

RÔLE DES NEUTROPHILES ET DE LEURS FILETS D'ADN DANS LES DÉSORDRES INFLAMMATOIRES DU POUMON

RADERMECKER C (1), MARICHAL T (1)

RÉSUMÉ : En 2004, une nouvelle caractéristique des neutrophiles était découverte : leur capacité à libérer des «Neutrophil Extracellular Traps» ou NETs. Depuis, ces structures font l'objet de recherches intensives afin de déterminer leurs fonctions dans diverses pathologies. Dans une première étude, nous avons identifié un rôle des NETs, libérés par des neutrophiles particuliers, dans l'induction de l'asthme allergique suite à l'exposition à trois environnements pro-allergiques distincts chez la souris. Dans une seconde étude, nous avons identifié la libération de NETs dans les poumons de patients atteints de formes sévères de la COVID-19 et ce, au niveau de différents compartiments anatomiques du poumon : les voies aériennes, l'espace interstitiel et les vaisseaux sanguins. Ces deux découvertes suggèrent que les NETs pourraient constituer des cibles thérapeutiques de choix dans diverses pathologies pulmonaires telles que l'asthme allergique et les formes sévères d'infections virales respiratoires.

MOTS-CLÉS : *Neutrophiles - Asthme - Pathologie pulmonaire inflammatoire - COVID-19*

NEUTROPHILS AND THEIR DNA NETS IN INFLAMMATORY PULMONARY DISEASES

SUMMARY : In 2004, a novel feature of neutrophil was discovered: their capacity to release Neutrophil Extracellular Traps or NETs. Since then, immunologists investigate these structures to unravel their functions in various diseases. In a first study, we demonstrated a main contribution of NETs, released by particular neutrophils, to allergic asthma onset triggered by three distinct pro-allergic environments in the mouse. In a second study, we observed NETs-enriched areas in lung biopsies of severe COVID-19 patients and characterized their locations. NETs were found in the airways, in the interstitium but also in blood vessels. These discoveries point out an important contribution of NETs to lung inflammatory diseases and suggest that NETs could be promising therapeutic targets in both allergic asthma prevention and in the severe forms of respiratory viral infections.

KEYWORDS : *Neutrophils - Asthma - Inflammatory pulmonary disease - COVID-19*

LES NEUTROPHILES ET LEURS FILETS D'ADN

C'est sous le microscope de Paul Ehrlich, en 1880, que sont observés pour la première fois les neutrophiles. Ces cellules du système immunitaire inné, caractérisées par leur noyau plurilobé et leur cytoplasme enrichi en granules sécrétoires, représentent 10 à 25 % des leucocytes sanguins totaux chez l'homme. Les neutrophiles ont longtemps été considérés comme des cellules à très courte durée de vie, impliquées dans le contrôle des agents pathogènes via leur capacité de phagocytose et de sécrétion de granules cytotoxiques (1). Cependant, ces dernières décennies ont été marquées par plusieurs découvertes mettant en lumière une complexité jusqu'alors sous-estimée de la biologie des neutrophiles. Notamment, une nouvelle fonction exercée par les neutrophiles a été décrite en 2004 : la capacité de former des filets particuliers en réponse à la présence de bactéries (2). Ces filets, composés d'ADN associé à une forme citrullinée des histones et à de nom-

breux polypeptides anti-microbiens, sont appelés «Neutrophil Extracellular Traps» ou NETs. Différents stimuli peuvent entraîner la formation de NETs tels que les bactéries, les virus, les parasites, les agents fongiques, les complexes immuns immobilisés ainsi que les cristaux (3). Les NETs sont principalement impliqués dans l'élimination d'agents pathogènes, tels que les bactéries, les champignons et les parasites. Leur rôle dans le cadre des infections virales n'est pas encore tout à fait compris. Certaines études décrivent un rôle neutralisant des virus par les NETs (4) alors que d'autres n'observent aucun effet des NETs sur l'évolution de l'infection virale (5). De plus, les NETs peuvent moduler l'activation des nombreuses cellules immunitaires innées et adaptatives (3).

À côté de ces effets bénéfiques pour l'organisme, une production excessive ou un défaut d'élimination des NETs ont été associés à divers troubles à médiation immunitaire. Ainsi, les NETs ont été associés à des maladies telles que la vasculite, le lupus érythémateux et l'arthrite rhumatoïde (6). De plus, les NETs peuvent constituer un support et un élément d'activation des plaquettes, favorisant ainsi la formation de thrombi (7). Enfin, au niveau du poumon, des NETs sont retrouvés dans le lavage bronchoalvéolaire de patients atteints d'asthme neutrophilique et de bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) (8).

(1) Laboratoire d'Immunophysiologie GIGA-R, Faculté de Médecine Vétérinaire, ULIège, Belgique.

LES NETs DANS L'ASTHME ALLERGIQUE

A) L'ASTHME ALLERGIQUE

Le terme «asthme» regroupe un ensemble hétérogène de troubles respiratoires, tous caractérisés par une symptomatologie comprenant une dyspnée, de la toux et une obstruction réversible des voies aériennes (9). Selon le type de cellules inflammatoires retrouvées au niveau des voies aériennes profondes, on peut discerner quatre catégories principales d'asthme : l'asthme éosinophilique, neutrophilique, mixte ou paucigranulocytaire (10).

L'asthme éosinophilique ou allergique est la conséquence du développement d'une réponse immunitaire aberrante de type 2 à l'encontre d'aéroallergènes inoffensifs présents dans l'environnement. Parmi ces allergènes, on retrouve les acariens, les poils d'animaux, les pollens ou encore les moisissures. Cette maladie est principalement caractérisée par une inflammation éosinophilique des voies respiratoires, une production importante de cytokines de type 2, une augmentation de la sécrétion de mucus, l'apparition d'immunoglobulines spécifiquement dirigées contre l'allergène et une hyperréactivité bronchique (11).

En 2018, 339 millions de personnes souffraient d'asthme à travers le monde, soit 4,3 % de la population mondiale, avec les prévalences les plus élevées observées dans les pays industrialisés. L'étiologie de l'asthme allergique est encore largement incomprise. Le développement de la maladie est le résultat d'interactions complexes entre la génétique de l'individu et les stimuli environnementaux auxquels il est soumis.

Parmi les stimuli environnementaux, certains ont été associés à l'induction d'une protection contre le développement de la maladie et d'autres ont été identifiés comme facteurs de risque de développement de cette dernière. Parmi les environnements pro-allergiques, ont été identifiées les infections virales respiratoires (12), l'exposition à des polluants de l'air ambiant tels que l'ozone (13) et une diminution d'exposition aux produits dérivés de bactéries de l'environnement comme le lipopolysaccharide (LPS), en lien avec l'«hypothèse de l'hygiène» (14). Si ces facteurs de risque ont été clairement identifiés, les mécanismes par lesquels ils favorisent l'apparition de la maladie sont largement incompris.

B) DÉVELOPPEMENT DE MODÈLES MURINS

Afin d'identifier ces mécanismes, nous avons tout d'abord développé trois modèles murins distincts dans lesquels des souris naïves étaient exposées à un des trois facteurs pro-allergiques (infection par le virus influenza A H1N1, ozone ou faible dose de LPS) avant d'inhaler des extraits d'acariens («house dust mite», HDM). Dans ces modèles, uniquement les souris préalablement exposées à un des trois facteurs pro-allergiques développaient les différentes caractéristiques de l'asthme allergique lorsqu'elles étaient exposées au HDM, contrairement aux souris uniquement exposées à l'allergène.

Nous avons ensuite procédé à une caractérisation de la réponse immunitaire innée induite par l'exposition de souris naïves aux différents facteurs pro-allergiques. Nous avons identifié un événement commun chez les souris exposées aux trois facteurs pro-allergiques, consistant en un recrutement rapide de neutrophiles au niveau des poumons. Nous avons ensuite procédé à une caractérisation transcriptionnelle non biaisée de ces neutrophiles via le séquençage des ARNs messagers à l'échelle unicellulaire, permettant d'étudier le transcriptome de chaque cellule individuellement. Dans cette expérience, les neutrophiles recrutés dans le poumon de souris exposées à un environnement pro-allergique (faible dose de LPS) ont été comparés à des neutrophiles présents dans le poumon d'une souris naïve et ceux présents dans le poumon de souris exposées à un environnement protecteur à l'encontre de l'asthme allergique (forte dose de LPS). De manière surprenante, nous avons observé que les neutrophiles des poumons «pro-allergiques» montraient un transcriptome distinct de celui observé dans les neutrophiles des deux autres conditions. Ces neutrophiles se distinguaient, par ailleurs, des neutrophiles pulmonaires «naïfs» ou «anti-allergiques» par une haute expression des marqueurs CXCR4, CD49d et Lamp-1. De plus, ces neutrophiles «pro-allergiques» surexprimaient significativement des gènes impliqués dans la formation de NETs. Nous avons également été capables d'identifier la présence de ces neutrophiles particuliers CXCR4^{hi}, CD49d^{hi} et Lamp-1^{hi} au niveau du poumon de souris exposées aux deux autres environnements pro-allergiques par cytométrie en flux.

C) PRÉSENCE DE NETs AU NIVEAU DES POUMONS DANS CES MODÈLES MURINS

Nous avons investigué la présence de NETs dans le poumon de ces souris par diverses méthodes. Nous avons mesuré la présence

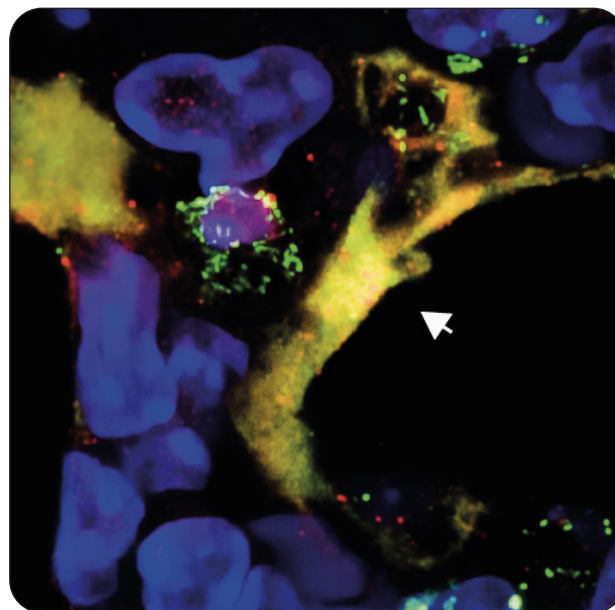
d'ADN libre dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire (LLBA), la présence de complexes neutrophile élastase-ADN dans le LLBA, la présence d'histones citrullinées par western blot et l'identification directe des NETs par visualisation de structures extracellulaires triplement marquées pour l'ADN (DAPI), la myéloperoxydase (MPO) et les histones citrullinées (Cit-H3) par microscopie confocale (Figure 1). Nous avons observé la présence de NETs dans les poumons des souris exposées aux trois environnements pro-allergiques, contrairement aux souris naïves. Pour déterminer l'origine de ces NETs, nous avons isolé des neutrophiles CXCR4^{hi} de poumons de souris exposées à de faibles doses de LPS, des neutrophiles pulmonaires de souris naïves, ainsi que des neutrophiles CXCR4^{lo} provenant de poumons de souris exposées à un environnement protecteur. Nous avons mis ces neutrophiles en culture et avons évalué leur libération de NETs. Au cours de cette expérience, seuls les neutrophiles CXCR4^{hi} provenant des poumons de souris exposées aux faibles doses pro-allergiques de LPS étaient capables de libérer des NETs *ex vivo*.

Le rôle de ces neutrophiles CXCR4^{hi} dans l'induction de l'asthme allergique a ensuite été déterminé par deux approches différentes. Tout d'abord, leur recrutement dans les poumons de souris exposées à de faibles doses pro-allergiques de LPS a été inhibé par l'administration d'antagonistes du récepteur CXCR2, indispensable à l'entrée des neutrophiles dans le poumon dans ce modèle. Les souris traitées ont ensuite été exposées au HDM et les caractéristiques de l'asthme allergique ont été évaluées. Lorsque ces neutrophiles ne pouvaient entrer dans le poumon, nous avons observé une forte diminution des caractéristiques de l'asthme allergique, suite à l'exposition à un environnement pro-allergique. Ensuite, dans une autre expérience, nous avons isolé ces neutrophiles CXCR4^{hi} des poumons des souris exposées à un environnement pro-allergique et les avons transférés à des souris naïves avant d'exposer ces dernières à un allergène. Le transfert de ces neutrophiles suffisait, à lui seul, à récapituler les caractéristiques de l'asthme allergique. Ces neutrophiles CXCR4^{hi} sont donc nécessaires et suffisants pour induire l'asthme allergique, suite à une exposition à un environnement pro-allergique.

D) RÔLE PATHOLOGIQUE DES NETs DANS CES MODÈLES D'ASTHME ALLERGIQUE

Afin de déterminer le rôle des NETs dans l'induction de l'asthme par l'exposition à des envi-

Figure 1. Neutrophil Extracellular Traps (NETs) dans un poumon



Les NETs sont identifiés comme des structures extracellulaires positives pour l'ADN (DAPI, bleu), la myéloperoxydase (MPO, vert) et l'histone 3 citrullinée (cit-H3, rouge) par microscopie confocale (flèche blanche).

ronnements pro-allergiques, nous avons inhibé leur libération ou les avons dégradés à l'aide de trois molécules différentes dans nos trois modèles d'asthme induit par des environnements pro-allergiques. Lorsque la formation de NETs était empêchée ou ces derniers dégradés dans nos trois modèles, les souris montraient une nette diminution des différentes caractéristiques de l'asthme allergique. Ces derniers résultats indiquent donc que les NETs facilitent l'induction d'une réponse allergique suite à une exposition à un environnement pro-allergique (15).

Notre étude identifie, pour la première fois, un dénominateur commun aux différents environnements pro-allergiques décrits par les études épidémiologiques, à savoir le recrutement de neutrophiles particuliers responsables de la libération de NETs. Cette découverte implique que les NETs pourraient constituer une cible thérapeutique intéressante dans la lutte contre le développement de l'asthme allergique, et pourraient permettre de cibler précisément des neutrophiles délétères, et non l'ensemble des neutrophiles, qui pourraient jouer un rôle bénéfique dans d'autres processus.

E) RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES CHEZ L'HOMME

Enfin, ces mêmes neutrophiles CXCR4^{hi} ont également été identifiés chez l'homme. En effet, Stein et coll. (16) ont comparé les cellules immunitaires innées de deux populations d'agriculteurs présentant des prévalences d'asthme très différentes, les Amish et les Hutterite. En effet, les Amish, vivant dans un milieu riche en produits microbiens, développent très peu d'asthme allergique, contrairement aux Hutterite, vivant dans un environnement pauvre en produits microbiens et présentant une prévalence élevée d'asthme allergique. De manière intéressante, les Hutterite se distinguent des Amish par une expression plus élevée de CXCR4 au niveau de leurs neutrophiles sanguins. Ces observations appuient celles réalisées dans des modèles murins au cours de notre étude et suggèrent que ces neutrophiles constituent une cible importante dans le traitement de l'asthme allergique.

LES NETs DANS LA COVID-19

A) LA COVID-19, UNE MALADIE INFLAMMATOIRE CIBLANT PRINCIPALEMENT LE POU MON

En mars 2020, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) déclarait un état de pandémie dû à la propagation du virus SARS-CoV2. Apparu dans la région de Wuhan, en Chine, le SARS-CoV2 est responsable de près de 428 millions de contaminations, dont 5,9 millions de décès à travers le monde au moment où nous rédigeons ces lignes (John Hopkins Centre for Systems Science and Engineering, <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>). Les symptômes provoqués par cette infection virale touchent principalement le système respiratoire, mais peuvent également se manifester sous forme de troubles gastro-intestinaux, cardiaques, rénaux, de maux de tête, d'anosmie ou de manifestations cutanées. Au niveau du système respiratoire, la COVID-19 se limite, dans la plupart des cas, à des symptômes grippaux mais peut également évoluer en syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) et induire une défaillance respiratoire aboutissant, malheureusement, à la mort du patient. De plus, les formes sévères de la COVID-19 sont généralement accompagnées d'une augmentation du taux sérique d'interleukines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-14, IL-10) aussi appelée tempête cytokinique. Enfin, les formes sévères de la COVID-19 ont également été associées à des troubles de la

coagulation caractérisés par la formation excessive de micro-thrombi (17). Rapidement, l'induction de NETs par le SARS-CoV2 a été évoquée. Cependant, au début de pandémie, les preuves expérimentales de la présence de NETs chez les patients souffrant d'infection au SARS-CoV2 faisaient encore défaut.

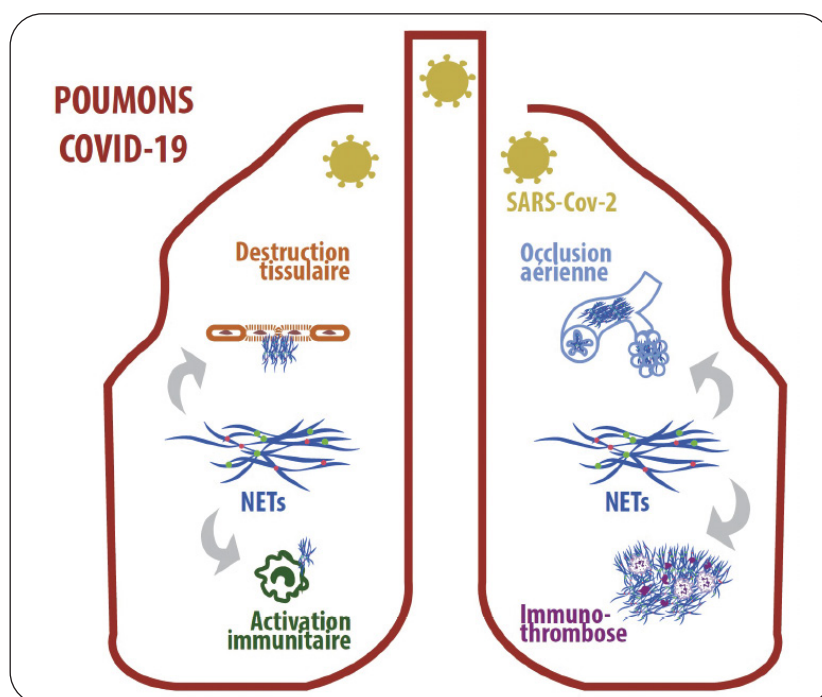
B) BIOPSIES PULMONAIRES DE PATIENTS DÉCÉDÉS DE LA FORME SÉVÈRE DE COVID-19

Afin de répondre à cette question, nous avons décidé d'évaluer la présence de NETs par immunofluorescence sur des biopsies pulmonaires de quatre patients décédés de la COVID-19, en collaboration avec Cécile Oury (Sciences biomédicales et précliniques, GIGA Cardiovascular-Sciences-Cardiology, Uliège) et Philippe Delvenne (Service d'Anatomie pathologique, CHU Liège). L'âge des patients était compris entre 51 et 73 ans et un seul des patients était une femme. Chaque cas a été testé positif pour le SARS-CoV2 par écouvillon naso-pharyngé et PCR au moment de l'admission. Les patients sont décédés entre 8 et 32 jours suivant l'hospitalisation. Tous les patients ont été mis sous assistance respiratoire et ont reçu un traitement à l'hydroxychloroquine ainsi qu'une antibiothérapie. Les analyses sanguines réalisées 24h avant le décès ont révélé une neutrophilie accompagnée d'une lymphopénie et d'une thrombocytopénie (trois des quatre patients) ainsi que des taux sériques élevés de protéine C-réactive. Les taux sériques d'interleukine-6 (IL-6) étaient élevés chez trois patients et les taux de produits de dégradation de la fibrine (D-dimères) étaient anormalement élevés chez tous les patients, suggérant la présence de phénomènes actifs de thrombose et de fibrinolyse. Les causes de décès identifiées étaient un SDRA, une pneumonie ou une défaillance de plusieurs organes. Des lésions typiques de dommages alvéolaires diffus ont été confirmées par un examen histopathologique. Dès lors, les quatre patients représentaient des cas types de formes sévères et mortelles de la COVID-19.

C) PRÉSENCE DE NETs DANS LES BIOPSIES PULMONAIRES

Nous avons tenté d'identifier les NETs sur des sections de poumons comme des zones extracellulaires triplement positives pour l'ADN (DAPI), la MPO et Cit-H3. Nous avons comparé, par microscopie confocale, les biopsies pulmonaires des patients atteints de la COVID-19 et des biopsies pulmonaires de patients décédés à l'hôpital de causes non respiratoires et non associées à une autre cause infectieuse. Afin d'écar-

Figure 2. Actions potentielles des NETs en fonction de leur localisation dans les poumons de patients COVID-19



La présence de NETs au niveau des alvéoles et bronchioles pourrait favoriser la formation de caillots entravant ainsi la ventilation pulmonaire. Au niveau de l'interstitium, les NETs pourraient induire des dommages tissulaires ou activer les macrophages. Dans les vaisseaux sanguins, les NETs pourraient favoriser la formation de micro-thrombi.

ter la possibilité de présence de NETs dans le poumon suite à une activation des neutrophiles systémiques, nous avons également évalué la présence de NETs dans d'autres organes tels que le cœur, le foie, le rein et le pancréas. Nous avons détecté de nombreuses zones contenant des NETs au niveau des biopsies pulmonaires des patients atteints de la COVID-19, contrairement aux biopsies pulmonaires de patients décédés de crise cardiaque. Nous n'avons pas détecté de NETs au niveau des autres organes, suggérant que la présence de composés de NETs (ADN libre), rapportée par d'autres études au niveau du sang des patients COVID, n'est pas associée à une libération de NETs généralisée à plusieurs organes différents.

Les NETs pouvant être impliqués dans divers phénomènes rencontrés dans la physiopathologie de la COVID-19 (destruction tissulaire, détresse respiratoire, présence de thrombi), nous avons procédé à une analyse histopathologique des zones enrichies en NETs au niveau du poumon.

Tout d'abord, des NETs ont été identifiés au niveau des compartiments alvéolaires ou bronchiques chez les quatre patients, où ils étaient

associés à de la fibrine, formant ainsi des bouchons provoquant une occlusion quasi complète de certaines alvéoles ou bronchioles (Figure 2). La présence de NETs dans le compartiment bronchoalvéolaire pourrait favoriser le dépôt de fibrine, la formation consécutive de zones de fibrose pulmonaire, ou encore, participer à une défaillance de la ventilation pulmonaire. Ensuite, deux patients montraient également la présence de NETs dans le compartiment interstitiel du poumon où ils étaient associés à la présence de neutrophiles et de macrophages. La proximité des NETs avec des macrophages pourrait suggérer un rôle des NETs dans l'activation excessive des macrophages aboutissant à la tempête cytokinique observée dans les formes sévères de la COVID-19. De plus, les NETs pourraient entraîner des lésions au niveau des cellules épithéliales et endothéliales, contribuant ainsi aux dommages tissulaires associés aux formes sévères de la COVID-19 (Figure 2). Enfin, chez trois patients, des zones enrichies en NETs étaient localisées dans le compartiment vasculaire, associées à des micro-thrombi. Comme les NETs peuvent faciliter l'activation des plaquettes ainsi que des molécules d'adhésion, cette observation pourrait indiquer un rôle des

NETs dans la formation de thrombi et l'apparition de coagulopathies décrites dans la COVID-19 (Figure 2).

Cette étude (18), bien que réalisée sur un nombre limité de patients, a été la première à identifier et à caractériser la présence de NETs au niveau du poumon dans le cadre de formes sévères de la COVID-19. Connaître la localisation des zones enrichies en NETs permet d'améliorer la compréhension de la physiopathologie de la maladie, mais également d'adapter la voie d'administration du traitement et permettre ainsi d'optimiser l'effet de ce dernier et d'éviter des effets systémiques non désirés.

CONCLUSION

Au cours de ces deux études, nous avons démontré que les neutrophiles jouaient des rôles inattendus au niveau du poumon dans le cadre de la sensibilisation allergique et l'infection au SARS-CoV2 via leur capacité de libération de NETs. Le défi des prochaines décennies sera de mieux comprendre comment inhiber certaines sous-populations particulières de neutrophiles, ainsi que la libération de NETs dans des conditions où elle devient excessive et dangereuse.

BIBLIOGRAPHIE

1. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* 2010;**33**:657-70.
2. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004;**303**:1532-5.
3. Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol* 2018;**18**:134-47.
4. Jenne CN, Wong CHY, Zemp FJ, et al. Neutrophils recruited to sites of infection protect from virus challenge by releasing neutrophil extracellular traps. *Cell Host Microbe* 2013;**13**:169-80.
5. Hemmers S, Teijaro JR, Arandjelovic S, Mowen KA. PAD4-mediated neutrophil extracellular trap formation is not required for immunity against influenza infection. *PLoS One* 2011;**6**:e22043.
6. Kaplan MJ, Radic M. Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *J Immunol* 2012;**189**:2689-95.

7. Gould TJ, Vu TT, Swystun LL, et al. Neutrophil extracellular traps promote thrombin generation through platelet-dependent and platelet-independent mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014;**34**:1977-84.
8. Porto BN, Stein RT. Neutrophil extracellular traps in pulmonary diseases: too much of a good thing? *Front Immunol* 2016;**7**:311.
9. Holgate ST. Pathogenesis of asthma. *Clin Exp Allergy* 2008;**38**:872-97.
10. Schleich FN, Manise M, Sele J, et al. Distribution of sputum cellular phenotype in a large asthma cohort: predicting factors for eosinophilic vs neutrophilic inflammation. *BMC Pulm Med* 2013;**13**:11.
11. Lambrecht BN, Hammad H. The immunology of asthma. *Nat Immunol* 2015;**16**:45-56.
12. Busse WW, Lemanske RF, Gern JE. Role of viral respiratory infections in asthma and asthma exacerbations. *Lancet* 2010;**376**:826-34.
13. Alexis NE, Carlsten C. Interplay of air pollution and asthma immunopathogenesis: a focused review of diesel exhaust and ozone. *Int Immunopharmacol* 2014;**23**:347-55.
14. Eder W, von Mutius E. Hygiene hypothesis and endotoxin: what is the evidence? *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004;**4**:113-7.
15. Radermecker C, Sabatel C, Vanwinge C, et al. Locally instructed CXCR4 hi neutrophils trigger environment-driven allergic asthma through the release of neutrophil extracellular traps. *Nat Immunol* 2019;**20**:1444-55.
16. Stein MM, Hrusch CL, Gozdz J, et al. Innate immunity and asthma risk in Amish and Hutterite farm children. *N Eng J Med* 2016;**375**:411-21.
17. Cao X. COVID-19: immunopathology and its implications for therapy. *Nat Rev Immunol* 2020;**20**:269-70.
18. Radermecker C, Detrembleur N, Guiot J, et al. Neutrophil extracellular traps infiltrate the lung airway, interstitial, and vascular compartments in severe COVID-19. *J Exp Med* 2020;**217**:e20201012.

Les demandes de tirés à part doivent être adressées au Dr Marichal T, Département d'Immunophysiologie, Faculté de Médecine vétérinaire, ULiège, Belgique.
Email : t.marichal@uliege.be