tissue tropism of innate lymphoid cells. *Trends Immunol.* **37**, 68–79 (2016).
46. Biburger, M. & Tiegs, G. Alpha-galactosylceramide-induced liver injury in mice is mediated by TNF-alpha but independent of Kupffer cells. *J. Immunol.* **175**, 1540–1550 (2005).
47. Meyer, E. H. et al. Glycolipid activation of invariant T cell receptor+ NK T cells is sufficient to induce airway hyperreactivity independent of conventional CD4+ T cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **103**, 2782–2787 (2006).
48. Barthelemy, A. 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 Immunol.* **10**, 460–469 (2017).
49. Paget, C., Chow, M. T., Duret, H., Mattarollo, S. R. & Smyth, M. J. Role of γδ T cells in α-galactosylceramide-mediated immunity. *J. Immunol.* **188**, 3928–3939 (2012).
50. Treiner, E. et al. Selection of evolutionarily conserved mucosal-associated invariant T cells by MR1. *Nature* **422**, 164–169 (2003).
51. Snelgrove, R. J., Godlee, A. & Hussell, T. Airway immune homeostasis and implications for influenza-induced inflammation. *Trends Immunol.* **32**, 328–334 (2011).
52. Le Goffic, R. et al. Detrimental contribution of the Toll-like receptor (TLR)3 to influenza A virus-induced acute pneumonia. *PLoS Pathog.* **2**, e53 (2006).
53. Crowe, C. R. et al. Critical role of IL-17RA in immunopathology of influenza infection. *J. Immunol.* **183**, 5301–5310 (2009).
54. McCullers, J. A. The co-pathogenesis of influenza viruses with bacteria in the lung. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 252–262 (2014).
55. Metzger, D. W. & Sun, K. Immune dysfunction and bacterial coinfections following influenza. *J. Immunol.* **191**, 2047–2052 (2013).
56. Sun, J., Madan, R., Karp, C. L. & Braciale, T. J. Effector T cells control lung inflammation during acute influenza virus infection by producing IL-10. *Nat. Med.* **15**, 277–284 (2009).
57. Robinson, K. M., Kolls, J. K. & Alcorn, J. F. The immunology of influenza virus-associated bacterial pneumonia. *Curr. Opin. Immunol.* **34**, 59–67 (2015).
58. Maeurer, M. J. et al. Interleukin-7 or interleukin-15 enhances survival of Mycobacterium tuberculosis-infected mice. *Infect. Immun.* **68**, 2962–2970 (2000).
59. Hatano, S. et al. Recombinant mycobacterium bovis bacillus calmette-guérin expressing Ag85B-IL-7 fusion protein enhances IL-17A-producing innate γδ T cells. *Vaccine* **34**, 2490–2495 (2016).
60. Zhang, W., Du, J.-Y., Yu, Q. & Jin, J.-O. 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 (2015).
61. Beq, S., Delfraissy, J.-F. & Theze, J. Interleukin-7 (IL-7): immune function, involvement in the pathogenesis of HIV infection and therapeutic potential. *Eur. Cytokine Netw.* **15**, 279–289 (2004).
62. Reeder, K. M. et al. The common γ-chain cytokine IL-7 promotes immunopathogenesis during fungal asthma. *Mucosal Immunol.* **11**, 1352–1362 (2018).
63. Kelly, E. A. B. et al. Potential contribution of IL-7 to allergen-induced eosinophilic airway inflammation in asthma. *J. Immunol.* **182**, 1404–1410 (2009).
64. Nakae, S. et al. Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity* **17**, 375–387 (2002).
65. Itohara, S. et al. T cell receptor delta gene mutant mice: independent generation of alpha beta T cells and programmed rearrangements of gamma delta TCR genes. *Cell* **72**, 337–348 (1993).
66. Chandra, S. et al. A new mouse strain for the analysis of invariant NKT cell function. *Nat. Immunol.* **16**, 799–800 (2015).
67. Patin, E. C. et al. Type I IFN receptor signaling controls IL7-dependent accumulation and activity of protumoral IL17A-producing γδT cells in breast cancer. *Cancer Res.* **78**, 195–204 (2018).

UNCORRECTED PROOF

Florent Creusat

Etude et origine des neutrophiles régulateurs dans l'infection pulmonaire

Résumé

Les neutrophiles représentent une population de cellules immunes effectrices-clés dans la lutte anti-infectieuse. Longtemps considérées comme des cellules ultraspécialisées dans l'élimination des microbes, de plus en plus de recherches tendent pourtant à repositionner le neutrophile comme un acteur de la régulation des réponses immunitaires dans de nombreux contextes (cancer, auto-immunité, infection). De plus, il semble aujourd'hui clair qu'il n'existe pas un type de neutrophile mais que celui-ci est doué de fonctions multiples (parfois antagonistes) en lien avec l'environnement ou potentiellement à des sous-populations fonctionnelles préexistantes.
De ce fait, le(s) neutrophile(s) pourraient jouer un rôle bénéfique ou délétère en fonction de la pathologie ou de la phase inflammatoire de la pathologie. A titre d'exemple, le neutrophile semble pouvoir présenter un profil pro- et/ou anti-inflammatoire au cours de l'infection grippale.
De façon générale, le neutrophile semble jouer un rôle-clé dans l'immunopathologie grippale et ses complications comme le syndrome de détresse respiratoire aiguë. En effet, sa présence dans les voies aériennes est corrélée à la sévérité de la pathologie dans les modèles expérimentaux et chez les patients. Toutefois, d'autres études semblent indiquer un rôle protecteur du neutrophile au cours de l'infection grippale. Bien que la différence de modèles utilisés puisse expliquer en partie ces résultats discordants, nous émettons l'hypothèse qu'un tel phénotype pourrait être également dû à l'existence de différentes sous-populations fonctionnelles jouant des rôles opposés au cours de la grippe.
Au cours de l'infection par le virus *Influenza* (IAV), nous avons observé l'émergence d'une population de neutrophiles matures exprimant le marqueur de cellules souches hématopoïétiques Sca-1 (Ly6A). Cette population existe à l'homéostasie et présente un tropisme particulier pour les tissus non lymphoïdes. Au cours de l'infection IAV, les neutrophiles Sca-1$^+$ présentent un profil phénotypique et fonctionnel immunorégulateur se caractérisant par l'expression de protéines membranaires régulatrices comme PD-L1 ou MHC-II et la sécrétion de médiateurs anti-inflammatoires comme l'IL-10 et l'arginase-1. L'acquisition de ces fonctions semble avoir lieu dans la moelle osseuse via un mécanisme dépendant de l'IFN-γ. La déplétion de ces neutrophiles Sca-1$^+$ aboutit à une susceptibilité accrue des animaux à l'infection IAV et à une exacerbation des phénomènes inflammatoires associés à l'infection. En conclusion, nos travaux suggèrent un nouveau concept où une infection virale localisée peut modifier à distance le développement médullaire fonctionnel des neutrophiles.

Résumé en Anglais

Neutrophils are key innate effector cells during infections, mostly described as single footsoldiers of innate immunity that eliminate pathogens through multiple mechanisms. However, emerging evidences tend to reposition neutrophils as cells endowed with relevant immunomodulatory functions in various immune responses including auto-immunity, cancer and viral infections. Thus, it is now admitted that neutrophils can play multiple (sometimes opposite) functions in relation to the environment or the existence of preset functional subsets.
In this context, neutrophil(s) can play either protective or deleterious role according to the disease and the inflammatory stage of the disease. This paradigm can be further exemplified during experimental *Influenza* A virus (IAV) infection, a model of lung immunopathology, in which neutrophils have been shown to play either pro- or anti-inflammatory functions.
It is usually conceded that neutrophils play a critical role in IAV-dependent immunopathology and its complications such as acute respiratory distress syndrome. Thus, its presence in airways is correlated to disease severity in experimental model and clinical studies. However, some studies indicate a protective role for neutrophils during IAV infection. While the differences in the model used may somehow explain these contradictory results, we hypothesized that this discrepancy may arise from the existence of functional subsets that play opposite roles during IAV infection.
During IAV infection, we observed the emergence of a subset of mature neutrophils expressing the hematopoietic stem cell marker Sca-1 (Ly6A). This subset could be observed under steady-state and preferentially populated non lymphoid tissues. During flu infection, Sca-1$^+$ neutrophils displayed a phenotypic and functional profile of cells endowed with immunoregulatory functions. Specifically, they expressed the regulatory surface makers PD-L1 and MHC-II and secreted anti-inflammatory molecules such as IL-10 and arginase-1. These functions appeared to be acquired in the bone marrow during neutrophil development in an IFN-γ-dependent manner. Interestingly, depletion of Sca-1$^+$ neutrophils culminated in increased susceptibility to IAV infection and IAV-dependent inflammation. In sum, our work suggests a new immunological concept in which a distant viral infection can remote the functional development of neutrophils in the bone marrow.