



HAL
open science

Mécanismes contrôlant la réponse IL-17 au cours de la BPCO et des atteintes intestinales associées à l'exposition à la fumée de cigarette

Gaëlle Rémy Rémy

► **To cite this version:**

Gaëlle Rémy Rémy. Mécanismes contrôlant la réponse IL-17 au cours de la BPCO et des atteintes intestinales associées à l'exposition à la fumée de cigarette. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2014. Français. NNT : 2014LIL2S035 . tel-01146000

HAL Id: tel-01146000

<https://theses.hal.science/tel-01146000>

Submitted on 27 Apr 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Lille Nord de France

Thèse

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE II
Discipline : Immunologie

Présentée et soutenue publiquement par

GAËLLE RÉMY

Le 30 Septembre 2014

**Mécanismes contrôlant la réponse IL-17
au cours de la BPCO et des atteintes intestinales
associées à l'exposition à la fumée de cigarette**

Devant le jury composé de :

Monsieur le Professeur Lionel PRIN	Président
Madame le Professeur Claire ANDRÉJAK	Rapporteur
Monsieur le Professeur Philippe SEKSIK	Rapporteur
Monsieur le Professeur Didier CATALDO	Examineur
Monsieur le Docteur Benoît FOLIGNÉ	Examineur
Monsieur le Docteur Philippe GOSSET	Directeur de Thèse

Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, Inserm U1019, CNRS UMR 8204, Institut Pasteur de
Lille, Université Lille Nord de France
Équipe « Lung Infection and Innate Immunity"»

Ce qui est vraiment bon, c'est de se battre avec persuasion, embrasser la vie et vivre avec passion, perdre avec classe et vaincre en osant....

Parce que le monde appartient à celui qui ose

Charlie Chaplin

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur Philippe Gosset, mon directeur de thèse. Merci Philippe, pour l'encadrement dont vous avez su faire preuve pendant ces quatre années. Merci pour l'esprit détendu que vous gardiez face à mes doutes, je ne compte plus le nombre de « Ne paniques pas ! » que j'ai entendu de votre part. Merci pour tout.

Je tiens à remercier Madame Muriel Pichavant, pour sa compréhension, son esprit scientifique très aiguisé, sa disponibilité et son investissement. Merci pour ta compagnie durant ces longues journées enfermées au Flexivent...

Je tiens également à remercier Monsieur François Trottein pour m'avoir acceptée au sein de son équipe pour la réalisation de cette thèse.

Je remercie Madame Claire Andréjak et Monsieur Philippe Seksik d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail. Je souhaite également remercier Messieurs Didier Cataldo et Benoit Foligné pour leur participation en qualité d'examineurs. Et enfin je remercie Monsieur Lionel Prin d'avoir accepté de présider ce jury de thèse.

Un énorme Merci à Gwenola Kervoaze, technicienne d'exception pour moi, qui non seulement a toujours été présente, sans compter ses heures, lors des jours de « grosses » manip' mais également pour sa bonne humeur, sa joie de vivre, tu es le pilier de ce groupe, n'en doutes pas ! Sans toi et tes tenues colorées, la vie au labo serait tellement plus terne.

Je souhaite remercier Mesdames Christelle Faveeuw et Delphine Cayet, pour les conseils, le soutien et la bonne humeur pendant les repas du midi ! Merci également pour les conseils scientifiques et pratiques que vous avez su me donner.

Je tiens à remercier tout particulièrement Mademoiselle Florence Hennegrave qui, par sa gentillesse et sa sollicitude, a été un véritable bonheur pendant cette dernière année particulièrement difficile et qui m'a toujours donné l'espoir malgré les accidents, les blessures et les tourments.

Un grand merci à Philippe Persoons, soutien psychologique de taille et sans faille ! Ta présence durant cette dernière année m'a rendu les choses plus faciles, tu es une personne formidable, un confident exceptionnel, un fantastique lithothérapeute, le meilleur de tous...

Merci à mes compagnons de route du groupe : Cécile Olivier, Clémence Mordacq, Olivier Le Rouzic, Magdiel Perèz Crùz et Bachirou Koné.

Je voudrais également remercier le groupe « Sirard » : Merci Jean-Claude et Christophe pour vos conseils et vos critiques constructives lors des présentations. Merci Julien, éternel râleur mais tellement agréable, ne changes pas. Merci Delphine, little D, toujours à attendre devant la centri, Merci Rémi pour ta disponibilité et Merci Griselda, por las charlas sobre la vida entre dos experimentos.

Merci au groupe « Trottein » : Merci Josette, toujours disponible pour répondre aux questions et aider, Merci Élodie pour ta gentillesse, Merci Christophe et Adeline.

Je te remercie Audrey, pour ton soutien, Laëtitia, pour les petits chocolats laissés au Fortessa quand on alternait utilisation jour/nuit de l'appareil, merci Teddy et Annabelle.

Un remerciement spécial à Emeric Deruy pour les chocolats chauds et pour les carrés de chocolat Côte d'Or, noisettes entières, le meilleur des chocolats ! Les longues analyses FACS étaient du coup moins pénibles.

Un merci tout particulier à Claude, Geneviève, Malika, Fanny et Philippe. Ces heures de monitorat ont été un vrai plaisir et une véritable bouffée d'oxygène. Votre présence et votre bienveillance m'ont profondément touchée.

Un grand merci à l'équipe de la plateforme de haute technologie animale pour leurs conseils et leur amitié : Jean-Pierre, Thierry, David, Romain, Sylvie, Anthony et Nathalie.

Je remercie également l'Inserm et la région Nord-Pas de Calais pour le financement de ce travail.

D'un point de vue plus personnel, je tiens à te remercier Maman, tu as toujours été un modèle pour moi. Ton soutien sans faille, ta persévérance et ta force durant ces trentes dernières années m'ont toujours inspirée. Cette thèse est le fruit de la confiance que tu as eue en moi.

Je souhaite également dédier ce travail à mon père en espérant qu'il aurait été fier de moi.

Merci à ma petite sœur, Julie pour ta présence, ton amour et tout simplement le fait d'être toi. Tu es tout pour moi.

Merci à Didier, tu as été là dans les bons mais aussi les mauvais moments, merci d'avoir su m'aimer comme une fille.

Je remercie ma Lulu, mon âme sœur, à mes côtés depuis 15 ans maintenant, tu connais toujours la fin de mes phrases avant même que je ne les commence alors pas besoin d'en dire plus, tu sais ce que tu représentes pour moi.

A Maribel, Paloma et Francisco « Kiko », mes collègues d'Espagne qui m'ont fait percevoir la science d'une manière différente. Merci pour cette amitié.

Et enfin, à toi Julien. En voyant cette thèse tu dois te dire ouf, enfin libéré... les derniers mois n'ont pas été faciles, tu as beaucoup enduré mais tu as toujours été là, ce travail t'appartient un peu aussi. Merci pour ta présence, ton soutien, ton amour, merci simplement d'être là.

REMERCIEMENTS	I
TABLE DES MATIÈRES	III
LISTE DES ABRÉVIATIONS	VII
LISTE DES FIGURES	VIII
LISTE DES TABLES	IX
RÉSUMÉ	X
SUMMARY	XI
I. Le Poumon	1
A. Anatomie du poumon	1
B. Constituants cellulaires de la muqueuse pulmonaire.....	2
1. Muqueuse Trachéo-bronchique	2
2. Muqueuse des bronchioles	3
3. Muqueuse alvéolaire	3
C. Mécanismes de défense du poumon	4
1. Mécanismes Anatomiques	4
2. Mécanismes dynamiques	5
3. Mécanismes Moléculaires	6
4. Mécanismes immunologiques.....	6
D. Les cellules immunitaires	7
1. Les cellules de l'immunité innée	7
2. A l'interface du système inné et adaptatif : Les Cellules NKT	13
3. Les cellules de l'immunité adaptative	15
E. Un autre système de muqueuse : l'intestin	17
1. La structure de la muqueuse intestinale	17
2. Système de défense de la muqueuse intestinale.....	19
F. Altération des mécanismes de défense des muqueuses.....	20
II. La Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO)	21
A. Définition de la BPCO	21
B. Épidémiologie de la BPCO	23
C. Impact économique de la BPCO.....	25
D. Facteurs de risques.....	25
1. Facteurs d'origine génétiques	25
2. Facteurs d'origine environnementale	26
E. Physiopathologie de la BPCO	28

1. Étape 1 : Réponse initiale à la fumée de cigarette.....	28
2. Étape 2 : Transition immunité innée et adaptatrice	30
3. Étape 3 : Réponse Immune Adaptative.....	30
4. Autoimmunité et BPCO	32
F. BPCO : de l'atteinte pulmonaire à l'atteinte systémique	33
1. BPCO et dysfonction musculaire	33
2. BPCO et atteintes cardio-vasculaires	34
3. BPCO et atteintes intestinales.....	34
4. BPCO et autres pathologies.....	34
G. Le stress oxydatif.....	34
1. Le stress Oxydatif dans la BPCO	35
2. Système antioxydant du poumon	36
3. Thérapies antioxydantes	37
III. La réponse immunitaire Th17.....	38
A. Polarisation des cellules Th17	38
B. Cytokines produites par les lymphocytes Th17	42
1. Cytokine IL-17A.....	42
2. La cytokine IL-17F	46
3. La cytokine IL-22	46
C. Réponses Th17 et Infection.....	47
D. Réponse Th17 et Auto-immunité.....	47
E. Réponse Th17 et maladie de Crohn.....	49
F. Équilibre Th17 / T régulateurs.....	53
1. Les lymphocytes T régulateurs	53
2. Équilibre de la balance Th17 / T régulateurs.....	53
IV. Une molécule régulatrice : l'Interleukine 10	55
A. La famille de cytokines de l'IL-10	55
B. Récepteur à l'IL-10 et signalisation	55
C. Production et Régulation de l'IL-10.....	58
1. Production de l'IL-10 par les cellules du système immunitaire inné	58
2. Production de l'IL-10 par les cellules du système immunitaire adaptatif.....	59
D. Action de l'IL-10.....	62

E.	Rôle de l'IL-10 et réponses immunitaires.....	63
1.	Rôle de l'IL-10 dans la défense de l'hôte.....	63
2.	Rôle de l'IL-10 dans les maladies autoimmunes et inflammatoires.....	64
V.	Le Microbiome	67
A.	Définition.....	67
B.	Microbiome et système immunitaire.....	68
C.	Microbiote Pulmonaire	73
D.	Dysbiose et pathologies	74
1.	Effet de l'exposition à la fumée de cigarette sur le microbiote intestinal.....	75
2.	Effet de l'exposition à la fumée de cigarette sur le microbiote pulmonaire	75
E.	Interactions muqueuses intestinale et pulmonaire sous influence du microbiote.....	76
VI.	Objectifs du travail.....	78
VII.	Résultats.....	79
A.	Partie 1 : L'activation des cellules <i>i</i> NKT induite par le stress oxydatif est impliquée dans la pathogénèse de la BPCO	79
1.	ABSTRACT	80
2.	INTRODUCTION	81
3.	MATERIALS AND METHODS.....	82
4.	RESULTS	84
5.	DISCUSSION	97
6.	REFERENCES.....	100
7.	Supplementary Datas	102
B.	Partie 2 : L'inflammation de la muqueuse induite par l'exposition à la fumée de cigarette est contrôlée par l'interaction entre l'IL-10, l'IL-17 et le microbiote intestinal.....	111
1.	Abstract.....	112
2.	Introduction.....	113
3.	Results and discussion	116
4.	References	130
5.	Supplementary Datas	131
VIII.	Discussion et Perspectives	134
A.	Rôle des cellules <i>i</i> NKT dans le développement de la BPCO	134
B.	Mécanismes d'activation des cellules <i>i</i> NKT en réponse à la fumée de cigarette.....	136

C. Implication et contrôle du stress oxydatif dans la BPCO	138
D. Rôle de l'IL-10 dans la BPCO induite par la fumée de cigarette.	141
E. Interaction entre compartiments pulmonaire et intestinal.....	141
F. Contrôle de la réponse IL-17 et implication du microbiome dans le développement de la BPCO et des MICI.....	143
G. Perspectives Thérapeutiques	145
H. Conclusion	151
Références Bibliographiques.....	150
Travaux et Récompenses	168

AAT : α 1-antitrypsine
BPCO : Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive
CCL : chimiokine ligand de type C-C
CCR2 : Récepteur de chimiokines de type C-C de type 2
CD : Cluster de différenciation
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CXCL : chimiokine ligand de type C-X-C
DC : Cellule dendritique
ERK : Kinase régulée par des signaux extracellulaires
FoxP3 : Forkhead Box P3
GM-CSF : Facteur de stimulation de colonies – Granulocytes/Macrophages
GOLD : Initiative Globale pour les maladies chroniques obstructives du poumon
GSH : Glutathion
HO-1 : Hème Oxygénase-1
IFN- γ : Interféron gamma
IgA : Immunoglobuline de type A
IL-X : Interleukine-X
iNKT : Lymphocyte T Tueur naturel invariant
LPS : LipoPolySaccharide
MMP : Métalloprotéases matricielles
NAC : N-Acétylcystéine
NF- κ B : Facteur nucléaire kappa B
NK : Cellule Tueuse naturelle
PRR : Récepteur de reconnaissance de motif
Reg : Protéine de régénération dérivée des îlots
ROR γ T : Récepteur orphelin gamma T en relation avec l'acide rétinoïque
ROS : Espèces réactives de l'oxygène
RNS : Espèces réactives de l'azote
SOCS : Suppresseur de la signalisation cellulaire
SOD : Super Oxyde Dismutase
STAT : transducteur et activateur du signal de transcription
TCR : Récepteur des cellules T
TGF- β : Facteur de croissance de transformation beta
Th : T auxiliaire
TLR : Récepteur Toll Like
TNF- α : Facteur de nécrose tumorale alpha
Treg : Lymphocyte T régulateur

Figure 1 : La structure du poumon.....	2
Figure 2 : Représentation [...] des parois des voies aériennes pulmonaires	4
Figure 3 : Mécanismes anatomiques de défense du poumon	5
Figure 4 : La phagocytose par les macrophages	8
Figure 5 : Les cellules iNKT : le « couteau suisse » du système immunitaire	15
Figure 6 : Anatomie de la muqueuse intestinale	19
Figure 7 : Variations régionales de la mortalité liée à la BPCO	24
Figure 8 : Physiopathologie de la BPCO	32
Figure 9 : La polarisation Th17	39
Figure 10 : Voies de signalisation engagées lors de la polarisation Th17	41
Figure 11 : Effets pléiotropiques de l'IL-17A.....	44
Figure 12 : Protections et pathologies associées à la réponse Th17	52
Figure 13 : Balance entre lymphocytes Treg et Th17.....	54
Figure 14 : Voie de signalisation de l'IL-10.....	57
Figure 15 : Régulation de l'IL-10 dans les cellules T.....	61
Figure 16 : Le microbiome humain	68
Figure 17 : Maintenance de l'homéostasie Hôte/microbiote.....	71

Table 1 : Principaux chémoattractants des neutrophiles	10
Table 2 : Principales cellules de l'immunité innée et leur fonction	13
Table 3 : Classification des stades de BPCO selon le GOLD	22
Table 4 : Échelle de dyspnée du Medical Research Council.....	23
Table 5 : Nouvelle classification de GOLD adoptée en 2011	23
Table 6 : Détection des composants de la fumée de cigarette [...] par les PRRs.....	29
Table 7 : L'IL-17A induit la production de différents médiateurs [...].....	43
Table 8 : Gènes ciblés par l'action synergique de l'IL-17 et d'autres molécules	45
Table 9 : La famille de cytokines IL-10	55

La Broncho-Pneumopathie chronique obstructive (BPCO) est un problème majeur en santé publique puisque ce sera la 3ème cause de mortalité en 2020. Il s'agit d'une maladie inflammatoire chronique du poumon se traduisant par une obstruction progressive des bronches, partiellement ou non réversible, incluant bronchite chronique, hypersécrétion de mucus et emphysème. L'atteinte ne se limite pas au poumon et peut affecter d'autres organes tels que les muscles, le cœur ou encore les intestins. L'exposition à la fumée de cigarette représente notamment un facteur de risque dans le cadre de la maladie de Crohn. Le premier facteur de risque impliqué dans le développement de cette maladie est l'exposition à la fumée de cigarette qui induit un stress oxydatif au sein du poumon responsable d'une inflammation chronique et du développement de la BPCO. L'interleukine-17 joue un rôle essentiel dans ce processus en contrôlant l'inflammation et l'altération de la fonction respiratoire. L'objectif de cette thèse est de comprendre les facteurs contrôlant cette réponse IL-17 afin de proposer ensuite de nouvelles voies thérapeutiques. Dans la première partie, nous nous sommes focalisés sur le stress oxydatif et sur son impact sur les cellules de l'immunité innée. Ensuite, nous abordons le rôle d'un facteur immunorégulateur, l'IL-10, et à son interférence avec le microbiote digestif. Cela nous a amené à nous intéresser aux lésions digestives associées au tabagisme. Un modèle murin d'exposition chronique à la fumée de cigarette a été développé afin de reproduire la physiopathologie de la BPCO. Concernant l'impact du stress oxydatif, nous avons étudié le rôle des cellules iNKT (cellules ayant un puissant potentiel dans l'immunorégulation et dans l'inflammation) qui sont activées par ce type de stress. Les cellules iNKT sont rapidement recrutées et activées au sein du poumon suite à l'exposition à la fumée de cigarette. En utilisant des souris déficientes, nous avons montré l'importance de ces cellules dans la physiopathologie de la BPCO. Cette pathogénicité est dépendante de la production de l'interleukine-17 par ces cellules et est initiée par le stress oxydatif sur les cellules épithéliales pulmonaires et les cellules dendritiques qui activent les cellules iNKT.

Dans la seconde partie du projet, l'IL-10 intervient notamment dans le contrôle de l'inflammation afin d'éviter le développement de réponses immunologiques exacerbées dans certains contextes. Dans les poumons exposés à la fumée de cigarette, la production d'IL-10 est augmentée et le déficit pour cette cytokine entraîne une augmentation de la réponse Th17 et du déclin de la fonction pulmonaire. Une dysbiose (altération du microbiote) est observée avec la fumée de cigarette et le déficit à l'IL-10. De plus, une déplétion des bactéries Gram+ par antibiothérapie permet de limiter le développement de la réponse IL-17 et de l'atteinte pulmonaire soulignant l'importance du microbiote.

En conclusion, nous avons identifié le stress oxydatif et l'IL-10 comme facteurs intervenant dans la réponse IL-17 associée à la BPCO. Ce travail souligne également le rôle du microbiome comme un organe à part entière et la modulation de ce dernier pourrait aboutir à l'identification de nouvelles voies thérapeutiques.

Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) is a major health problem which is going to become the third leading cause of death worldwide by 2020. COPD is characterized by a chronic inflammation of the airways causing progressive bronchial obstruction, with no completely reversible airflow limitation, including chronic bronchitis, mucus hypersecretion and emphysema. The pathology is not limited to the airways and can affect others organs such as muscles, heart or intestine. Cigarette smoke exposure can particularly represent a risk factor for Crohn disease. Cigarette smoke exposure is the most important risk factor for developing COPD. Exposure to cigarette smoke induces a strong burden of reactivities oxygen species and this oxidative stress is responsible for a chronic inflammation and the development of COPD. Interleukin (IL)-17 plays a critical role in controlling process of inflammation and lung function decline.

The aim of this thesis is the understanding which factors are controlling the IL-17 response in order to propose new therapeutic approaches.

In the first part, we focused on oxidative stress and its impact on innate immune cells. Then we addressed the role of an immunoregulatory factor, the interleukin (IL)-10, and its interference with intestinal microbiota. This part leads us to study intestinal damages linked to cigarette smoking.

To mimic the physiopathology of COPD, we set up a mouse model of chronic exposure to cigarette smoke. Concerning the impact of oxidative stress, we investigated the role of *i*NKT cells (cells with a crucial potent role in immunoregulation and inflammation) activated by this type of stress. *i*NKT cells rapidly accumulate and be activated within the lungs of cigarette smoke exposed mice. Using deficient mice, we demonstrated that these cells strongly contribute to the COPD pathogenesis. This pathogenicity is *i*NKT cells-produced IL-17 dependant and initiated by the effect of oxidative stress on airway epithelial cells and dendritic cells activating *i*NKT.

In the second part of the work, IL-10 interferes notably in the inflammation control in order to avoid exacerbated immunological responses development in some contexts. In cigarette smoke exposed lungs, IL-10 production is up-regulated and the deficiency for this cytokine leads to an increased Th17 response and to lung function decline. An altered microbiota (named dysbiosis) is observed with cigarette smoke exposure and IL-10 deficiency. Moreover, Gram+ bacteria depletion using antibiotics is able to limit the IL-17 response development and the lung function decline highlighting the crucial role for microbiota.

To conclude, we identified two factors, oxidative stress and IL-10, implicated in IL-17 response linked to COPD. This work also underlines the role of microbioma as a whole organ and the modulation of this microbioma could result in new therapeutic ways identification in COPD.

INTRODUCTION

I. Le Poumon

Le poumon est le principal organe du système respiratoire. En serré entre la cage thoracique et le diaphragme, les poumons gauche et droit, sont enveloppés et protégés par la plèvre, membrane constituée de deux feuillets. Ils sont distincts et séparés en leur centre par le médiastin.

A. Anatomie du poumon

Chez l'homme, les poumons sont divisés en trois lobes à droite, deux lobes à gauche, desservis par les bronches lobaires. L'arborisation bronchique proximale définit, au sein de ces lobes à droite et à gauche, 10 segments broncho-pulmonaires. Les bronchioles vont aboutir aux lobules, correspondant au plus petit compartiment anatomique et fonctionnel du poumon. (Rouvière *et al*, 2002).

Deux secteurs anatomiques se définissent au sein des poumons : l'arbre bronchique et le poumon périphérique. Ces 2 secteurs sont continus mais diffèrent par leur structure histologique et leur fonction :

- L'arbre bronchique (ou portion conductrice) s'étend de la trachée à la bronchiole ; il a un rôle essentiel dans la conduction et le conditionnement de l'air. Les phénomènes d'agression de l'arbre bronchique sont essentiellement aéro-conduits (virus, bactéries, gaz toxiques, particules minérales ou allergènes inhalés).
- Le poumon périphérique permet les échanges gazeux. Il s'étend de la bronchiole terminale à l'alvéole organisée en lobules. Chaque lobule pulmonaire primaire renferme 3 à 30 acini, plus petite unité fonctionnelle du poumon où se réalisent les échanges gazeux. Les phénomènes d'agression du poumon périphérique peuvent être aéro-conduits ou véhiculés par voie systémique (cellules immunocompétentes, complexes immuns, cytokines ou molécules toxiques).

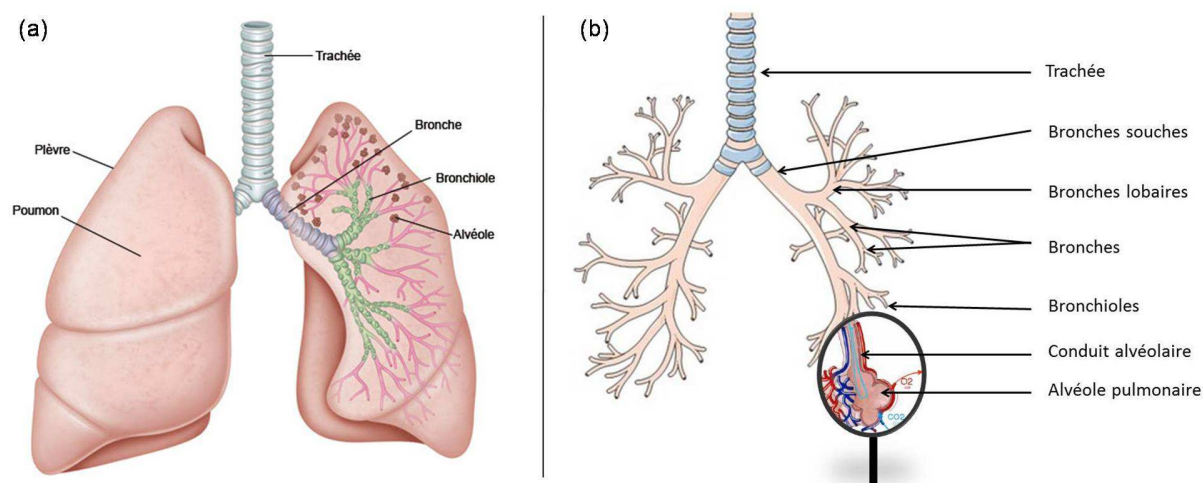


Figure 1 : La structure du poumon.

(a) Les poumons sont séparés en trois lobes à droite et deux lobes à gauche (b) dichotomie de l'arbre bronchique : l'arbre bronchique s'étend de la trachée à la bronchiole. A l'issue de la trachée, celle-ci se sépare en deux bronches souches (desservant le poumon gauche et le poumon droit). Chaque bronche souche se sépare ensuite en bronche lobaire et segmentaire qui alimentera un des dix segments broncho pulmonaire. La dernière dichotomie bronchique constitue la bronchiole conduisant au conduit alvéolaire et à l'alvéole pulmonaire (Illustration d'Éléonore Lamoglia).

B. Constituants cellulaires de la muqueuse pulmonaire

Le terme "muqueuse" s'applique à un épithélium qui bénéficie d'une lubrification muqueuse ainsi qu'au tissu conjonctif le sous-tendant, appelé *lamina propria*. Le mucus est produit par des cellules épithéliales muqueuses (souvent caliciformes) et par des glandes muqueuses profondes. Il a pour première fonction de protéger la muqueuse contre les agressions climatiques ou physiques notamment en participant à la clairance muco-ciliaire. (www.Respir.com)

1. Muqueuse Trachéo-bronchique

L'épithélium de la muqueuse trachéo-bronchique (ou respiratoire) est un épithélium pseudo-stratifié constitué de :

- Cellules ciliées, qui sont les plus abondantes. Elles sont munies de cils vibratiles (200 à 300 par cellule) d'environ $7\mu\text{m}$ de long qui vont participer à la clairance muco-ciliaire.
- Cellules caliciformes (1 cellule pour 5 cellules ciliées), caractérisées par la présence de nombreuses vacuoles de sécrétion au niveau du pôle apical. Ces vacuoles contiennent des glycoprotéines qui seront excrétées par exocytose et qui représenteront environ 10% du mucus trachéal. Le nombre de cellules caliciformes augmente avec celui des impuretés dans l'air inspiré. Ces cellules seront spécifiquement retrouvées au niveau de la muqueuse trachéo-bronchique.

Le chorion de la muqueuse respiratoire est très riche en fibres élastiques. Il contient notamment des plasmocytes sécréteurs d'IgA et renferme de nombreuses glandes acineuses responsables de 90% du mucus trachéo-bronchique sécrété.

Au niveau des bronches, nous retrouvons également des plaques de cartilage hyalin irrégulièrement réparties sur toute la circonférence ainsi que des cellules musculaires lisses et des fibres élastiques et de collagène.

2. Muqueuse des bronchioles

L'épithélium de recouvrement des bronchioles est un épithélium cylindrique simple constitué de :

- Cellules ciliées,
- Cellules non ciliées appelées cellules Club (anciennement cellules de Clara). Ce sont des cellules pyramidales dont le pôle apical est garni de microvillosités. Dans la partie apicale de leur cytoplasme existent des grains de sécrétion expulsés par exocytose. Ce produit de sécrétion est composé d'antiprotéases et d'oxydases.

Le chorion est dépourvu de glandes acineuses dans ce tronçon de l'arbre bronchique. Le cartilage n'est plus présent mais on retrouve encore des cellules musculaires lisses et des fibres élastiques.

3. Muqueuse alvéolaire

L'épithélium alvéolaire se compose de 2 types de cellules :

- Les pneumocytes de type I, qui recouvrent 97% de la paroi alvéolaire. Leur apparence est de type « aplatie » et leur rôle est d'être imperméables aux liquides mais perméables aux gaz.
- Les pneumocytes de type II sont quant à eux des cellules plus volumineuses. Ces cellules produisent le surfactant présentant des propriétés tensio-actives, recouvrant la surface alvéolaire et diminuant la tension de surface. Cette propriété va permettre de faciliter les échanges gazeux. Les pneumocytes de type II sont également capables de présenter des antigènes et de sécréter des cytokines.

A l'état normal, les principaux éléments cellulaires retrouvés dans la lumière alvéolaire sont les macrophages qui se déplacent sur la paroi alvéolaire, immergés dans le surfactant.

Le chorion de cette muqueuse est riche en fibres élastiques. Le muscle devient discontinu mais toujours actif : il se contracte en fin d'expiration et se relâche à l'inspiration.

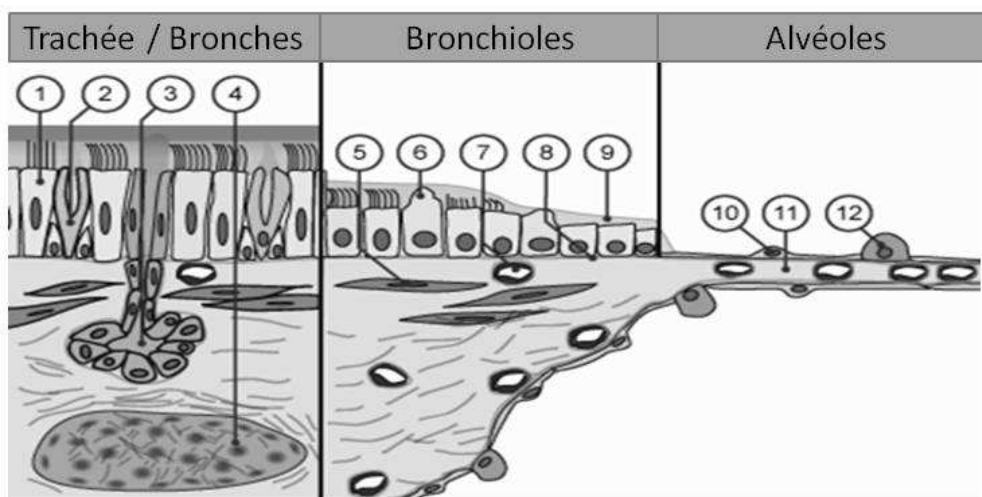


Figure 2 : Représentation schématique comparative des parois des voies aériennes pulmonaires.

1. Épithélium cilié; 2. Cellules caliciformes; 3. Glandes sous muqueuse; 4. Cartilage; 5. Cellules musculaires lisses; 6. Cellules Club; 7. Capillaires sanguins; 8. Membrane basale; 9. Surfactant; 10. Pneumocyte de type I; 11. Septum alvéolaire; 12. Pneumocyte de type II (adapté de Bergofsky *et al.*, 1991).

C. Mécanismes de défense du poumon

1. Mécanismes Anatomiques

L'arborisation bronchique va permettre d'augmenter l'impaction mucoïde (ou bouchon muqueux) et la sédimentation des particules inhalées préservant ainsi les zones d'échange gazeux. En fonction de leur diamètre, les particules seront bloquées à différents niveaux de l'arbre bronchique. Les particules dont le diamètre sera supérieur à 5 μm vont être arrêtées au niveau des voies aériennes supérieures. Celles de diamètre compris entre 3 et 5 μm s'impactent sur la muqueuse bronchique. Les particules de diamètre compris entre 1 μm et 3 μm sédimentent sur les parois alvéolaires et bronchiolaires. Les particules de diamètre inférieur à 1 μm diffusent au niveau de l'alvéole. En ce qui concerne les nanoparticules, celles-ci seront capables de pénétrer à l'intérieur de la cellule (voire même dans le noyau) mais également de diffuser dans la voie systémique (Oberdörster *et al.*, 2005). La figure 3 reprend schématiquement les zones d'impaction et de sédimentation des particules en fonction de leur taille.

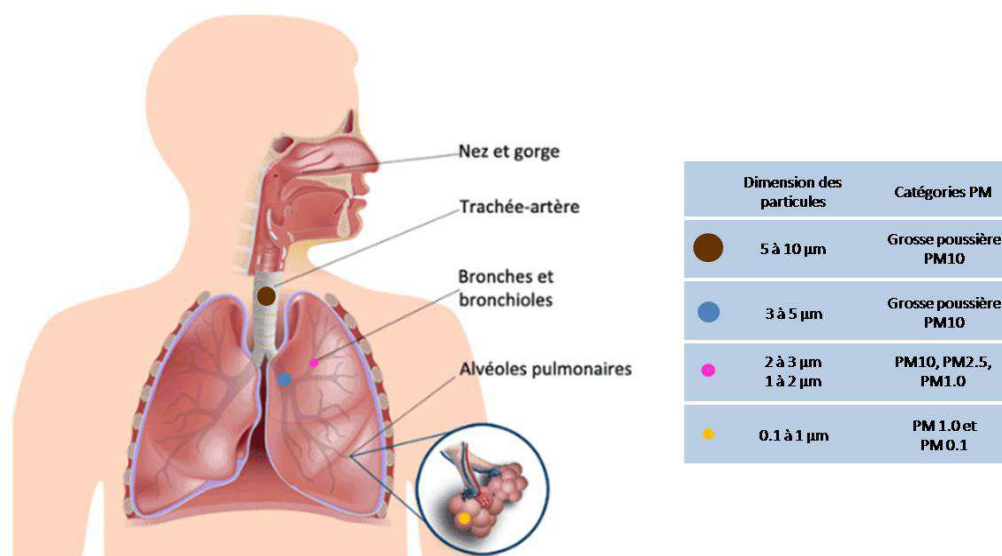


Figure 3 : Mécanismes anatomiques de défense du poumon

L'arborisation bronchique protège anatomiquement les poumons des particules. La réduction progressive du diamètre des bronches va servir de filtre aux particules inhalées. Plus la particule est grosse, plus elle sera bloquée rapidement dans les bronches. (Adapté de <http://www.puremaison.fr/blog/dossiers/pourquoi-filtrer-lair-dans-lhabitat/>)

2. Mécanismes dynamiques

Comme nous l'avons précisé précédemment, l'épithélium trachéo-bronchique est recouvert de mucus qui va former un film continu de 5 à 10 μm d'épaisseur à la surface de l'épithélium respiratoire et ce, depuis la trachée jusqu'aux bronchioles terminales. Ce mucus constitué de 95% d'eau, de 1% de glycoprotéines (mucines) et de 1% de lipides ainsi que d'ions va contribuer à la bonne hydratation de la muqueuse.

Le mucus est un des éléments essentiels du système de défense de l'appareil respiratoire. En effet, il va permettre la capture d'aéro-contaminants puis leur élimination grâce au tapis muco-ciliaire et à la toux.

Les cils présents à l'extrémité apicale des cellules ciliées mesurent environ 5 à 7 μm de long. Leur fréquence de battement varie de 10 à 20 battements par seconde et est dépendante notamment de la viscosité du mucus, de son épaisseur et du pH. Cette clairance muco-ciliaire des aéro-contaminants va s'effectuer à la vitesse de 2,4 à 12 mm par minute depuis les bronchioles terminales jusqu'à la trachée (Antunes *et al.*, 2007).

La toux est une expiration active, brusque, saccadée et bruyante qui fait suite à une inspiration profonde. Au cours de la phase expulsive, des débits expiratoires très élevés peuvent être mesurés, allant jusqu'à 10 litres par seconde (soit approximativement une vitesse de 10 mètres par seconde). La toux est un phénomène réflexe qui peut être causé par différents stimuli et notamment des stimuli physiques (accumulation de mucus, corps étranger) ou chimiques (pH, inflammation) (www.Respir.com).

3. Mécanismes Moléculaires

Les mécanismes moléculaires impliqués dans la défense du poumon sont principalement associés aux composants présents dans le liquide de recouvrement de l'épithélium.

Dans un premier temps, nous pouvons citer les molécules de piégeage qui sont représentées par les glycoprotéines constituant le mucus, nommées mucines. Ces mucines vont notamment interagir, grâce à leurs chaînes glycaniques, avec les micro-organismes (Lamblin *et al.*, 1992).

Le mucus va également contenir des anti-protéases, telles que l' α -1-antitrypsine ou les TIMP (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase), qui vont permettre de limiter l'action des protéases lors d'épisodes inflammatoires.

Des molécules anti-oxydantes, telles que la forme réduite du Glutathion (GSH), la SuperOxyde Dismutase (SOD) ou la catalase vont permettre de neutraliser les espèces réactives de l'oxygène produites par certaines cellules inflammatoires ou présentes dans l'air ambiant. De plus, la présence de molécules anti-bactériennes va permettre de lutter dans un premier temps contre les bactéries lors d'infections (Lysozyme, β -défensines,...) (Bals *et al.*, 1999 ; Ganz T., 2002).

Les peptides antimicrobiens sont des peptides multifonctionnels qui exercent un rôle biologique fondamental, via divers mécanismes, dans l'élimination de micro-organismes pathogènes incluant les bactéries Gram + et Gram-, les champignons et les virus. Les gènes codant ces peptides s'expriment dans de nombreuses cellules incluant les phagocytes circulants et les cellules épithéliales constituant les muqueuses. L'expression de leurs gènes est étroitement régulée et peut être induite par des pathogènes et des cytokines exerçant ainsi un rôle dans la défense de l'hôte (Diamond *et al.*, 2009).

4. Mécanismes immunologiques

Les mécanismes immunologiques participant à la défense de la muqueuse pulmonaire sont représentés dans un premier temps par les Immunoglobulines de type A (IgA), les macrophages alvéolaires et les cellules épithéliales (Lusuardi *et al.*, 2002).

Les IgA se fixent dans des régions spécifiques des toxines ou des microorganismes et empêche, par gêne stérique, leur interaction avec des récepteurs de l'épithélium.

Les macrophages alvéolaires sont des cellules immunitaires libres dans les alvéoles. Ces cellules ont la capacité de phagocyter les particules présentes dans les alvéoles et possèdent également un fort pouvoir bactéricide. Les macrophages sont capables d'interagir avec les cellules environnantes et notamment, via la présentation d'antigène, d'avoir un rôle dans l'instauration d'une réponse immunitaire adaptative (Aggarwal *et al.*, 2014).

Les cellules épithéliales n'ont pas seulement un rôle de barrière, mais participent aussi activement aux mécanismes de défense en produisant des composants du mucus, des peptides antimicrobiens, des récepteurs solubles pour les pathogènes ainsi que de nombreux médiateurs de l'inflammation (Nyunoya *et al.*, 2014). De plus, ces cellules auraient également une capacité à présenter les antigènes bien que cela soit largement discuté (Cunningham *et al.*, 1997).

Cette première ligne de défense va très rapidement mobiliser la machinerie du système immunitaire inné et/ou adaptatif via la sécrétion de cytokines et de chimiokines, mécanismes que nous développerons ultérieurement.

D. Les cellules immunitaires

1. Les cellules de l'immunité innée

L'immunité innée consiste en un ensemble de défenses contre les infections activées immédiatement après l'invasion par un organisme pathogène. Le système immunitaire inné comprend des barrières physiques, ainsi que des facteurs chimiques et cellulaires. Les principales barrières physiques sont la peau et la membrane des muqueuses. Les facteurs chimiques incluent l'acidité des composants de l'estomac et les molécules spécialisées à activité antimicrobienne. La composante cellulaire de la défense innée comprend des cellules ayant des récepteurs capables de reconnaître des produits microbiens et de déclencher une réponse contre l'agent pathogène. La réponse immunitaire innée implique typiquement la participation de plusieurs types cellulaires différents. Les acteurs clés sont les neutrophiles, les macrophages, les cellules NK (ou naturellement tueuses) et les cellules dendritiques.

a) Les Macrophages

Le système phagocytaire mononucléé est constitué de monocytes circulant dans le sang et de macrophages présents dans les tissus. Au cours de l'hématopoïèse dans la moelle osseuse, les cellules progénitrices des granulocytes et des monocytes se différencient en promonocytes qui quittent la moelle osseuse et passent dans le sang où ils se différencient plus avant en monocytes matures. Les monocytes circulent pendant 8 heures dans le sang, période pendant laquelle ils grossissent ; ils migrent ensuite vers les tissus où ils se différencient en macrophages spécifiques des tissus (Kindt *et al.*, 2008).

La différenciation d'un monocyte en un macrophage tissulaire implique de nombreux changements : la cellule grossit cinq à dix fois ; ses organites intracellulaires augmentent en nombre et en complexité ; elle acquiert une plus grande capacité phagocytaire, produit des taux plus élevés d'enzymes hydrolytiques et commence à sécréter toute une série de facteurs solubles.

La principale caractéristique des macrophages est leur capacité d'ingérer et de digérer des antigènes exogènes, tels que les micro-organismes entiers ou des particules insolubles, ainsi que des produits endogènes, tels que des cellules hôtes lésées ou mortes, des débris cellulaires... L'internalisation de ces molécules conduit à la formation de phagosomes dans le macrophage. Un phagosome fusionne ensuite avec un lysosome afin de former un phagolysosome dans lequel le lysozyme et d'autres enzymes hydrolytiques vont digérer le matériel ingéré (Bronietzki *et al.*, 2014). Bien que la plus grande partie de l'antigène digéré par les macrophages soit dégradée et éliminée, l'antigène digéré peut également intégrer la voie d'apprêtement endocytaire et s'associer à des molécules de classe II du CMH. L'antigène est alors présenté à la surface cellulaire du macrophage et permettra l'activation des cellules T auxiliaires et donc du système immunitaire adaptatif. Le processus de phagocytose est présenté dans la figure 4 (Kindt *et al.*, 2008).

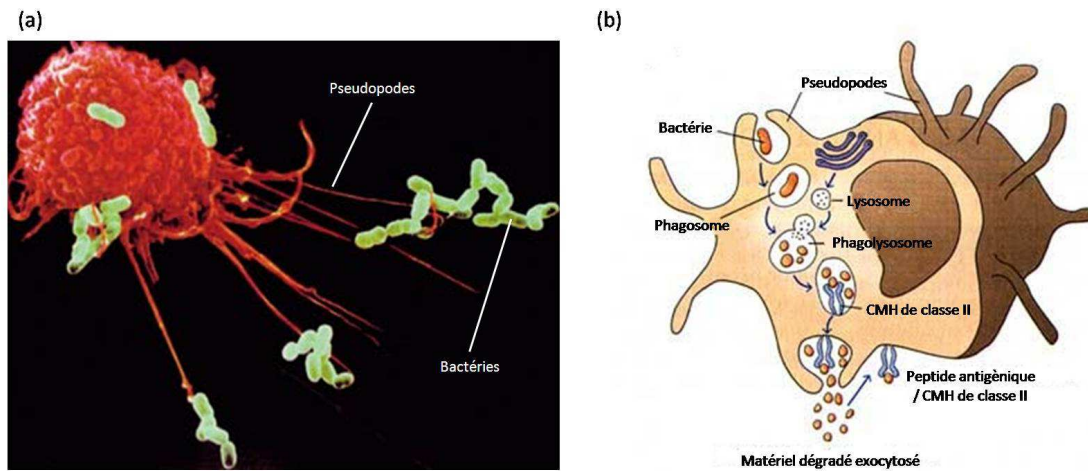


Figure 4 : La phagocytose par les macrophages

Les macrophages peuvent ingérer et dégrader des antigènes particuliers, y compris les bactéries (a) Micrographie électronique à balayage d'un macrophage (b) Phagocytose et apprêtement d'un antigène exogène par les macrophages. La plupart des produits résultant de la digestion de matériel ingéré sont exocytés, mais certains peptides peuvent entrer en interaction avec des molécules de CMH de classe II, pour former des complexes qui se déplacent vers la surface de la cellule où ils sont présentés aux lymphocytes T auxiliaires (D'après Kindt *et al.*, 2008).

Les macrophages sont dispersés dans tout l'organisme. Certains élisent résidence dans des tissus particuliers, où ils deviennent des macrophages résidents, tandis que d'autres restent mobiles et sont appelés macrophages libres. Des cellules semblables aux macrophages assument diverses fonctions dans différents tissus et sont dénommées en fonction de leur localisation tissulaire. Une adaptation dirigée par des facteurs dérivés des tissus et par l'environnement physiologique vont permettre aux macrophages tissulaires d'acquérir les caractéristiques spécifiques au tissu dans lequel ils élisent résidence (Smythies *et al.*, 2005). Dans le tissu pulmonaire, ce sont les macrophages alvéolaires qui seront retrouvés.

Les macrophages alvéolaires sont considérés comme les gardiens de l'interface hémato-alvéolaire, servant de front de défense cellulaire contre les pathogènes respiratoires. Les macrophages alvéolaires sont les premiers phagocytes du système immunitaire inné, nettoyant les espaces aériens des particules infectieuses, toxiques ou allergiques qui auraient évité les défenses mécaniques du tractus respiratoire (Sibille *et al.*, 1990).

Les macrophages alvéolaires devant s'adapter à l'environnement de la lumière alvéolaire ou bronchique, sont distincts des macrophages qui résident dans l'épithélium respiratoire et dans les vaisseaux sanguins, ce qui implique qu'une spécialisation des populations des macrophages plus importante encore ait lieu dans les espaces alvéolaires. Les macrophages alvéolaires résident dans un compartiment fortement exposé à des fluctuations environnementales marquées par exemple, par la pression partielle en oxygène (Worlitzsch *et al.*, 2002), le microbiote pulmonaire qui peut être variable (Goulding *et al.*, 2011), le mucus présent à la surface de la muqueuse et un nombre considérable de cellules épithéliales qui modulent l'activité des macrophages alvéolaires au travers de mécanismes directs (Snelgrove *et al.*, 2008) et indirects (Bonfield *et al.*, 1995).

Le phénotype et la fonction des macrophages est dépendant du microenvironnement l'entourant (en particulier par les cytokines) et les macrophages ont été classés en différents phénotypes polarisés M1 ou M2 associés avec, respectivement, l'inflammation et le remodelage tissulaire (Gordon S. 2003). La polarisation « M1 » également appelée « activation classique » est induite par des signaux générés au cours d'une réponse Th1 (comme l'IFN- γ) ou par l'exposition à des composants pathogènes comme le LPS. Cette polarisation est caractérisée par une augmentation de l'expression de gènes en relation avec l'inflammation et l'immunité cellulaire. Au contraire, la polarisation « M2 » ou « activation alternative », induite par des cytokines de type Th2 (IL-4 ou IL-13) ou par des signaux immuno-régulateurs comme l'IL-10 ou les glucocorticoïdes, est marquée par l'induction de l'expression de récepteurs éboueurs (scavenger), de cytokines anti-inflammatoires et de molécules impliquées dans le remodelage tissulaire (Gordon S. 2003). Cependant, il est difficile à ce jour de concilier ce classement avec celui relatif à la localisation tissulaire (alvéolaire/interstitiel).

Les macrophages vont permettre de préserver une fonction pulmonaire normale notamment à travers des fonctions d'initiation et de résolution de l'inflammation pulmonaire. En effet, à travers les différentes polarisations, les macrophages alvéolaires vont pouvoir éliminer les micro-organismes rencontrés dans la lumière du poumon à travers la phagocytose et la destruction intracellulaire de ces derniers via la sécrétion de métabolites oxygénés, du lysozyme, des peptides antimicrobiens et des protéases (Kindt *et al.*, 2008).

Les macrophages alvéolaires fonctionnent également comme régulateurs des défenses innées contre les infections respiratoires en synthétisant et sécrétant un large panel de cytokines (incluant l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF- α), de chimiokines comme le CXCL8 et des métabolites arachidoniques. En utilisant ces signaux de communication intercellulaires, les macrophages alvéolaires initient des réponses inflammatoires et recrutent notamment des neutrophiles activés au sein des espaces alvéolaires (Haslett C. 1999).

b) Les Neutrophiles

Les neutrophiles sont des cellules granulocytaires qui présentent un noyau multilobé et des granules cytoplasmiques qui prennent les colorants acides et basiques (d'où leur nom).

Les neutrophiles sont produits par l'hématopoïèse dans la moelle osseuse. Ils sont libérés dans le sang périphérique et circulent pendant 7 à 10 heures avant de passer dans les tissus où ils ont une durée de vie de quelques jours (Kindt *et al.*, 2008).

En réponse à de très nombreux types d'infection et lors de dommages tissulaires stériles, le nombre de neutrophiles générés par la moelle osseuse augmente très rapidement et ces cellules sont généralement les premières à arriver au niveau du site d'inflammation via un processus d'extravasation au travers de l'endothélium vasculaire (en 6h) (Cohen *et al.*, 2002). De nombreuses substances générées dans la réaction inflammatoire servent de facteurs chimiotactiques qui sont à l'origine de l'accumulation des neutrophiles au niveau d'un site inflammatoire. Parmi ces facteurs chimiotactiques figurent les composants du complément, certains composants du système de la coagulation sanguine et différentes cytokines sécrétées

par les lymphocytes T auxiliaires et les macrophages activés comme montré dans la table 1 (Sadik *et al.*, 2011).

Chimiokines

CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8, CCL3, CCL5, CCL6, CCL7, CCL9 ET CCL12

Peptides / Cytokines

C5a, C3a, peptides formylatés (fMLF), motif Pro-Gly-Pro (PGP), LL37, MIF

Eïcosanoïdes

Leucotriène B4 (LTB4), Facteur Activateur des Plaquettes (PAF)

Table 1 : Principaux chemoattractants des neutrophiles, Adapté de Sadik *et al.*, 2011.

Comme les macrophages, les neutrophiles sont des cellules phagocytaires actives. La phagocytose par les neutrophiles est semblable à celle décrite pour les macrophages, à ceci près que les enzymes lytiques et les substances bactéricides des neutrophiles sont souvent distinctes et contenues dans des granules.

En effet, un neutrophile possède dans son cytoplasme de 50 à 200 granules. On distingue les granules primaires ou précoces, azurophiles (contenant la myéloperoxydase et des agents de la bactéricidie non oxydative comme les défensines, la cathepsine G...), et les granules spécifiques secondaires (contenant la lactoferrine, beaucoup de lysozymes, la phosphatase alcaline, et le cytochrome b 558). Ceux-ci doivent être considérés comme des lysosomes. Dans une troisième catégorie de granules, les neutrophiles stockent de nombreux enzymes lysosomiaux : nucléase, nucléotidase, bêta-glucuronidase, élastase, gélatinase (collagénase) (Greer *et al.*, 2013)...

Les granules primaires et secondaires fusionnent avec les phagosomes dont les contenus sont ensuite digérés et éliminés comme dans les macrophages. Bien que la phagocytose soit l'arme principale des neutrophiles contre les agents infectieux, d'autres mécanismes contribuent à contenir et à éliminer les pathogènes.

Les neutrophiles présentent notamment à leur surface cellulaire des récepteurs de reconnaissance de pathogènes (PRR) dont le TLR2 et le TLR4 (Janke *et al.*, 2009). Deux mécanismes additionnels antimicrobiens, l'attaque oxydative et non oxydative, contribuent à une défense coordonnée et hautement spécifique comprenant plusieurs axes. L'axe oxydatif utilise des radicaux oxygénés (ROS) et des radicaux azotés (RNS) qui seront utilisés comme microbicide dans les phagosomes où ont été internalisés les micro-organismes phagocytés. Certains agents pathogènes ne sont pas tués efficacement par cet assaut oxydatif. L'inclusion de défenses non oxydatives dans l'arsenal des neutrophiles augmente considérablement leurs défenses contre les micro-organismes. Les défenses non oxydatives sont déployées quand les granules des neutrophiles fusionnent avec les phagosomes permettant ainsi l'action de peptides (défensines et cathélicidines) et de protéines antimicrobiens (BPI : protéine d'augmentation de la bactériolyse et de la perméabilité, protéases, lysosymes) (DeFranco *et al.*, 2009).

Plus récemment, il a été décrit que les neutrophiles possèdent une fonction inédite dans le contrôle immunitaire. Ils ont la capacité d'expulser leur propre matériel génétique (leur ADN, appelés NET pour Neutrophiles Extracellular Trap) en direction des agents pathogènes afin de

les neutraliser et de les dégrader plus facilement. Les bactéries sont ainsi engluées et elles ne peuvent plus bouger, leur destruction est alors plus facile (Brinkmann *et al.*, 2004).

Ces cellules ont été retrouvées en grande quantité dans la lumière des voies respiratoires des patients atteints de BPCO et jouent un rôle important dans l'entretien du stress oxydatif présent au sein du poumon (de par la présence de ROS) mais également dans la destruction du parenchyme pulmonaire via la sécrétion des protéases contenues notamment au sein de leurs granules tertiaires (Hoenderdos *et al.*, 2013).

c) *Les Cellules dendritiques*

Les cellules dendritiques ont été un des premiers types de cellules immunitaires découverts en 1868 par Paul Langerhans.

Les cellules dendritiques sont très nombreuses dans tous les tissus en contact avec le milieu extérieur dans lequel elles forment un réseau de cellules sentinelles, notamment au sein des épithéliums muqueux (bouche, œsophage, poumon, vagin, utérus, vessie,...) et dans la peau.

En cas de danger, elles peuvent atteindre rapidement toute zone inflammatoire. Le recrutement des cellules dendritiques est dépendant des chimiokines qui sont produites sur le site inflammatoire par les cellules de la réponse innée ou les cellules de l'épithélium. Les cellules dendritiques immatures expriment un répertoire de récepteurs de chimiokines qui leur permet de répondre à des chimiokines inflammatoires telles que le CCL2 (Robays *et al.*, 2007) et le MIP-3 α (Dieu *et al.*, 1998) ou le CCL20 (Caux *et al.*, 2002). D'autres récepteurs sont exprimés à la surface des cellules dendritiques tels que les signaux de « danger tissulaire » (Visintin *et al.*, 2001).

Il existe plusieurs types de cellules dendritiques composant au moins quatre grandes catégories : les cellules dendritiques de Langerhans, les cellules dendritiques interstitielles, les cellules dendritiques dérivées de monocytes et les cellules dendritiques plasmacytoïdes. Chacune dérive de cellules souches hématopoïétiques selon différents parcours et dans différents sites. Quelle que soit la catégorie, elles expriment toutes les molécules du CMH de classe I et II, ainsi que des molécules de co-stimulation, CD80 et CD86. Les cellules dendritiques expriment aussi la molécule CD40 qui participe à l'activation des lymphocytes T en interagissant avec son ligand (CD40L) présent à la surface des cellules T (Banchereau *et al.*, 2000).

Les cellules dendritiques sont des cellules présentatrices d'antigène professionnelles et à ce titre, sont les seules cellules capables d'éduquer les cellules T naïves (Banchereau J. *et al.*, 1998). Elles sont polyvalentes, en se présentant sous différentes formes et en accomplissant la fonction de capture de l'antigène dans un site et de présentation antigénique dans un autre site. En dehors des ganglions lymphatiques, les formes immatures de ces cellules surveillent l'organisme du moindre signe d'invasion par des pathogènes et capturent les antigènes étrangers. Elles migrent alors vers les ganglions lymphatiques où elles présentent l'antigène aux cellules T. Lorsque les cellules dendritiques ont capturé l'antigène, elles entrent dans un processus de maturation au cours de laquelle, elles réduisent leur capacité de phagocytose mais augmentent leur expression de molécules de CMH de classe II, abandonnent les tissus périphériques et migrent vers les organes lymphoïdes où les cellules T résident.

Après l'engagement du TCR des cellules T, les molécules de co-stimulation sont nécessaires à la prolifération et à la différenciation des cellules T naïves (Banchereau *et al.*, 2000). Puis les cellules dendritiques sécrètent des facteurs solubles qui orientent la réponse vers un profil Th1, Th2, Treg ou Th17.

Dans le poumon, les cellules dendritiques sont retrouvées dans la couche épithéliale, au contact de la lame basale d'où elles envoient des pseudopodes dans la lumière des voies aériennes leur permettant de capturer les allergènes et autres composants dans la lumière. Le recrutement rapide de cellules dendritiques dans la muqueuse respiratoire lors d'une stimulation (infectieuse ou antigénique), suggère que le rôle premier des cellules dendritiques pulmonaires serait de faire le lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative dans les mécanismes de défense de l'hôte. Cependant, les cellules dendritiques recrutées en condition inflammatoire ont un phénotype différent des cellules résidentes et vont orienter de manière différente la réponse immune (De Heer *et al.*, 2005).

d) Les Cellules NK

Les cellules NK ou lymphocytes tueurs naturels sont des cellules de l'immunité innée d'origine lymphoïde et dérivées de la moelle osseuse.

Ces cellules présentent une activité cytotoxique contre une large panoplie de cellules tumorales et contre des cellules infectées avec certains virus.

Les cellules NK sont capables de lyser des cellules étrangères à l'organisme de manière indépendante de l'antigène et sans activation préalable contrairement aux lymphocytes T et B.

Par leur fonction de lyse, on peut les rapprocher des lymphocytes T CD8+, mais la reconnaissance de la cible est différente. En effet, les cellules NK sont spontanément lytiques pour de nombreux types cellulaires identifiés grâce aux récepteurs naturels de cytotoxicité ou NCR NKp30, NKp44 et Nkp46 (récepteurs de type immunoglobuline) et NKG2D (un membre de la famille des lectines de type C). Des mécanismes de régulation impliquant les récepteurs KIR inhibiteurs empêchent les cellules NK d'attaquer les cellules saines (Lanier LL., 2005).

Les cellules NK présentent dans leur cytoplasme de nombreux granules contenant de la perforine et des granzymes libérés lorsque les cellules NK adhèrent à leurs cellules cible conduisant à la destruction de ces dernières (Clark *et al.*, 2003).

Dans le poumon, les cellules NK sont fortement recrutées en cas d'inflammation et sont capables d'interagir avec les cellules dendritiques et les macrophages alvéolaires en modulant leur fonction ou en induisant leur mort cellulaire. De plus, les cellules NK produisent un grand nombre de cytokines immunologiquement importantes qui peuvent avoir des rôles considérables dans la régulation de l'immunité (Ennis *et al.*, 1981).


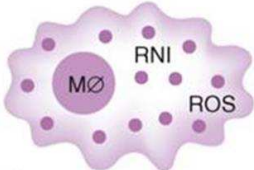
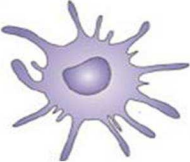
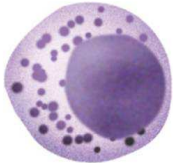
<u>Type Cellulaire</u>		<u>Fonctions</u>
Neutrophile		<ul style="list-style-type: none"> - Phagocytose - Production de radicaux oxygénés et azotés - Production de peptides antimicrobiens
Macrophage		<ul style="list-style-type: none"> - Phagocytose - Production de médiateurs de l'inflammation - Présentation antigénique - Production de radicaux oxygénés et azotés - Production de cytokines
Cellule Dendritique		<ul style="list-style-type: none"> - Présentation antigénique - Signaux de co-stimulation - Production de radicaux oxygénés et azotés - Production d'Interféron - Production de cytokines
Cellule NK		<ul style="list-style-type: none"> - Lyse des cellules infectées par un virus - Production d'Interféron - Activation des macrophages

Table 2 : Principales cellules de l'immunité innée et leurs fonctions (Adapté de Kindt *et al.*, 2008)

2. A l'interface du système inné et adaptatif : Les Cellules NKT

Les cellules NKT sont une sous-population de lymphocytes T qui partagent des marqueurs de surface et des caractéristiques fonctionnelles avec, à la fois, des lymphocytes T conventionnels en exprimant un récepteur T invariant (TCR V α 24) et des cellules NK (Godfrey *et al.*, 2004). Ces cellules se trouvent à l'interface du système immunitaire inné et adaptatif, de par la rapidité de leur réponse (quelques heures) et la reconnaissance d'un nombre restreint d'antigènes.

A la différence des lymphocytes T qui reconnaissent des antigènes peptidiques présentés par des molécules du CMH de classe I ou II, les cellules NKT sont restreintes à la reconnaissance d'antigènes glycolipidiques présentés par le CD1d, une molécule atypique du CMH de classe I. Les cellules NKT peuvent être classées en trois groupes en fonction de la nature de leur TCR et de leur dépendance au CD1d. Les cellules NKT de type I (les plus importantes et les plus étudiées) ou invariantes (iNKT) présentent un TCR invariant et sont strictement restreintes au CD1d, les cellules NKT de type II ou NKT variants sont également dépendants du CD1d mais vont présenter un TCR variant et enfin les cellules NKT-like qui regroupent plusieurs populations de cellules qui sont indépendantes du CD1d (Godfrey *et al.*, 2010).

a) Les cellules iNKT

Les cellules iNKT sont actuellement les cellules les plus étudiées et les mieux caractérisées de cette catégorie cellulaire. Les cellules iNKT présentent un TCR invariant caractérisé par une

recombinaison systématique entre les fragments V α 14/24 (V α 14 chez la souris et V α 24 chez l'homme) et J α 18 de la chaîne α du TCR. Ces cellules sont dépendantes de la molécule CD1d lors de la présentation de l'antigène. Le premier antigène reconnu par ces cellules est particulier, il s'agit d'antigène glycolipidique tel que l' α -galactoside céramide (α -GalCer), un constituant d'une éponge marine appartenant à la famille des glycosphingolipides (Mallevaey *et al.*, 2012).

Divers antigènes glycolipidiques capables de conduire à l'activation des cellules iNKT ont été identifiés. Ces antigènes ont des origines variées et peuvent être exogènes, tels les antigènes dérivés de microbes, endogènes, tel l'isoglobotrihexosylceramide (iGb3), des composants de cellules apoptotiques ou des glycolipides dérivés de tumeur. Les cellules iNKT sont capables de reconnaître des composants issus de l'apoptose cellulaire. Les cellules iNKT peuvent également être activées de manière indirecte via l'action de cytokines telles que l'IL-12, l'IL-13, l'IL-18, l'IL-23 et/ou les interférons de type I (Godfrey *et al.*, 2010).

Les cellules iNKT répondent très rapidement et de manière robuste à divers stimuli dans différents contextes ce qui leur a valu le nom de « couteau suisse » du système immunitaire. Elles sont capables de produire un large panel de cytokines et de chimiokines, mais également d'entraîner la lyse d'autres cellules. De plus, ces cellules sont capables de moduler le comportement de nombreux autres types cellulaires (Matsuda *et al.*, 2008).

Les cellules iNKT produisent, après activation, de l'IFN- γ et de l'IL-4 mais également de l'IL-2, de l'IL-5, de l'IL-6, de l'IL-10, de l'IL-13, de l'IL-17, de l'IL-21, de l'IL-22, du TNF- α , du TGF- β et du GM-CSF.

Les cytokines produites par les cellules iNKT activent de nombreux autres types cellulaires incluant les cellules NK, les lymphocytes T CD4+ et CD8+ conventionnels, les macrophages, les cellules B et induisent le recrutement des cellules dendritiques. Les cellules iNKT peuvent aussi moduler le recrutement des neutrophiles (Kronenberg *et al.*, 2002 ; Nakamatsu *et al.*, 2007).

Les cellules iNKT modulent également, de manière quantitative et qualitative, les fonctions des lymphocytes T régulateurs (La Cava *et al.*, 2006). Les iNKT peuvent agir en synergie avec des cellules T $\gamma\delta$ dans certains contextes.

De plus, les cellules iNKT expriment de forts niveaux de perforine, de granzyme et de FasL, concordant avec leur activité cytolytique (Matsuda *et al.*, 2008).

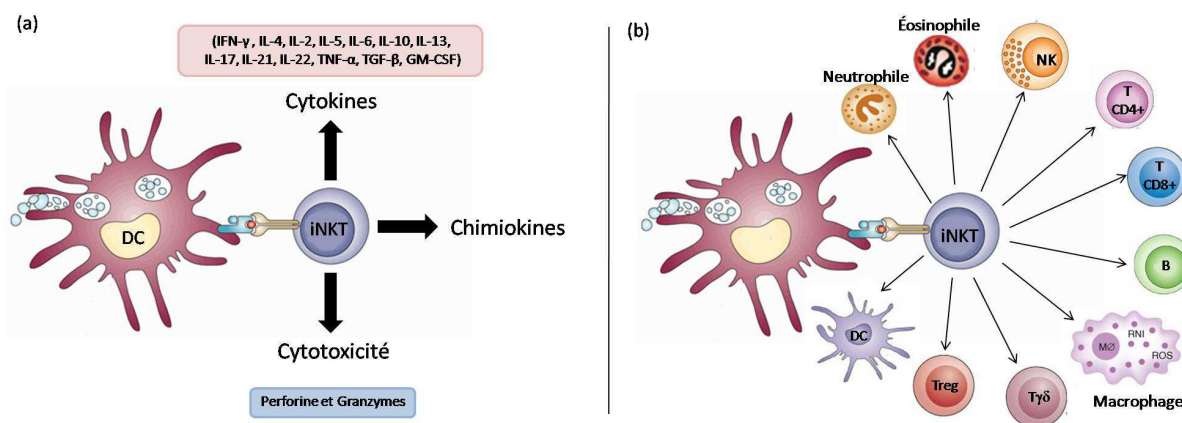


Figure 5 : Les cellules iNKT, « couteau suisse » du système immunitaire.

(a) Les cellules iNKT restreintes au CD1d exercent une activité de destruction et libèrent rapidement un large panel de cytokines et chimiokines qui (b) influencent de nombreuses autres cellules du système immunitaire inné et adaptatif. Adapté de Matsuda *et al*, 2008.

Les cellules iNKT sont distribuées ubiquitairement dans l'organisme. Elles sont majoritairement localisées dans le foie où elles représentent 10 à 30% des cellules T. Dans les autres organes comme la rate, le thymus ou encore les poumons, leur proportion est plus faible, de l'ordre de 1%.

b) Les cellules NKT de type II

Les cellules NKT de type II ou NKT variants sont des NKT dépendants du CD1d mais présentant un TCR variable. Ces cellules ne reconnaissent pas l' α -galactosylcéramide. Cependant, les cellules NKT de type II sont encore mal caractérisées de par la difficulté à les identifier.

c) Les cellules NKT like.

Les cellules incluses dans la catégorie NKT like sont indépendantes du CD1d et ne sont pas réactives à l' α -galactosylcéramide. Par contre, elles vont exprimer le marqueur NK1.1 (chez la souris) caractéristique des cellules NK. Cette classe est assez hétérogène et peut inclure des lymphocytes T exprimant NK1.1 ou encore des cellules MAIT (mucosal-associated invariant T).

3. Les cellules de l'immunité adaptative

L'immunité adaptative est capable de reconnaître et d'éliminer sélectivement des composants ou des micro-organismes étrangers. Contrairement aux réponses immunitaires innées, les réponses immunitaires adaptatives s'exercent contre des épitopes spécifiques qui présentent quatre caractéristiques : la distinction du Soi et du Non-Soi, la spécificité antigénique, la diversité et la mémoire immunitaire. La spécificité antigénique du système immunitaire lui permet de distinguer de subtiles différences parmi les antigènes. Le système immunitaire est capable de créer une énorme diversité dans ses molécules de reconnaissance, ce qui lui permet de reconnaître des milliards de structures différentes sur des antigènes. Une fois que le système immunitaire a reconnu un antigène et a répondu à ce dernier, il présente une mémoire immunitaire, c'est-à-dire qu'une seconde rencontre avec le même antigène va induire une seconde réponse beaucoup plus rapide. En raison de cette propriété, le système immunitaire peut conférer une immunité pouvant durer toute la vie. Enfin, le système immunitaire ne répond normalement qu'aux antigènes étrangers ou du « Non Soi ». La capacité du système

immunitaire à distinguer le « Soi » du « Non-Soi » et à ne répondre qu'aux molécules du « Non-Soi » est essentielle car une réponse inappropriée aux molécules du « Soi » peut être à l'origine de pathologies graves telles que les maladies auto-immunes.

Les cellules du système immunitaire adaptatif sont les lymphocytes, dont les deux principaux types sont les lymphocytes T et les lymphocytes B. Ces lymphocytes existent au moins dans trois stades d'activation : les lymphocytes naïfs ou quiescents (inactifs), les lymphocytes effecteurs (activés spécifiquement et polarisés) et les lymphocytes mémoires (préalablement activés et dans l'attente d'une nouvelle rencontre avec l'antigène).

a) Les lymphocytes T

Les lymphocytes T Cytotoxiques ou CD8+ vont être capables d'induire l'apoptose d'autres cellules. Ces cellules sont activées lors d'une interaction du TCR avec des molécules présentées par les cellules cibles via un CMH de classe I. Une fois activés, ces lymphocytes vont proliférer et relarguer des perforines et des granzymes afin d'induire la mort par apoptose des cellules cibles. Lorsque l'action de ces lymphocytes est terminée, ces derniers meurent par apoptose et sont dégradés par les phagocytes mais certains d'entre eux deviennent des lymphocytes T cytotoxiques mémoires (Kindt *et al.*, 2008).

Les lymphocytes T auxiliaires ou CD4+ jouent un rôle important dans l'établissement et le maintien de la réponse immunitaire adaptative. Lorsque ces cellules reconnaissent l'antigène spécifique via la présentation de ce dernier par le CMH de classe II présent à la surface des cellules du système inné, les lymphocytes T auxiliaires relarguent des cytokines qui influencent l'activité de nombreux types cellulaires et vont ainsi orchestrer la réponse immunitaire. Il existe différentes sous-populations de lymphocytes T auxiliaires qui se différencient en fonction notamment de l'environnement cytokinique au moment de l'activation. Chaque sous-population exerce une fonction bien définie, on peut distinguer entre autres les lymphocytes Th1 (producteurs d'IFN- γ , impliqués dans la réponse antivirale et antibactérienne), Th2 (producteurs d'IL-4, impliqués dans la réponse aux parasites extracellulaires et dans l'allergie), Th17 (producteurs d'IL-17, impliqués dans l'inflammation, l'auto-immunité et l'immunité anti-infectieuse) et les lymphocytes T régulateurs qui jouent un rôle essentiel dans la régulation des réponses immunitaires (Alberts *et al.*, 2002).

b) Les lymphocytes B

Les lymphocytes B, ou cellules B, présentent un récepteur spécifique appelé BCR qui va interagir directement avec l'antigène sans la nécessité d'une cellule présentatrice d'antigène. Lorsqu'ils sont activés, les plasmocytes secrètent des anticorps qui se chargent de la neutralisation des antigènes en se liant à ceux-ci afin qu'ils deviennent des proies plus faciles et identifiées pour les phagocytes. Tout comme les lymphocytes T, les lymphocytes B sont présents sous différentes formes : les cellules B naïves (inactives), les plasmocytes (activés, producteurs d'anticorps pour neutraliser les antigènes) et les cellules B à mémoire (préalablement activées et dans l'attente d'une nouvelle rencontre avec l'antigène) (Alberts *et al.*, 2002).

E. Un autre système de muqueuse : l'intestin

Tout comme la muqueuse respiratoire, la muqueuse intestinale présente une grande surface d'échange représentant entre 200 et 300m² qui permet la digestion et l'absorption des nutriments. La barrière intestinale joue donc un rôle primordial dans la protection contre l'entrée dans l'organisme de micro-organismes, d'antigènes et de toxines depuis la lumière intestinale. Bien que comportant certaines spécificités, il existe certaines communautés de structure entre les muqueuses digestives et respiratoires et un possible dialogue entre ces deux organes a récemment été évoqué.

1. La structure de la muqueuse intestinale

Bien que la structure de la muqueuse varie en fonction des différents segments du tractus gastro-intestinal, elle est principalement constituée de trois couches successives :

- La paroi musculaire constituée de deux couches de muscles lisses,
- La lamina propria qui est un tissu conjonctif fin et réticulé riche en capillaires sanguins et lymphatiques ainsi qu'en cellules immunitaires et,
- L'épithélium constitué d'une seule couche de cellules épithéliales entre lesquelles s'intercalent des cellules épithéliales spécialisées telles que les cellules caliciformes à mucus, les cellules endocrines et les cellules de Paneth. Cet épithélium exerce des fonctions majeures dont celle de barrière (grâce à la présence de jonctions serrées et de jonctions adhérentes entre les cellules), dans l'absorption des nutriments (intestin grêle), de l'eau et des électrolytes (côlon) ainsi qu'un rôle immunitaire.

La muqueuse intestinale n'est pas lisse, elle est constituée de villosités et de cryptes qui vont lui conférer un aspect de vague (McDermott *et al.*, 2014).

Les villosités vont représenter le compartiment différencié et fonctionnel de la muqueuse. Ces villosités sont orientées vers la lumière intestinale et sont formées par un épithélium comportant quatre types cellulaires :

- les entérocytes (environ 80% des cellules de l'épithélium) présentant des microvillosités à leur pôle apical qui facilitent l'absorption des nutriments, de l'eau et des électrolytes,
- les cellules caliciformes (ou Goblet cells) sécrétant du mucus en grande quantité (jusqu'à 3L/jour) qui permet de protéger l'épithélium de diverses agressions (enzymes, infections, pH,...),
- les cellules entéro-endocrine sécrétant des neuro-médiateurs,
- les cellules M (pour Microfold), cellules épithéliales distinctes des entérocytes situées exclusivement au niveau de l'épithélium associé aux follicules qui surplombe le tissu lymphoïde associé aux muqueuses. Elles tiennent leur nom de l'aspect que présente leur pôle apical. En effet contrairement aux entérocytes qui présentent des microvillosités, les cellules M ont un pôle apical plissé. Ces cellules sont structurellement et fonctionnellement spécialisées dans le transport trans-épithélial permettant ainsi le transfert d'antigènes depuis la lumière intestinale jusqu'aux cellules immunitaires appartenant à la muqueuse. Les cellules M sont polarisées (avec un pôle apical et un

pôle basolatéral) et forment des jonctions serrées avec les cellules adjacentes. Les cellules M sont caractérisées par la présence d'un sous-domaine particulier au niveau du pôle baso-latéral qui amplifie la surface cellulaire et permet la formation d'une poche où les lymphocytes intra-épithéliaux pourront se fixer. Cette caractéristique des cellules M permet de raccourcir la distance à parcourir pour les vésicules trans-épithéliales avant d'atteindre le pôle basolatéral et la présentation des antigènes capturés au système immunitaire sous jacent (Kraehenbuhl *et al.*, 2000).

Les cryptes (ou glandes de Lieberkühn) sont invaginées dans la paroi musculaire et comportent également différents types cellulaires :

- les entérocytes et les cellules caliciformes, qui sont plus petites que celles trouvées dans les villosités,
- les cellules dites de transit sont des cellules immatures possédant toujours la capacité de se différencier et se trouvant plutôt dans le fond des cryptes,
- les cellules entéro-endocrine, plus nombreuses dans les cryptes que dans les villosités vont sécréter des neuromédiateurs,
- les cellules de Paneth, situées au fond des cryptes, sont des cellules sécrétrices à activité antimicrobienne. Elles déversent leur produit de sécrétion dans la lumière des cryptes et participent à la défense de l'épithélium,
- Les cellules souches trouvées dans le fond de la crypte permettant un renouvellement rapide de l'épithélium (en 4 à 5 jours).

Les plaques de Peyer n'appartiennent ni aux villosités, ni aux cryptes. Il s'agit d'agrégats de 5 à 200 follicules lymphoïdes (que l'on peut également retrouver isolés) situés à intervalles réguliers et trouvés principalement dans la partie terminale de l'iléon (Cornes JS., 1965). Le tissu lymphoïde composant les plaques de Peyer est séparé de la lumière intestinale par l'« épithélium associé aux follicules » composé de cellules épithéliales, de cellules M, de lymphocytes intra-épithéliaux et de quelques cellules productrices de mucus. Sous cet épithélium spécifique, se trouve le dôme sous-épithélial contenant des cellules dendritiques et des macrophages. Dans les zones situées entre les follicules constituant les plaques de Peyer, sont retrouvés des lymphocytes T, principalement auxiliaires, des cellules dendritiques matures et des macrophages. Les plaques de Peyer contiennent de nombreux follicules composés de lymphocytes B précurseurs des plasmocytes qui produiront des IgA (Ramiro-Puig *et al.* 2008). De par la capacité de transport trans-épithélial d'antigènes par les cellules M qui sont nombreuses à ce niveau, les plaques de Peyer vont constituer un des sites d'induction de la réponse immunitaire muco-sale. Les antigènes capturés par les cellules M seront transférés aux cellules dendritiques qui pourront à leur tour les présenter aux lymphocytes T (Neutra *et al.*, 2001). Cependant, tout comme dans la muqueuse pulmonaire, les cellules dendritiques sont également capables de projeter des pseudopodes entre les cellules épithéliales ou à travers les cellules M de manière à sonder directement la lumière intestinale (Rescigno *et al.*, 2001 ; Lelouard *et al.*, 2011). Cette collaboration unique entre le système immunitaire et l'épithélium permet, dès la détection d'antigènes, leur endocytose, leur traitement et leur présentation afin

de déclencher des réponses immunitaires primaires ou mémoires localisées, sans impliquer de réponse systémique (Ramiro-Puig *et al.*, 2008).

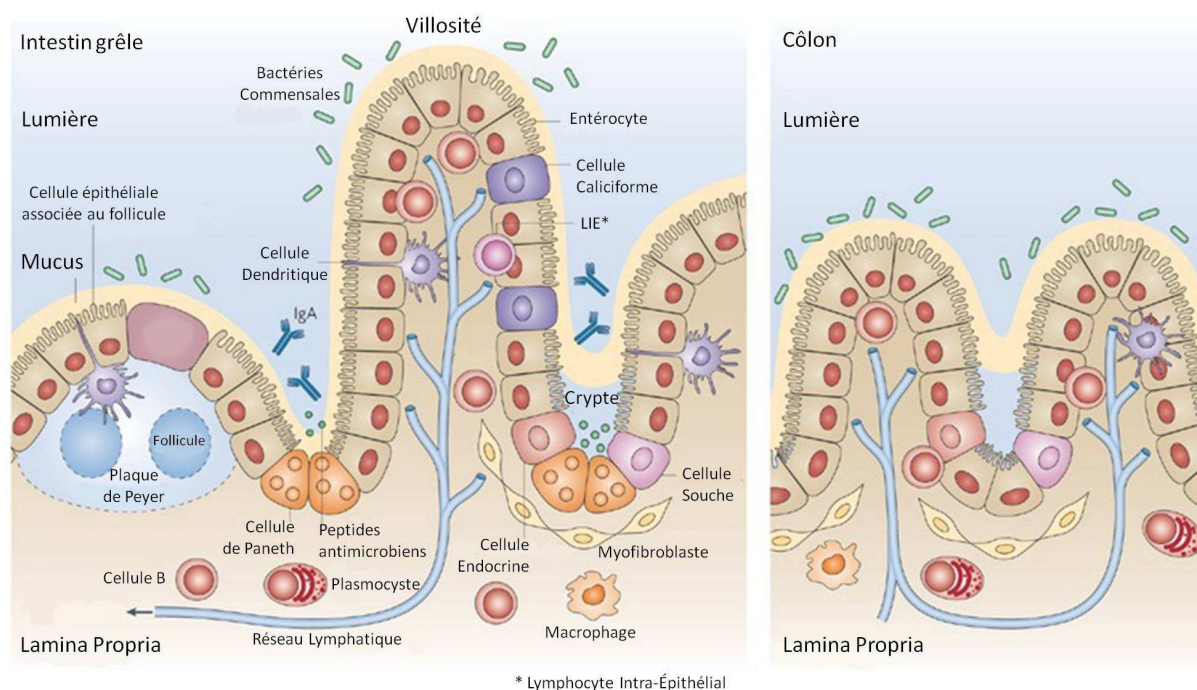


Figure 6 : Anatomie de la muqueuse intestinale.

Une couche unique de cellules épithéliales intestinales fournit une barrière physique qui sépare les bactéries commensales, présentes dans la lumière intestinale, de la *lamina propria* sous-jacente. Les cellules épithéliales sont baignées dans les nutriments, les bactéries commensales, les IgA et les cellules caliciformes qui sécrètent le mucus. Les cellules souches épithéliales donnent naissance à des cellules filles capables de proliférer et de se différencier en entérocytes des villosités qui absorbent les nutriments (intestine grêle) ou l'eau (Côlon). De plus, les cellules épithéliales progénitrices se différencient en cellules entéro-endocrines et en cellules de Paneth à la base des cryptes intestinales. Sous l'épithélium, la *lamina propria* est constituée de cellules stromales (les myofibroblastes), de cellules B (spécifiquement des plasmocystes produisant des IgA), de lymphocytes T, de macrophages et de cellules dendritiques. Certaines sous-populations de cellules dendritiques et de lymphocytes T sont localisées entre les cellules épithéliales. L'intestin grêle possède des régions d'épithélium spécialisées appelées "épithélium associé aux follicules" et de cellules M qui surplombent les plaques de Peyer et sondent la lumière intestinale. Adapté de Abreu *et al.*, 2010.

2. Système de défense de la muqueuse intestinale

Tout comme la muqueuse pulmonaire, la muqueuse intestinale possède plusieurs mécanismes de défense contre les agressions :

- **Une défense mécanique.** Les mouvements péristaltiques intestinaux empêchent la rétention et la prolifération des bactéries dans l'intestin, limitant ainsi les phénomènes d'infection et d'inflammation,
- **Une défense épithéliale,** composée des cellules épithéliales liées entre elles par des jonctions serrées et adhérentes qui représentent une véritable barrière physique. De plus, le mucus est composé de deux couches, une externe contenant les bactéries et une interne riche en peptides antimicrobiens (considérée comme relativement stérile) (Kim *et al.*, 2010). Les peptides et molécules antimicrobiens sont notamment produits par les entérocytes (β -défensines), les cellules de Paneth (α -défensines, lysozyme,

phospholipase A2) et par les cellules M retrouvées dans les plaques de Peyer et capables d'internaliser par transcytose des antigènes afin de les présenter au système immunitaire sous jacent,

- **Une défense immunitaire** due aux cellules immunitaires présentes dans la *lamina propria* de la muqueuse. Le fonctionnement de cette défense sera abordée dans la partie « microbiome et système immunitaire » (V.B. page 68),
- **Une défense écologique** représentée par le microbiome très riche de l'intestin et situé principalement dans la couche externe du mucus. Par un phénomène de compétition, les bactéries commensales et/ou probiotiques défendent la muqueuse contre l'invasion de pathogènes. Ce microbiote intervient également dans la digestion / absorption des nutriments et dans la production de molécules présentant un rôle métabolique et immuno-régulateur bénéfique (McDermott *et al.*, 2014).

F. Altération des mécanismes de défense des muqueuses

Les mécanismes de défense des muqueuses entraînent systématiquement un remodelage tissulaire plus ou moins important selon la nature de l'agression et l'importance de l'inflammation qui précède. En condition physiologique, ce remodelage permet de restaurer l'intégrité fonctionnelle de la muqueuse respiratoire ou digestive. Cependant, en particulier lors d'expositions répétées à des agressions, ce remodelage peut conduire à une reconstruction anarchique ou inadaptée des tissus pouvant devenir irréversibles. Ces lésions faisant suite à un remodelage inapproprié sont souvent associées à une altération des mécanismes de défense conduisant au développement de pathologies extrêmement handicapantes.

Par exemple, dans le cas de l'exposition répétée à la fumée de cigarette, il est observé dans le poumon, un remodelage bronchique (entraînant une métaplasie épithéliale et un épaississement des parois bronchiques) ainsi qu'une destruction alvéolaire (emphysème) associé une atteinte fonctionnelle respiratoire. De plus, la clairance muco-ciliaire va se trouver diminuée dans ce contexte ainsi que la perméabilité épithéliale. Une hypersécrétion de mucus avec modification de sa visco-élasticité pourra également être observée (Barnes PJ., 2000).

Une inflammation importante est également observée au niveau bronchique mais également alvéolaire qui entraîne notamment un recrutement de cellules inflammatoires au sein du poumon. De plus, les macrophages alvéolaires présentent, à terme, un défaut de leur capacité de phagocytose ce qui accroît le risque d'infection pulmonaire.

L'exposition chronique à la fumée de cigarette est la cause majeure de la Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive, pathologie présentant tous les défauts du système de défense pulmonaire cités précédemment.

II. La Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO)

La Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive est une maladie inflammatoire chronique du poumon se traduisant par une obstruction progressive des bronches, partiellement ou non réversible, incluant bronchite chronique et emphysème. Elle constitue aujourd'hui un important problème de santé publique, à la fois d'un point de vue sociétal, médical et économique.

A. Définition de la BPCO

Selon le GOLD (pour Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease ; comité regroupant le « National Heart, Lung, and Blood Institute », le « National Institute of Health », et l'« Organisation Mondiale de la Santé »), la BPCO est une maladie caractérisée par une limitation des débits aériens partiellement ou non réversible, d'apparition progressive, et associée à une réponse inflammatoire anormale des poumons à des substances nocives gazeuses ou particulaires.

La limitation des débits aériens est caractérisée par une inflammation chronique des petites voies aériennes conduisant à l'obstruction de la lumière bronchique et, à terme, à la destruction du parenchyme pulmonaire menant à l'emphysème (élargissement anormal et permanent des espaces aériens au-delà des bronchioles terminales, associé à une destruction des parois alvéolaires).

Afin de préciser la sévérité du trouble ventilatoire obstructif chez le patient atteint de BPCO, une classification a été mise en place par le GOLD. Cette classification s'appuie sur les valeurs obtenues au cours des épreuves fonctionnelles respiratoires. Le premier paramètre analysé est le VEMS (Volume Expiré Maximal en 1 Seconde) et correspond au volume d'air expiré pendant la première seconde d'une expiration dite « forcée », suite à une inspiration profonde. Le second paramètre pris en compte est la CVF (Capacité Vitale expiratoire Forcée) qui correspond au volume de gaz d'une « expiration forcée », faite après une inspiration forcée. Le rapport VEMS / CVF permet alors d'identifier le stade de la maladie chez le patient BPCO (Table1).

STADE	CARACTÉRISTIQUES
0: à risque	Données spirométriques normales Symptômes chroniques: toux, expectoration
I: BPCO légère	VEMS/CVF <70% VEMS>80% de la théorique Avec ou sans les symptômes chroniques (toux, expectoration)
II: BPCO modérée	VEMS/CVF <70% 30% <VEMS<80% - IA 50%<VEMS<80% - IIB 30%<VEMS<50% Avec ou sans les symptômes chroniques (toux, expectoration, dyspnée)
III: BPCO sévère	VEMS/CVF <70% VEMS<30% de la théorique ou VEMS<50% de la théorique avec une insuffisance respiratoire ou des signes cliniques d'insuffisance cardiaque droite

Table 3 : Classification des stades de BPCO selon le GOLD avant 2011.

Depuis 2011, de nouvelles recommandations GOLD ont été définies et celles-ci changent radicalement les critères habituels de classification des patients. En effet, ces dernières ne se basent plus uniquement sur le VEMS mais intègrent également plusieurs critères dont :

- le nombre d'exacerbations. L'exacerbation est une poussée d'aggravation des symptômes habituels de la BPCO : augmentation de la toux, du volume des crachats quotidiens, modification de l'aspect des crachats, augmentation de l'essoufflement, s'installant en quelques heures. Les exacerbations caractérisent l'évolution naturelle de la BPCO. Elles sont déclenchées par une infection dans près d'un tiers des cas. Elles peuvent également être dues à une exposition à des irritants environnementaux (tabac, pics de pollution atmosphérique) et dans 1/3 des cas, aucune cause n'est retrouvée à l'origine du déclenchement de l'exacerbation. La répétition des exacerbations aggrave le pronostic de la maladie.
- Les critères cliniques par l'échelle de dyspnée MRC (>2). La dyspnée correspond à la perception anormale et désagréable de la respiration. Il s'agit d'une gêne respiratoire subjective dont se plaint le patient (souffle court, essoufflement, oppression, soif d'air...). L'échelle du MRC évalue les effets de la dyspnée sur les activités quotidiennes. Elle est notamment basée sur les difficultés à marcher ou à monter les escaliers. L'échelle MRC est bien corrélée à la distance parcourue au test de marche de 6 minutes et est très utilisée dans le suivi des pathologies respiratoires (voir tableau page suivante).

Stade 0	Dyspnée pour des efforts soutenus (exemple : montée de 2 étages)
Stade 1	Dyspnée lors de la marche rapide ou en pente
Stade 2	Dyspnée à la marche sur terrain plat en suivant quelqu'un de son âge
Stade 3	Dyspnée obligeant à s'arrêter pour reprendre son souffle après quelques minutes ou une centaine de mètres sur terrain plat
Stade 4	Dyspnée au moindre effort

Table 4 : Échelle de dyspnée du Medical Research Council (MRC).

- L'évaluation de la qualité de vie par le CAT (*Copd Assessment Test*) (>10). Il s'agit d'un questionnaire simple et court, que tout patient lettré peut compléter de manière indépendante dans un temps très limité. Pour compléter le CAT, le patient doit s'évaluer sur une échelle à six niveaux pour huit éléments distincts.

La combinaison de ces facteurs aboutit à la création de quatre groupes (A, B, C, D) définis dans la table 5.

Groupe	Stade GOLD Spirométrique	Nombre d'exacerbations / an	Score MRC	Score CAT
A Risque bas moins de symptômes	1 ou 2	0 à 1	0 à 1	< 10
B Risque bas davantage de symptômes	1 ou 2	0 à 1	≥ 2	≥ 10
C Risque élevé moins de symptômes	3 ou 4	Et / ou ≥ 2	+ 0 à 1	< 10
D Risque élevé davantage de symptômes	3 ou 4	Et / ou ≥ 2	≥ 2	≥ 10

Table 5 : Nouvelle classification de GOLD adoptée en 2011.

Si le mérite de la nouvelle classification est d'intégrer l'aspect pluridimensionnel de la BPCO avec l'évaluation de la qualité de vie et l'évaluation des exacerbations, des discussions méthodologiques sont encore en cours sur le choix du seuil des outils que ce soit pour l'évaluation de la dyspnée (>1 ou > 2) ou du seuil concernant le CAT.

B. Épidémiologie de la BPCO

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, la prévalence de la BPCO est en constante augmentation. En effet, la BPCO est actuellement la cinquième cause de mortalité dans le monde mais devrait atteindre, d'ici à 2020, le troisième rang juste après les maladies cardiaques et cérébro-vasculaires (Murray *et al.*, 1997).

La plus grande partie des données concernant la prévalence, la morbidité et la mortalité des patients atteints de BPCO est issue des pays développés. Ces données sont probablement sous estimées de par le sous diagnostic de cette maladie (banalisation des premiers symptômes

évoqueurs chez des patients fumeurs, nécessité de mesurer la fonction ventilatoire pour faire le diagnostic,...).

Dans le monde, selon les données OMS de 2008, 210 millions de personnes étaient atteintes de BPCO (représentant une prévalence de 4 à 10%). Parmi ces 210 millions de malades, 80 millions présentaient une BPCO modérée à sévère et 3 millions sont décédés des suites de leur maladie (soit 5% des décès dans le monde).

Selon une étude de l'ECRHS (European Community Respiratory Health Survey), la prévalence de la BPCO et des symptômes respiratoires (toux ou expectoration chronique) en France était parmi les plus faibles d'Europe. En effet, en 2006, les taux de mortalité calculés sur l'ensemble de la population (tout âge) et standardisés sur la population européenne étaient de 8,2 / 10.000 en France (14 / 10.000 chez les hommes et 5 / 10.000 chez les femmes) alors qu'ils étaient de 19 / 10.000 (31 / 10.000 pour les hommes et 12 / 10.000 pour les femmes) pour l'Europe des 27 (Source Eurostat). En France, la BPCO concerne 3 à 3,5 millions de personnes, soit 6 à 8% de la population adulte.

Pour les années 2004 – 2006, les plus forts taux de mortalité liés à la BPCO en France étaient observés dans le Nord – Pas de Calais, la Bretagne, l'Alsace et la Lorraine comme montré dans la figure 7 (Fuhrman *et al.*, 2010).

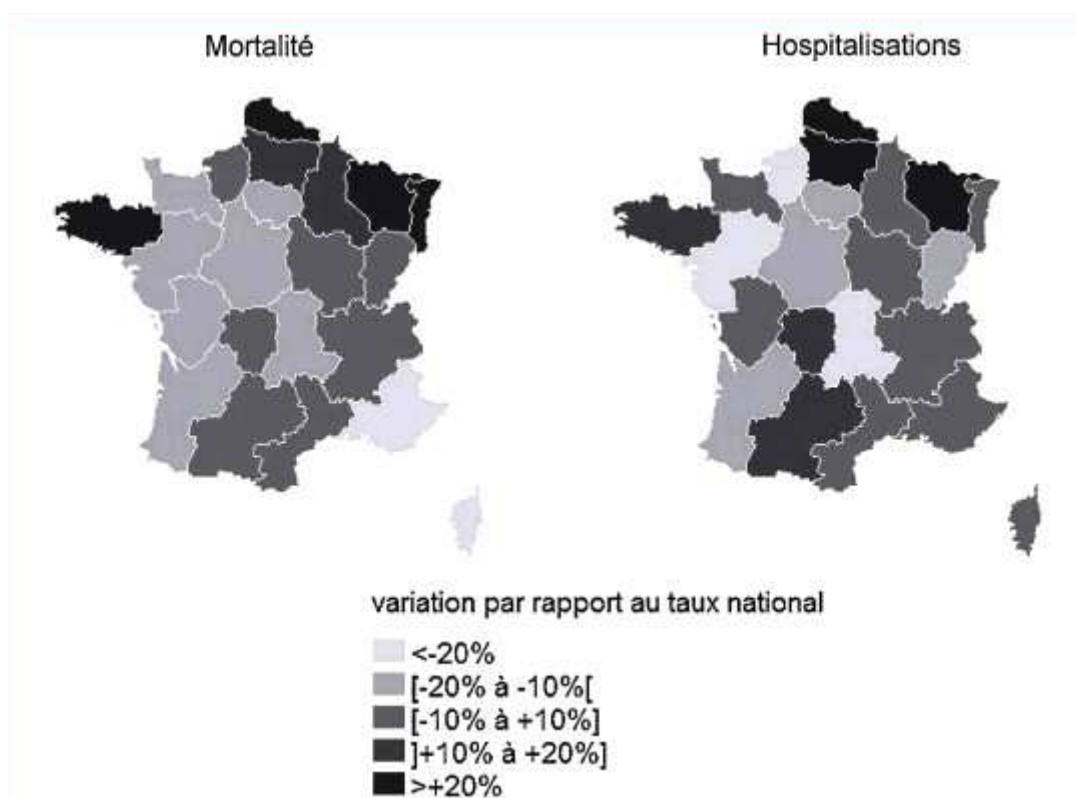


Figure 7 : Variations régionales de la mortalité liée à la Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive (causes multiples) et des hospitalisations liées à des exacerbations de BPCO, adultes de 45 ans ou plus, France Métropolitaine, 2004-2006, Source : Fuhrman *et al.*, 2010.

La prévalence de la BPCO augmente avec la précocité du diagnostic et le vieillissement de la population. Pour le patient, elle entraîne des incapacités importantes dans les activités de la vie

quotidienne ; pour le médecin, une forte consommation de soins ; pour les organismes payeurs, un coût élevé.

C. Impact économique de la BPCO

Selon le rapport du site BCC Research (Business Communications Company), un organisme spécialisé dans les études de marché, le marché global pour l'asthme et la BPCO a été évalué à 34,9 milliards de dollars en 2011 en termes de prescriptions médicales. Ce coût devrait atteindre les 47,1 milliards de dollars en 2017.

En France, l'étude SCOPE Santé a montré que 66% des coûts directs observés chez les patients atteints de BPCO étaient en rapport avec la maladie ou ses complications, et que, parmi ces patients, 65,5 à 72,3% bénéficiaient d'une prise en charge pour affection de longue durée.

En 2001, le coût direct total de la BPCO, tous stades confondus, en France était estimé à 4366€ par patient sur 12 mois soit presque le double de la consommation moyenne de soins en France. Ce coût augmente avec la sévérité de la maladie en relation avec les dépenses liées aux hospitalisations et à l'assistance respiratoire (respectivement 2642€ et 1071€ / an / patient au stade sévère) (Fournier *et al.*, 2005).

En plus des dépenses liées aux soins, la BPCO a un impact économique lourd dans le domaine professionnel. En effet, parmi les maladies respiratoires et selon le site ELF (European Lung Foundation), la BPCO est la première cause d'absentéisme au travail et représente, dans la communauté européenne, approximativement 41.300 jours de travail perdus par 100.000 habitants causant une perte de productivité atteignant un total de 28,5 milliards d'euros par an.

La BPCO coûte cher à la société, il existe donc un intérêt certain à essayer de mieux comprendre cette pathologie dans le but de mieux la maîtriser.

D. Facteurs de risques

1. Facteurs d'origine génétiques

Bien que la BPCO soit connue pour être une maladie liée au tabagisme, elle n'atteint pas tous les fumeurs (Løkke *et al.*, 2005 ; Laniado-Laborin *et al.*, 2009) et le développement de la pathologie n'est pas directement lié au degré de tabagisme. Ceci suppose que des facteurs génétiques pourraient influencer le développement de la maladie de manière individuelle.

Actuellement, bien que diverses pistes soient explorées, le seul facteur génétique démontré comme étant impliqué dans le développement de la BPCO est le déficit en $\alpha 1$ – antitrypsine (AAT). L'AAT est une enzyme appartenant à la famille des serpins dont le rôle est d'inhiber l'action de l'élastase produite par les leucocytes. En effet, l'AAT est une anti-protéase responsable de la défense des tissus et des voies respiratoires sous-glottiques. L'AAT exerce son rôle protecteur en inhibant l'élastase produite par les neutrophiles responsables de la digestion enzymatique tissulaire (Gadek *et al.*, 1981). Dans le poumon, le déficit pour cette enzyme prédispose alors à l'apparition précoce d'emphysème (Eriksson S., 1965). La prévalence de ce déficit génétique est approximativement de 1 pour 2500 dans l'Europe de l'Ouest (Fregonese *et al.*, 2008). Les patients BPCO atteints de ce déficit constituent un groupe à part qui ne dépend

apparemment pas de l'exposition à des substances nocives pour développer la maladie. Cependant, l'exposition de ces sujets porteurs de mutation pour l'AAT à la fumée de cigarette accélère de manière significative l'apparition d'un emphysème (Janoff A., 1985).

D'autres polymorphismes de gène ont été identifiés comme pouvant être impliqués dans le développement de la BPCO. Notamment, il a été observé une mutation dans le gène codant la Glutathion S – Transférase (GST), une enzyme impliquée dans la gestion du stress oxydatif (Cheng *et al.*, 2004) et associée au risque de développer un emphysème.

Un polymorphisme du gène codant l'Interleukine (IL-) 10 a également été observé plus fréquemment chez les patients BPCO et associé à l'altération de la fonction pulmonaire chez certains sous-groupes de patients atteints de colite ulcéreuse ou souffrant de la maladie de Crohn (Ekbohm *et al.*, 2008).

2. Facteurs d'origine environnementale

a) *Fumée de cigarette*

Le principal facteur de risque dans le développement de la BPCO est le tabagisme. Le tabagisme est un terme médical désignant l'intoxication aiguë ou chronique provoquée par l'abus du tabac (Définition du Centre National de Ressources Textuelles et Lexicales) et par extension s'applique aux consommateurs de tabac en général. Deux types de tabagisme sont à prendre en considération : le tabagisme actif, caractérisant le fumeur direct de cigarette, et le tabagisme passif.

Le tabagisme actif consiste en la consommation volontaire de tabac. Le tabac peut être consommé de différentes manières (chiqué, prisé) mais la plus répandue est celle qui consiste à le fumer. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, 5.500 milliards de cigarettes sont produites dans le monde chaque année pour une consommation d'environ 11 milliards de cigarettes chaque jour. En France, le nombre de cigarettes vendues légalement est de 55 milliards par an. La consommation moyenne est de 15,1 cigarettes par jour pour les hommes et de 12,6 pour les femmes et concernerait environ 30% de la population (Beck *et al.*, 2010). « Fumer tue », ce n'est pas nouveau. Le tabac est considéré comme la première cause évitable de mortalité en France et dans le monde. Chaque année, ce sont plus de 60.000 fumeurs qui décèdent d'une pathologie liée à leur tabagisme dans notre pays (Hill C., 2004). En effet, la fumée de tabac contient plus de 4000 composants ; nombreux sont toxiques (monoxyde de carbone, cadmium, nicotine,...) et 60 sont des cancérogènes reconnus (benzopyrène, nitrosamines,...) (IARC, 2004). La fumée de cigarette va provoquer, outre la dépendance, de nombreuses pathologies telles que les maladies cardiovasculaires (maladie coronarienne, accident vasculaire cérébral, anévrisme aortique,...), les cancers (bronchique, du larynx, du pharynx, de la vessie, du col de l'utérus, du sein, du pancréas,...), les maladies respiratoires (BPCO, aggravation de l'asthme,...), les maladies digestives (reflux gastro-œsophagien, ulcère gastroduodéal, aggravation de la maladie de Crohn,...) ou encore les retards de croissance intra-utérin lors d'une exposition pendant la grossesse (CEP, 2013).

Le tabagisme passif consiste, quant à lui, en l'inhalation involontaire de la fumée de tabac présente dans l'air ambiant (Randall *et al.*, 2005). La fumée environnementale est constituée

principalement par la fumée qui se dégage du bout incandescent de la cigarette entre les bouffées et de celle qui traverse le papier de cigarette (ces deux sources constituent le courant secondaire). Elle provient aussi de la fumée du courant primaire inhalée par le fumeur, puis expirée par ce dernier (courant tertiaire). Elle comporte finalement la fumée qui s'est déposée sur les poussières ou les surfaces et qui revient en suspension dans l'air après l'extinction de la cigarette (courant quaternaire). La fumée environnementale (courants secondaire, tertiaire et quaternaire) pénètre dans l'organisme principalement par inhalation, mais aussi par absorption orale ou cutanée. La concentration de produits toxiques et cancérigènes est beaucoup plus élevée dans la fumée environnementale que dans le courant primaire, ce qui explique qu'elle soit dangereuse malgré sa dilution dans l'air ambiant. En fait, elle est surtout pathogène dans les locaux fermés, de petit volume et mal ventilés. Il faut noter que le fumeur actif est lui aussi affecté par la fumée environnementale puisqu'il est au plus près de sa source principale constituée par le bout incandescent de la cigarette. Au cours de cette dernière décennie, le tabagisme passif a été étudié en détail en tant que facteur de risque dans le cadre des pathologies pulmonaires chez les non-fumeurs (Trédaniel *et al.*, 1994 ; Eisner *et al.*, 2005). Les études démontrent que la BPCO peut aussi toucher les non-fumeurs et que le tabagisme passif n'y est pas étranger. Le risque de développer une BPCO est de 48% supérieur chez les sujets exposés au tabagisme passif que chez les personnes non exposées. Globalement parlant, on peut affirmer que le tabagisme passif constitue un facteur de risque dans la survenue d'une BPCO chez les non-fumeurs.

Parmi les patients atteints de BPCO, neuf sur dix sont fumeurs ou ex-fumeurs. Les chiffres liés au risque de développer une BPCO chez les fumeurs varient fortement : de 20% (Løkke *et al.*, 2005) à 50% (Laniado-Laborin *et al.*, 2009). Selon ces dernières sources, jusqu'à 50% des fumeurs développent à terme une BPCO telle que définie par le rapport du GOLD.

Les effets de la fumée de cigarette dans le développement de la BPCO seront détaillés à la page suivante.

Cependant, des résultats provenant d'un nombre croissant d'études publiées, suggèrent que des facteurs de risques autres que le tabagisme sont fortement associés à la BPCO.

b) Exposition aux polluants aériens intérieurs

L'utilisation de combustibles sous forme de biomasse (bois, charbon de bois, matières végétales ou fumier animal) comme principale énergie domestique dans de nombreux pays en voie de développement est une coutume encore très répandue. Au niveau mondial, cela représente 3 milliards de personnes exposées aux fumées de tels combustibles (contre 1,01 milliard de fumeurs) (Lopez *et al.*, 2006). Dans les pays en voie de développement, 50% des décès suite à la BPCO étaient imputables à l'utilisation de telles énergies, bien que ces données soient vraisemblablement sous-évaluées de par un défaut de prise en charge ou de diagnostic. Ces énergies présentent une efficacité de combustion faible entraînant la production de polluants tels que des particules de diamètre inférieur à 10 μm , du monoxyde de carbone, du dioxyde d'azote, du dioxyde de soufre ou encore de formaldéhyde et de carcinogènes (Smith KR., 2002). Pour se faire une idée, la concentration de particules produites est de 300 – 3000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ par jour (et jusqu'à 30.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ pendant la cuisson des aliments) alors que les villes les plus

polluées au monde présentent une concentration inférieure à 300-500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (Torres-Duque *et al.*, 2008).

c) Expositions Professionnelles

En 2003, L'American Thoracic Society a montré qu'environ 15% des cas de BPCO pouvaient être attribués à une exposition sur le lieu de travail. Cette maladie toucherait particulièrement les fermiers (poussières organiques et inorganiques), les mineurs (charbon et minerais), les garagistes (particules fines de diesel) et les industriels (silices, acier et gaz irritants) (Balmes *et al.*, 2003).

d) Pollutions extérieures

L'exposition à des polluants aériens à haute concentration, comme dans les grandes villes ou près des zones de trafic important, entraînerait une aggravation des symptômes pré-existants de BPCO (Arbex *et al.*, 2009). Cependant, aucun lien n'a pu être établi entre ces expositions et l'apparition de nouveaux cas.

e) Statut socio-économique

Le statut socio-économique modeste peut être, de manière indépendante, liée au développement de la BPCO. En effet, ce développement de la maladie serait alors une conjonction de divers éléments tels que la malnutrition (avec de faibles apports en antioxydants) (Romieu *et al.*, 2001), une exposition passive à la fumée de cigarette (Eisner *et al.*, 2005), l'utilisation de biocombustibles et les risques professionnels.

E. Physiopathologie de la BPCO

Dans la littérature, le facteur de risque le plus largement étudié et le plus important est l'exposition chronique à la fumée de cigarette.

Cosio *et al.* (Cosio *et al.*, 2009) ont proposé un modèle en trois étapes permettant d'expliquer le développement de la BPCO en réponse à la fumée de cigarette.

1. Étape 1 : Réponse initiale à la fumée de cigarette

L'exposition à la fumée de cigarette, de par sa haute teneur en composants toxiques (plus de 2000) et en radicaux libres (10^{14} radicaux libres) par bouffée, va contribuer à l'agression des cellules épithéliales pulmonaires et des macrophages qui vont alors être endommagés (Sun *et al.*, 1995). Toute altération de la barrière épithéliale (exposition à un toxique, pénétration d'une particule ou d'un agent pathogène infectieux viral ou bactérien) est à l'origine d'un « signal danger ». Des débris cellulaires (DAMP = Damaged Associated Molecular Pattern) provenant des cellules épithéliales lésées, mais également des constituants de la fumée de cigarette, représentent des ligands des PRR (Pattern Recognition Receptor), comme les TLR (notamment TLR4 et TLR2) ou l'IL-1R, induisant des voies de signalisation intracellulaires qui aboutissent à l'activation de NF- κ B et à l'induction de l'expression de gènes codant des médiateurs de l'inflammation. La table 6 présente les différentes molécules capables de se lier et d'activer les récepteurs de type PRR (Paul-Clark *et al.*, 2009 ; Doz *et al.*, 2008).

Molécules	Récepteurs
Composants de la fumée de cigarette	
Endotoxine (lipopolysaccharide)	TLR4 et CD14
Nicotine	nAChR, TRPA1
Espèces réactives de l'oxygène, Radicaux libres	NLRP3
Acroléine	TRPA1
Hydrocarbures polycycliques aromatiques	AhR
DAMP relargués par les cellules stressées, apoptotiques et nécrosées	
ATP	P2XR
Acide Urique	NLRP3
Molécules S100	TLR9, RAGE
Protéines de choc thermique	TLR2, TLR4, CD91, CD24, CD14, CD40
Défensines β	TLR4, CCR6
Interleukine - 1 α	Interleukine-1 R
ADN (mitochondrial)	TLR9
DAMP relargués par la destruction de la matrice extracellulaire	
Acide Hyaluronique	TLR2, TLR4, CD44
Fibronectine	TLR4, $\alpha\beta$ intégrines
Héparane sulfate	TLR4
Versican	TLR2
Biglycane	TLR2, TLR4, P2XR
N-Acétyle-proline-glycine-proline	CXCR1, CXCR2

Table 6 : Détection des composants de la fumée de cigarette et DAMP (Damaged Associated Molecular Pattern) par les PRR (Pattern Recognition Receptors) et autres récepteurs du système immunitaire inné. (TLR=Toll-like receptor. CD=cluster of differentiation. nAChR=nicotinic acetylcholine receptor. TRPA1=transient receptor potential A1. AhR=aryl hydrocarbon receptor. P2XR=purinergic receptor P2XR. P2YR=purinergic receptor P2YR. NLRP3=NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3. RAGE=receptor for advanced glycation end products; FPR1=formyl peptide receptor 1. ECM=extracellular matrix. CXCR=chemokine (c-x-c motif) receptor). Adapté de Brusselle *et al.*, 2011.

Les cellules épithéliales, mais également les macrophages ainsi activés, libèrent alors de nombreux facteurs chimiotactiques qui vont attirer les cellules inflammatoires dans le poumon (Barnes PJ., 2009). Parmi ces facteurs se trouvent le CCL2 qui, une fois lié à son récepteur le CCR2, recrute les monocytes qui se différencieront en macrophages une fois dans le poumon. Le CXCL1 et CXCL8 agissent, quant à eux, sur le récepteur CXCR2 afin d'attirer les neutrophiles (Mio *et al.*, 1997). Le recrutement et l'activation des leucocytes au sein du poumon par ces médiateurs initient la réponse immune innée. Les macrophages et les neutrophiles activés produisent également des protéases telles que les métallo-protéases matricielles MMP-9 et MMP-12 ou la « Neutrophiles Elastase » qui participent à la dégradation du parenchyme pulmonaire (menant à terme à l'emphysème) (Barnes *et al.*, 2006). L'activation des neutrophiles et des macrophages conduit à la libération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui, conjointement à celles contenues dans la fumée de cigarette, vont poursuivre la détérioration de l'épithélium et du tissu de connexion, induisant la libération de plus de DAMPs mais également l'entrée en apoptose des cellules épithéliales et endothéliales.

D'autres cytokines pro-inflammatoires, dont le TNF- α , l'IL-1 β (activateur des macrophages) et l'IL-6 (travaillant de concert avec d'autres cytokines, assurant un lien entre immunité innée et adaptative), sont également produites en réponse à la fumée de cigarette. Ces cytokines participent à l'amplification de l'inflammation à travers, notamment, l'activation du facteur de transcription NF- κ B (Aaron *et al.*, 2001 ; Culpitt *et al.*, 2003 ; Bhowmik *et al.*, 2000).

Les cellules épithéliales produisent également du TGF- β impliqué dans le remodelage tissulaire en favorisant la prolifération des fibroblastes et des cellules musculaires lisses mais aussi dans les dépôts de matrice extracellulaire, notamment le collagène, dans les petites voies aériennes. Ce processus est responsable en partie de la fibrose de ces dernières (Takizawa *et al.*, 2001).

Ces données soulignent l'importance du système immunitaire inné et des PRR dans le développement de la BPCO.

2. Étape 2 : Transition immunité innée et adaptative

Si l'inflammation liée à la fumée de cigarette n'est pas contrôlée par le système immunitaire inné, en plus des macrophages et des neutrophiles, d'autres cellules telles que les cellules dendritiques, cellules présentatrices d'antigène professionnelles, peuvent prendre le relai pour alerter le système immunitaire adaptatif. Les cellules dendritiques (localisées dans l'épithélium des voies aériennes et la *lamina propria*) capturent l'antigène qui a pénétré la barrière épithéliale. L'antigène est alors scindé en petits peptides et les cellules dendritiques migrent alors dans les ganglions lymphoïdes médiastinaux ou dans les formations lymphoïdes des muqueuses où elles présentent les fragments antigéniques aux lymphocytes (Banchereau *et al.*, 2000). Elles pourront ainsi promouvoir la différenciation des lymphocytes T CD4+ auxiliaires et la toxicité des lymphocytes T CD8+. La production de CXCL-9, -10 et -11 par les cellules épithéliales et les macrophages activés entraîne l'attraction des lymphocytes T CD4+ auxiliaires (polarisés Th1 ou Th17) et des CD8+ cytotoxiques dans le poumon, via la reconnaissance de ces chimiokines par le récepteur CXCR3 présent à la surface des lymphocytes (Grumelli *et al.*, 2004). Cependant, il est important de noter qu'en l'absence de système immunitaire adaptatif, et notamment chez des souris SCID, le système immunitaire inné est capable à lui seul de provoquer l'inflammation et l'emphysème dus à l'exposition à la fumée de cigarette (Al D'Hulst *et al.*, 2005).

3. Étape 3 : Réponse Immune Adaptative

Au cours de la BPCO, les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques sont les principaux lymphocytes retrouvés dans les différentes voies aériennes et dans le parenchyme pulmonaire. Ces lymphocytes vont contribuer à la dégradation du parenchyme pulmonaire via notamment la sécrétion d'enzymes protéolytiques telles que le granzyme B ou la perforine (Lieberman J., 2003). L'action de ces enzymes va entraîner une augmentation du nombre de cellules épithéliales et endothéliales apoptotiques ou nécrotiques, et cette destruction ne pourra pas être compensée par la prolifération cellulaire (Calabrese *et al.*, 2005). Le nombre de lymphocytes T CD8+ est en corrélation avec le degré d'obstruction et d'emphysème trouvé chez le patient (Saetta *et al.*, 1998). De plus, des modèles animaux ont montré que, dans le cas d'une BPCO induite expérimentalement, les lymphocytes T CD8+ étaient également capables de produire de l'IL-17 (Duan *et al.*, 2011).

Au moins deux types de lymphocytes T CD4+ effecteurs sont retrouvés dans les poumons de patients BPCO : les lymphocytes polarisés Th1 et Th17.

Les lymphocytes polarisés Th1 produisent essentiellement de l'interféron (IFN)- γ , stimulant la production de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires et promouvant ainsi l'accumulation

de cellules inflammatoires au sein du poumon. Une augmentation de l'expression de l'IL-12 et de l'IL-18 par les macrophages et les cellules dendritiques est probablement à l'origine du développement des cellules polarisées Th1 (Imaoka *et al.*, 2008). De plus, l'interaction entre certaines chimiokines (CXCL-10 et CXCL-9) sécrétées par les cellules T et leur récepteur (CXCR-3), retrouvé dans les macrophages, induit l'expression de la MMP-12 par ces derniers, nourrissant ainsi le cercle vicieux de l'inflammation et de la destruction du parenchyme pulmonaire (Grumelli *et al.*, 2004).

Les lymphocytes polarisés Th17 sont connus pour leur rôle dans l'inflammation et les maladies auto-immunes. Les cytokines nécessaires pour leur différenciation, leur prolifération et leur maintenance (IL-6, IL-1 β , TGF- β et IL-23) sont des cytokines produites par les cellules épithéliales et les macrophages au cours de l'exposition à la fumée de cigarette, comme nous l'avons précisé précédemment. La réponse Th17 est caractérisée par la production, entre autres, d'IL-17A et d'IL-17F. Ces cytokines sont notamment connues pour être liées à l'inflammation médiée par les neutrophiles en induisant la libération, par les cellules épithéliales pulmonaires et les cellules musculaires lisses, de chimio-attractants (CXCL1 et CXCL8) pour les neutrophiles (Laan *et al.*, 1999). L'IL-17 va aussi induire l'expression de gènes codant les mucines MUC5A et MUC5B, responsables en partie de l'hypersécrétion de mucus retrouvée chez les patients BPCO (Fujisawa *et al.*, 2009). De manière intéressante, l'IL-17 est également capable d'induire, en plus du recrutement des neutrophiles, la production de MMP-12 par les macrophages (Shan *et al.*, 2009). De plus, il a été montré récemment que l'IL-17 pouvait aussi induire la contraction des cellules musculaires lisses en se fixant directement sur son complexe de récepteurs exprimé par ces cellules (Kudo *et al.*, 2012). L'IL-17 pourrait donc participer à l'hyperréactivité bronchique observée lors de tests à la métacholine (un bronchoconstricteur).

Les lymphocytes Th17 ont un rôle important et parfois déterminant dans la mise en place d'une réponse immune protectrice lors d'infections bactériennes et fongiques. Cependant, ils sont également responsables des troubles immunitaires rencontrés dans certaines maladies auto-immunes qui étaient auparavant associées à une réponse de type Th1 excessive (Onishi *et al.*, 2010).

De plus, la présence de follicules lymphoïdes matures avec un centre germinatif et des zones bien individualisées de lymphocytes T et B dans le tissu péribronchiolaire des patients présentant une BPCO est aussi le témoin d'une réponse immune adaptative. Le nombre de follicules augmente fortement avec la sévérité de la maladie chez les patients ayant une BPCO sévère à très sévère (25 à 30 % chez les patients au stade GOLD III et IV) (Brusselle *et al.*, 2009). Les lymphocytes B isolés des follicules des patients ayant une BPCO sont de nature oligoclonale, ce qui suggère une induction antigène-spécifique de ces cellules B folliculaires (van der Strate *et al.*, 2006). La structure des follicules, avec un centre germinatif riche en cellules B et des zones périphériques riches en lymphocytes T CD4+ (80–90 %) et CD8+, favorise la présentation des antigènes par les cellules dendritiques lors de leur passage via le canal lymphatique efférent. Les cellules B et T, à qui le même antigène a été présenté, interagissent ensuite entre elles via leurs récepteurs et les signaux de costimulation pour initier l'expansion clonale des lymphocytes B avec production d'anticorps (Abbas *et al.*, 2000).

Ces données sont quelque-peu contradictoires et ne permettent pas de définir précisément la place des cellules T conventionnelles dans la physiopathologie de la BPCO. Leur rôle est vraisemblablement d'amplifier le processus et de participer dans les atteintes systémiques qui apparaissent secondairement dans la BPCO.

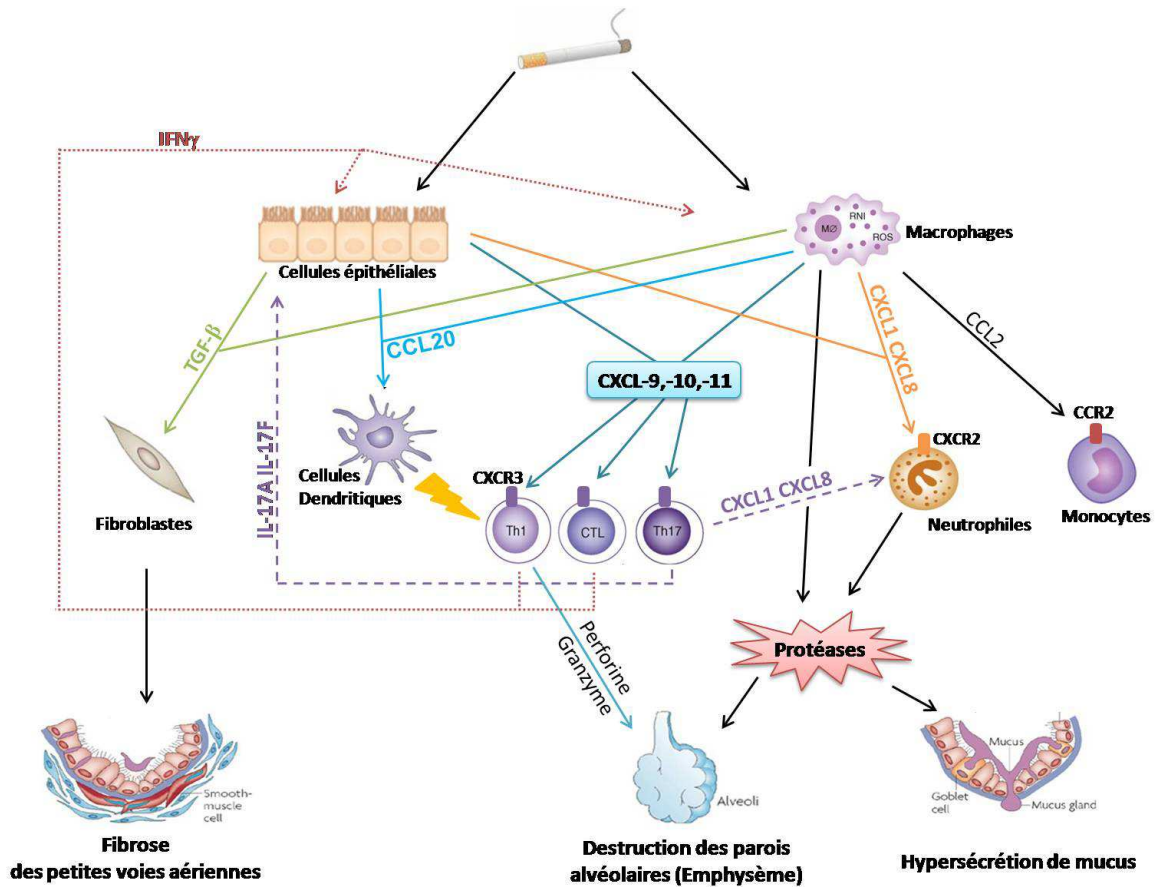


Figure 8 : Physiopathologie de la BPCO.

La fumée de cigarette inhalée active les cellules épithéliales et les macrophages qui libèrent de nombreux facteurs chimiotactiques recrutant ainsi les cellules inflammatoires au sein du poumon. Ces facteurs incluent le CCL2 qui agit sur le CCR2 pour le recrutement des monocytes, le CXCL1 et le CXCL8 qui agissent sur le récepteur CXCR2 afin de recruter les neutrophiles et les monocytes (qui se différencieront en macrophages une fois dans le poumon) et le CXCL9, -10 et -11 qui, via le récepteur CXCR3, recrutent les lymphocytes T auxiliaires et cytotoxiques qui relargueront de l'IFN-γ et de l'IL-17 continuant d'amplifier la réponse inflammatoire en stimulant les cellules épithéliales. Les cellules inflammatoires, avec les macrophages et les cellules épithéliales, libèrent des protéases telles que la MMP-9 ou MMP-12, qui causent la dégradation de l'élastine et l'emphysème. L'élastase produite par les neutrophiles induit également une hypersécrétion de mucus. Les cellules épithéliales et les macrophages sécrètent également du TGF-β qui stimule la prolifération des fibroblastes et donc la fibrose des petites voies aériennes. La production de CCL20 par les cellules épithéliales et les macrophages induit également le recrutement de cellules dendritiques spécialisées dans la présentation d'antigène et l'activation des lymphocytes T. Adapté de Barnes PJ., 2009.

4. Autoimmunité et BPCO

L'auto-immunité est le développement d'une réaction du système immunitaire contre les constituants propres de son organisme. Le système immunitaire ne reconnaît plus comme siennes certaines structures de l'organisme, il devient alors capable d'agresser et donc de léser ces structures, propres à l'individu. Ces lésions sont à l'origine des effets délétères puis de la maladie constituée.

Dans le cas de la BPCO, l'inflammation chronique présente au sein du poumon va être responsable de la modification de la structure de certaines protéines. Cela est notamment dû à la dégradation de l'élastine ou du stress oxydatif omniprésent entraînant la carbonylation des protéines (Kirkham *et al.*, 2011). Le système immunitaire adaptatif identifie ces protéines modifiées comme des antigènes du Non Soi lorsque celles-ci sont présentées par les cellules dendritiques. Ces cellules vont alors stimuler et induire le développement des sous-populations lymphocytaires Th1 et Th17 dans le poumon. La présence chronique de chimiokines issues de ces populations va notamment, et comme nous l'avons précisé précédemment, induire de manière plus importante la production de MMP-12 responsable d'une élastolyse incontrôlée au sein du poumon (Grumelli *et al.*, 2004).

F. BPCO : de l'atteinte pulmonaire à l'atteinte systémique

Au cours de la BPCO, certains marqueurs systémiques ont pu être mis en évidence. En effet, des marqueurs de type inflammatoire, comme le TNF- α , sont retrouvés au niveau du plasma en concentration plus élevée chez des patients BPCO en comparaison avec des sujets sains. D'autres médiateurs non spécifiques ont également pu être observés comme, par exemple, l'IL-6 qui contribue à augmenter les protéines de la phase aiguë (Donaldson *et al.*, 2005). D'autres cytokines telles que le TNF- α , l'IL-1 β , la chimiokine CXCL8 (IL-8) et les adipokines (leptine et grhélène) jouent un rôle potentiel dans les signes de comorbidités. De plus, la sévérité de cette inflammation systémique augmente avec le temps et les exacerbations de BPCO. L'augmentation de la CRP (protéine C réactive), du fibrinogène, de l'apolipoprotéine sérum amyloïde A ou de la protéine D du surfactant sont alors souvent reliées à la sévérité des exacerbations (Bozinovski *et al.*, 2008).

Une diffusion des médiateurs de l'inflammation pourrait être la cause de cette atteinte systémique. La présence de marqueurs spécifiques de l'inflammation pulmonaire dans la circulation, telle que la protéine D du surfactant (ayant un rôle dans l'opsonisation des bactéries) suggère que l'inflammation systémique est la conséquence d'une dissémination de l'inflammation pulmonaire de la BPCO (Sin *et al.*, 2007).

Cette pathologie pulmonaire et l'état inflammatoire qui y est associé peuvent donc diffuser de manière systémique dans le corps et induire des états pathologiques dans d'autres organes ou tissus (muscle, coeur et intestin).

1. BPCO et dysfonction musculaire

L'inflammation systémique de la BPCO pourrait contribuer à la dysfonction musculaire. En effet, l'augmentation sérique d'IL-6 (parfois décrite comme une myokine) observée dans la BPCO est inversement corrélée à la capacité d'exercice (Yende *et al.*, 2006). Il existe une activation du facteur de transcription NF- κ B et de iNOS (inducible Nitric Oxyde Synthase) dans le muscle squelettique des patients BPCO ayant un faible index de masse corporelle qui pourrait favoriser l'atrophie musculaire. Enfin, l'excès de production de radicaux libres favorise la protéolyse et l'apoptose musculaire (Agusti *et al.*, 2004).

La fonte musculaire est considérée comme un facteur prédictif de mortalité dans la BPCO, indépendant de l'altération fonctionnelle ventilatoire (Marquis *et al.*, 2002).

2. BPCO et atteintes cardio-vasculaires

La BPCO s'associe souvent à des affections chroniques cardiovasculaires du fait de leurs facteurs de risques communs, tel que le tabagisme, et de la présence dans les deux cas d'une inflammation systémique. En effet, les conditions mécaniques ventilatoires de la BPCO retentissent sur la fonction cardiaque en modifiant les pressions intrathoraciques (Montes *et al.*, 1996).

De plus, l'inflammation systémique de la BPCO qui peut être quantifiée par la concentration sérique de la protéine C réactive, entraîne une dysfonction vasculaire et augmente la fréquence de l'hypertension artérielle pulmonaire au cours des BPCO (Chaouat *et al.*, 2008).

3. BPCO et atteintes intestinales

Une étude de Ekblom et ses collaborateurs en 2008 (Ekblom *et al.*, 2008) a montré chez des patients souffrant de BPCO, une augmentation du risque de développer des maladies inflammatoires de l'intestin et, de manière intéressante, la colite ulcéreuse (qui présente normalement un pronostic plutôt favorable dans une population de fumeurs). De plus, le risque de développer une maladie de Crohn est également augmenté (encore plus que chez les sujets fumeurs seuls, la cigarette étant de mauvais pronostic pour cette maladie). Il semblerait que le statut BPCO des patients accentue la prévalence à la fois de la colite ulcéreuse et de la maladie de Crohn. Ces risques accrus pourraient être expliqués par une vulnérabilité inflammatoire présente chez les individus souffrant de BPCO. De plus, le tabagisme étant censé protéger de la colite ulcéreuse dans une population générale, les auteurs ont suggéré l'existence de sous-groupes de patients portant un génotype favorisant l'apparition des deux pathologies (Ekblom *et al.*, 2008).

4. BPCO et autres pathologies

D'autres atteintes systémiques pourraient être liées à la BPCO. Il a notamment été montré que la fréquence de l'ostéoporose ou de l'ostéopénie chez les patients BPCO était importante (de l'ordre de 50 % dans l'essai TORCH). En marge de facteurs de risques spécifiques, comme l'âge, l'inactivité physique, le tabagisme ou la prise de corticoïdes, les marqueurs de l'inflammation systémique, comme le TNF- α , l'IL-1 β ou l'IL-6, favorisent la résorption osseuse (Jorgensen *et al.*, 2008).

Les patients atteints de BPCO vont également, dans environ 20% des cas, présenter une anémie. On observe aussi un état de dépression plus important et la présence d'un syndrome métabolique pouvant conduire, à terme, au diabète chez ces patients (Lam *et al.*, 2010; Loerbroks *et al.*, 2012).

G. Le stress oxydatif

Le stress oxydatif est le reflet d'un déséquilibre entre les manifestations systémiques d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les capacités du système biologique à rapidement détoxifier les

intermédiaires réactifs ou à réparer les dommages causés par ces derniers. Ce déséquilibre dans le statut « rédox » normal des cellules peut être à l'origine d'effets toxiques à travers la production notamment de peroxydes et de radicaux libres qui vont attaquer tous les composants cellulaires incluant les protéines, les lipides et l'ADN. Il est à noter que les ROS tiennent également le rôle physiologique de messenger cellulaire et que le stress oxydatif va altérer le bon fonctionnement de ce mécanisme de transduction du signal.

1. Le stress Oxydatif dans la BPCO

La fumée de cigarette expose le poumon à des niveaux extrêmes de stress oxydatif. Dans sa phase gazeuse, la fumée de cigarette contient plus de 10^{14} molécules réactives par bouffée, incluant des oxydants tels que O_2^- , oxydes nitriques et peroxydants. La phase particulaire contient des radicaux organiques tels que des radicaux semi-quinones, des radicaux hydroxyles et de H_2O_2 (Halliwell *et al.*, 2006). La fumée de cigarette induit une augmentation de la charge oxydante et provoque des changements irréversibles dans les effets antioxydants protecteurs au niveau des voies respiratoires (van Der Toorn *et al.*, 2007).

De plus, les oxydants dérivés de la fumée vont endommager les cellules épithéliales pulmonaires en induisant directement des altérations dans les lipides de membrane, les protéines, les sucres et l'ADN conduisant à une inflammation chronique (Foronjy *et al.*, 2008). Cette inflammation chronique est une des caractéristiques de la BPCO montrée notamment par une augmentation des neutrophiles et des macrophages activés ainsi que de médiateurs inflammatoires dans les poumons. La combinaison du stress oxydatif et de l'inflammation chronique va encore amplifier le nombre de radicaux libres dans les voies respiratoires et, à long terme, favoriser l'expression de gènes pro-inflammatoires, la libération de protéines inflammatoires et l'inactivation des anti-protéases menant au cercle vicieux d'altérations des structures pulmonaires (Drost *et al.*, 2005 ; Bhowmik *et al.*, 2000 ; Paredi *et al.*, 2000).

La génération de ROS au sein des poumons a été directement liée à l'oxydation des protéines, des lipides, des sucres et de l'ADN (Foronjy *et al.*, 2008). La conséquence majeure de ce stress est certainement la formation de réactifs carbonyles et leur interaction avec des protéines conduisant à la carbonylation de ces dernières de manière non enzymatique (Dalle-Donne *et al.*, 2006). Le stress oxydatif pourrait être une des composantes du caractère auto-immun de la BPCO. En effet, les protéines carbonylées sont hautement immunogènes et sont reconnues par le système immunitaire inné à travers les PRR. Les cellules de ce système vont alors présenter ces néoantigènes au système adaptatif, facilitant ainsi une réponse immunitaire acquise. Il a notamment été montré un taux élevé d'auto-anticorps contre les protéines du Soi modifiées par carbonylation dans le sérum de patients BPCO, ce taux augmentant avec la sévérité de la maladie (Kirkham *et al.*, 2011). Cette modification va entraîner, en plus du processus auto-immun, une modulation dans la fonction des protéines, induisant des défauts de fonctionnement cellulaire.

Il a été montré notamment que le stress oxydatif pouvait accroître l'activité de l'Histone Acétyl Transférase (HAT) qui permet aux facteurs de transcription d'accéder à l'ADN codant et ainsi induire l'expression de gènes pro-inflammatoires dans les cellules épithéliales pulmonaires

(Tomita *et al.*, 2003). Les macrophages, ainsi que les neutrophiles, activés après exposition à la fumée de cigarette vont libérer de manière importante des ROS sous la forme notamment de radicaux superoxyde et de peroxyde d'hydrogène (Schaberg *et al.*, 1995).

De plus, le stress oxydatif peut entraîner le recrutement des cellules inflammatoires au niveau du poumon en augmentant la sécrétion de cytokines. Cela facilite la mise en place d'une boucle de rétrocontrôle positive qui perpétue l'inflammation et la destruction tissulaire par une infiltration excessive des cellules immunitaires (Bowler *et al.*, 2004).

Dans le cas de la BPCO, un défaut dans la clairance muco-ciliaire et une augmentation de la viscosité du mucus ont été montrés (Siddiqi *et al.*, 2009). En effet, des oxydants tels que les superoxydes ou l' H_2O_2 sont capables de réduire la vitesse de battements des cils des cellules épithéliales très rapidement (15 minutes après l'exposition) (Feldman *et al.*, 1994). De plus, les cytokines pro-inflammatoires et de nombreux ROS sont également capables d'induire l'expression des gènes codant les mucines conduisant à une hypersécrétion de mucus (Fujisawa *et al.*, 2009). Ces différents éléments vont contribuer à pérenniser l'inflammation.

2. Système antioxydant du poumon

Les antioxydants sont des agents qui neutralisent les ROS à un niveau basal et protègent les macromolécules cellulaires des modifications oxydatives. Un antioxydant classique va réagir rapidement avec des ROS afin de générer des espèces moins réactives. Il existe différents types d'antioxydants dans le poumon :

- les antioxydants enzymatiques (telles que la SuperOxyde Dismutase : SOD, la catalase, les Glutathione peroxydases, la glutathion S-transférase, la peroxiredoxine, et l'Hème Oxygenase - 1 : HO-1) (MacNee W., 2005),
- les antioxydants non-enzymatiques comme le glutathion (GSH), l'ascorbate, l'urate, l'alpha-tocophérol, la bilirubine, le monoxyde de carbone, la ferritine et l'acide lipoïque (MacNee W., 2005),

Certains de ces mécanismes de défense contre le stress oxydatif du poumon sont altérés chez les fumeurs et chez les patients BPCO, notamment par une inhibition de la glutamyl-cystéine ligase (une enzyme clé dans la synthèse de la GSH, un anti-oxydant important). La GSH n'est alors plus en mesure de contrôler ce stress oxydatif (Harju *et al.*, 2002).

Une diminution des gènes codant des antioxydants tels que l'Hème-Oxygénase-1 a aussi été observée chez des patients BPCO, défaut du à une instabilité de NRF2, le facteur de transcription associé à ce gène (Malhotra *et al.*, 2008). Il a également été montré que le TGF- β , produit par les cellules épithéliales et les macrophages, inhibait la production d'autres enzymes anti-oxydantes telles que la catalase et de la SuperOxyde Dismutase 2 (SOD2), dans les cellules musculaires lisses de l'appareil respiratoire (Michaeloudes *et al.*, 2011).

Ainsi, la fumée de cigarette provoque un stress oxydatif dans le poumon qui se pérennise chez les patients BPCO.

3. Thérapies antioxydantes

Diverses approches ont été envisagées afin de rééquilibrer la balance oxydants/antioxydants dans le but d'améliorer la fonction pulmonaire et de mieux gérer la BPCO.

Dans cet objectif, la délivrance d'antioxydants par supplémentation diététique semble être un des moyens les plus faciles à mettre en œuvre. Les plus fréquents anti-oxydants sont les vitamines A, C et E (incluant le β -carotène) via l'utilisation de comprimés ou en augmentant la prise alimentaire en fruits et légumes (Hirayama *et al.*, 2009).

L'administration orale de N-Acétylcystéine (NAC) permet d'obtenir une amélioration de la BPCO avec une augmentation de la tolérance et l'endurance à l'effort (Stav *et al.*, 2009), ainsi qu'une diminution des épisodes d'exacerbation (Sutherland *et al.*, 2006) et des marqueurs oxydatifs moins prononcés dans le sang et l'air expiré des patients (Zuin *et al.*, 2005). Cependant, l'utilisation de la NAC n'est pas recommandée par la SPLF en tant que traitement de la BPCO (Recommandations pour la prise en charge de la BPCO : Autres traitements médicamenteux, 2003). La NAC est un antioxydant puissant capable d'éliminer de nombreux ROS tels que les peroxydes, les radicaux hydroxyles... De plus, la NAC va stimuler la synthèse de Glutathion, induire l'activité de la GSH S-Transférase et promouvoir la détoxification hépatique.

Une autre approche possible est la délivrance d'antioxydants directement au niveau de la muqueuse pulmonaire, notamment la GSH (Bishop *et al.*, 2005). Il a également été envisagé l'utilisation d'antioxydants indirects via des analogues qui peuvent être convertis *in vivo* en antioxydants efficaces. Par exemple, la N-acystélyne (NAL), qui est en fait de la NAC sous forme de sel, peut être nébulisée directement dans le poumon afin d'induire la GSH intracellulaire dans les macrophages alvéolaires (Gillissen *et al.*, 1997).

Pour le moment, les thérapeutiques testées n'ont pas apporté de bénéfice très net, bien que de nouvelles molécules et des modes de traitement seront prochainement testés.

III. La réponse immunitaire Th17

Les lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires sont des médiateurs importants dans le fonctionnement du système immunitaire complet. Ces lymphocytes vont coordonner l'expansion et la régulation des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques, faciliter les réponses des lymphocytes B mémoires, recruter et moduler de multiples composants du système immunitaire inné. L'activation et la polarisation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs avec l'antigène varient en fonction du site anatomique, du type d'antigène, de l'environnement cytokinique et des molécules de co-stimulation. Ces variations entraînent la différenciation cellulaire des lymphocytes T auxiliaires en des effecteurs spécifiques de l'antigène avec des caractéristiques fonctionnelles distinctes appelées « état de polarisation ». En 1989, Mosmann et Coffman ont ainsi établi deux types de polarisation : les polarisations Th1 et Th2 (Mosmann *et al.*, 1989) puis d'autres types TH9, Th17, Th22 ou Treg ont été identifiés. De nombreuses études ont été menées par la suite, permettant d'établir que les cellules T se différenciaient de manière indépendante en chaque lignée et que ces lymphocytes différents présentaient des signatures d'expression génique propres. C'est en 2006 qu'une troisième lignée de lymphocytes, produisant l'interleukine (IL-) 17 a été proposée (Dong *et al.*, 2006).

A. Polarisation des cellules Th17

En plus du signal délivré par l'épitope, la différenciation fonctionnelle des cellules T auxiliaires est initiée par les cellules du système immunitaire inné, qui vont fournir les molécules de co-stimulation nécessaires pour l'activation et la prolifération des cellules T (Damsker *et al.*, 2010). Il a notamment été montré que les récepteurs aux molécules ICOS (Inducible T cell COStimulator) et CD28 étaient nécessaires pour la génération des cellules Th17 (de même que pour la polarisation Th2 tandis que la polarisation Th1 ne nécessitera qu'un seul de ces facteurs) (Takahashi *et al.*, 2009). Après l'interaction de ces molécules avec leurs récepteurs spécifiques, les lymphocytes T CD4⁺ passent d'un état « naïf » à un état « actif ». L'intervention des molécules de co-stimulation permet notamment d'empêcher les lymphocytes d'entrer dans un état d'anergie. La polarisation des lymphocytes en différentes sous-populations sera déterminée par l'environnement cytokinique présent autour de ces derniers. La polarisation primaire Th17 sera assurée par la présence essentielle de deux cytokines : l'IL-6 et le TGF β (Bettelli *et al.*, 2006). De manière intéressante, le TGF- β seul induira, quant à lui, la polarisation des lymphocytes T régulateurs via l'induction de l'expression de FoxP3 (le facteur de transcription spécifique des lymphocytes T régulateurs naturels (préexistants) et inductibles (par l'antigène)). Ces lymphocytes T régulateurs ont pour fonction de maintenir une homéostasie du système immunitaire en supprimant les réponses pro-inflammatoires excessives (en induisant une certaine tolérance) via notamment la limitation de la prolifération de lymphocytes T effecteurs. Cependant, la présence d'IL-6 en plus du TGF β dans l'environnement va inhiber l'expression de FoxP3 et orienter les cellules vers la polarisation Th17 (Bettelli *et al.*, 2006 ; Ghoreschi *et al.*, 2010). Cela démontre une origine commune entre les lymphocytes polarisés Th17 et les lymphocytes T régulateurs. Le TGF β et l'IL-6 sont

largement produits par de nombreux types cellulaires tels que les cellules dendritiques et les cellules épithéliales (Kindt *et al.*, 2008).

Le TGF- β via sa signalisation par TRAF6 (TNF-Receptor Associated Factor 6) et l'IL-6 via sa signalisation par la voie JAK/STAT3 (Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription) vont, dans un premier temps, induire l'expression du facteur de transcription ROR γ T qui est spécifique de la polarisation Th17 (Annunziato *et al.*, 2007). Cette expression est dépendante de STAT3. En parallèle, l'engagement du TCR va induire l'expression à la surface cellulaire du récepteur à l'IL-21 (IL-21R) (Coquet *et al.*, 2008).

La signalisation de l'IL-6 par son récepteur induit l'expression de l'IL-21 qui contrôle son expression de manière autocrine en se fixant sur son récepteur présent à la surface des cellules Th17 (Coquet *et al.*, 2008). Cette cytokine est fortement produite par les cellules Th17 et participe à la différenciation de ces cellules (Evans *et al.*, 2007). L'IL-21 va également réguler la fonction des cellules T, des cellules B, des cellules NK et des cellules dendritiques et supprimer l'expression de Foxp3. De plus, l'IL-21 va permettre d'induire l'expression du récepteur à l'IL-23 (Bettelli *et al.*, 2006). Ces cellules deviennent alors sensibles à l'IL-23 qui, via la signalisation de la voie JAK/STAT3 va, d'une part, réguler positivement l'expression de son récepteur et, d'autre part, agir en synergie avec le TGF- β pour induire l'expression de l'IL-17A (plus communément appelée IL-17) via la liaison directe de STAT3 au promoteur de l'IL-17 (Weaver *et al.*, 2006). L'IL-23 est une cytokine qui intervient à un stade tardif de la polarisation Th17 et qui est impliquée dans la maintenance et la prolifération de cette lignée. Elle va également permettre le recrutement des lymphocytes Th17 au niveau des sites de l'inflammation. En plus de l'induction de l'expression de l'IL-17, l'IL-23 va également participer à l'expression de l'IL-22 (Stockinger *et al.*, 2007). Les lymphocytes polarisés Th17 synthétisent également d'autres cytokines telles que l'IL-17F ou l'IL-22.

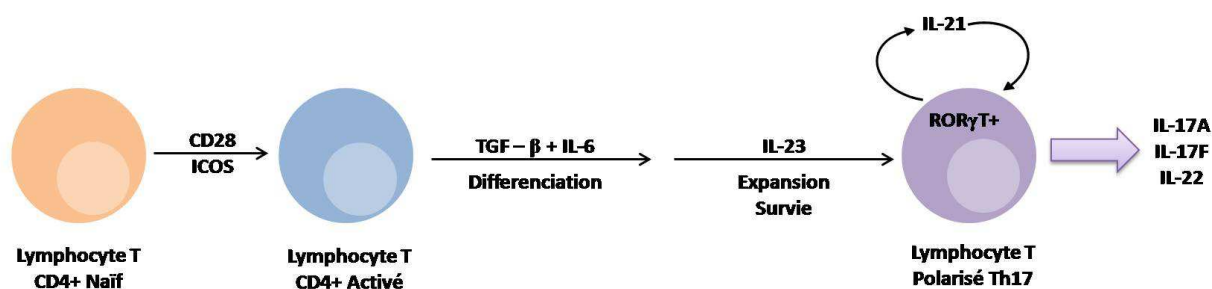


Figure 9 : La polarisation Th17

La reconnaissance des molécules de co-stimulation CD28 et ICOS présentées par les cellules présentatrices d'antigène ainsi que la reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes T naïfs induit l'activation de ces derniers. La présence dans l'environnement proche des cytokines TGF- β et IL-6 vont permettre, via également l'expression du facteur de transcription ROR γ T, la polarisation des lymphocytes T activés en lymphocytes Th17. La production d'IL-21 par les cellules Th17 va permettre, selon un mécanisme de rétrocontrôle positif, d'amplifier la polarisation Th17. Le maintien de la polarisation Th17 est assuré par la présence dans le milieu de la cytokine IL-23. Une fois activés et polarisés, les lymphocytes Th17 vont produire un panel de cytokines caractéristiques de la lignée, incluant l'IL-17A, l'IL-17F et l'IL-22. Adapté de Bi *et al.*, 2012.

Les lymphocytes T polarisés Th17 vont présenter, à leur surface, le récepteur CCR6 qui, via la chimiokine CCL20, va leur permettre d'être mobilisés vers les sites d'inflammation (Hirota *et al.*, 2007).

La maintenance des lymphocytes polarisés Th17 fait intervenir, avec le TGF- β et l'IL-6, l'IL-23, l'IL-21 et l'IL-1 β qui sont produits lors de l'activation des cellules dendritiques, des macrophages, des cellules T ou des cellules épithéliales (Bi *et al.*, 2012).

D'autres facteurs de transcription sont impliqués dans la différenciation Th17. Dans un premier temps, il a été montré que les lymphocytes T issus de souris déficitaires en IRF4 étaient incapables de se différencier en lymphocytes Th17 (Kriegel *et al.*, 2009). Bien que son rôle soit encore mal défini, IRF4 agirait en complexe avec Batf (B-cell Activating Transcription Factor) afin de favoriser l'accessibilité à la chromatine lors de la transcription des gènes cibles. Un autre facteur de transcription impliqué est le récepteur AhR (Aryl hydrocarbon Receptor). Il s'agit d'un récepteur cytosolique avec une activité de facteur de transcription dépendante d'un ligand (Esser *et al.*, 2009). Lors des états précoces de la polarisation Th17, l'expression de ce récepteur est fortement augmentée (Veldhoen *et al.*, 2008). Ce récepteur est un médiateur des toxines environnementales et détecte une variété de petits composants dont notamment des molécules issues du métabolisme du tryptophane, des dioxines ou encore le TCDD (2,3,7,8-tetrachlordibenzodioxine) qui est un composant retrouvé dans la fumée de cigarette et dans certains contaminants industriels (Klotz *et al.*, 2011). Le récepteur AhR, une fois activé, va pouvoir coopérer avec ROR γ T afin d'induire fortement l'expression d'IL-17 et d'IL-22.

Des études ont montré que le facteur de transcription HIF-1 α (facteur régulé par l'absence d'oxygène) était impliqué dans la régulation de la balance entre les lymphocytes Th17 et les lymphocytes T régulateurs. En effet, HIF-1 α va induire le développement des cellules Th17 à travers l'activation directe du facteur de transcription ROR γ T avec lequel elle forme un complexe se fixant sur le promoteur du gène codant l'IL-17. D'autre part, HIF-1 α atténue le développement des lymphocytes T régulateurs en liant directement le facteur de transcription Foxp3 afin de le cibler vers la dégradation protéosomale (Dang *et al.*, 2011).

En 2009, Du et ses collaborateurs (Du *et al.*, 2009) ont montré que le micro-ARN appelé miR-326 était capable d'intervenir dans la polarisation Th17, notamment lors de la sclérose en plaque expérimentale. En effet, la quantité de ce miR-326 était fortement augmentée dans les cellules polarisées Th17. Les micro-ARN sont de petites molécules d'ARN non codant présentant des séquences conservées. Ces molécules vont réguler de manière post-transcriptionnelle l'expression des gènes en ciblant les ARN messagers en vue de leur dégradation ou en réprimant leur traduction. Le micro-ARN miR-326 est notamment capable de se lier et d'empêcher la traduction de l'ARN messager codant ets-1 qui est un inhibiteur connu de la polarisation Th17.

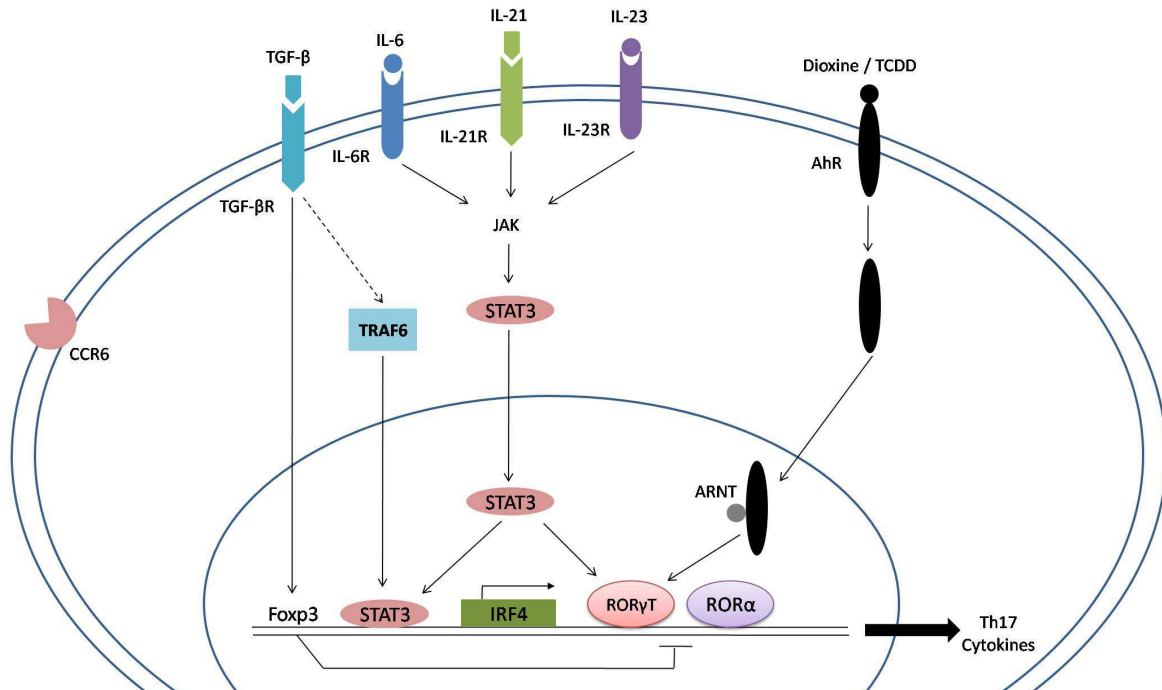


Figure 10 : Voies de signalisation engagées lors de la polarisation Th17.

Le TGF- β via sa signalisation par TRAF6 et l'IL-6 via la voie JAK/STAT3 induisent l'expression du facteur de transcription ROR γ T. En parallèle, l'engagement du TCR va induire l'expression à la surface cellulaire du récepteur à l'IL-21 (IL-21R). L'IL-6 induira l'expression de l'IL-21 qui en se fixant sur son récepteur exerce un rétrocontrôle positif et amplifie la polarisation Th17. L'IL-21 induit également l'expression du récepteur à l'IL-23 (IL-23R). Les cellules sont alors sensibles à l'IL-23 qui, via la signalisation de la voie JAK/STAT3, va d'une part, réguler positivement l'expression de son récepteur et d'autre part, agir en synergie avec le TGF- β pour induire l'expression de l'IL-17A via la liaison de STAT3 au promoteur de l'IL-17 et de l'IL-22. Le récepteur CCR6 présent à la surface cellulaire permet le recrutement de ces cellules via l'action de CCL20. D'autres facteurs de transcription sont impliqués dans la différenciation Th17 tels que IRF4 ou le facteur de transcription AhR. AhR est un médiateur des toxines environnementales et détecte, par exemple, le TCDD (2,3,7,8-tetrachlordibenzodioxine) retrouvé dans la fumée de cigarette et dans certains contaminants industriels. Le récepteur AhR, une fois activé, va pouvoir coopérer avec ROR γ T afin d'induire fortement l'expression d'IL-17A et d'IL-22. Adapté de Bi *et al.*, 2012.

Les lymphocytes polarisés Th17 jouent un rôle clé dans la défense de l'hôte contre les micro-organismes extracellulaires tels que bactéries ou levures (décrit dans la partie III. C, page 47) mais sont également impliqués dans les maladies auto-immunes (décrit dans la partie III. D page 48). A travers leur activation et la production des cytokines Th17, elles stimulent la signalisation pro-inflammatoire qui promeut la mobilisation des neutrophiles et l'expression de peptides antimicrobiens. De par leur rôle dans l'inflammation, les cellules Th17 sont impliquées dans un vaste réseau de réponses inflammatoires et semblent jouer un rôle critique dans les pathologies auto-immunes telles que l'arthrite rhumatoïde, les maladies inflammatoires des intestins, l'asthme, le psoriasis et la BPCO.

Cependant, il est important de savoir que les cellules polarisées Th17 présentent une certaine plasticité dans leur développement tardif. En effet, elles sont capables de produire à la fois de l'IL-17 (spécifique de la polarisation Th17) et de l'IFN- γ (spécifique à la polarisation Th1). Cela suggère que les cellules Th17 étaient capables de fonctionner en partie comme des cellules de type Th1 (Korn *et al.*, 2009). De plus, les cellules polarisées Th17, dont la différenciation est

maintenue par la présence de TGF- β et d'IL-23 peuvent rapidement être converties en population sécrétant de l'IFN- γ , sans production d'IL-17, lorsque ces cellules sont restimulées avec de l'IL-12 ou de l'IL-23 en absence de TGF- β (Muranski *et al.*, 2013). La génération de populations de cellules mémoires à long terme capables de s'auto-renouveler est une des caractéristiques clé de l'immunité adaptative. Après la stimulation par l'antigène, à la fois les lymphocytes T CD4+ et CD8+ subissent une expansion clonale, suivie par la formation de cellules T auxiliaires et de cellules T mémoires.

La capacité des cellules polarisées Th17 à générer des cellules mémoires est une hypothèse actuellement controversée. En effet, dans une étude de 2010, réalisée dans un contexte infectieux, les lymphocytes Th17 ont été caractérisés comme étant des cellules effectrices présentant une durée de vie restreinte qui avait été attribuée à l'arrêt de la sécrétion de l'IL-17 et à une faible expression de CD27 (molécule de co-stimulation importante pour la survie des cellules T et dont l'expression est diminuée dans les étapes de maturation avancée) en comparaison avec les cellules polarisées Th1 (Pepper *et al.*, 2010).

Cependant, dans un contexte de lutte anti-tumorale ou de développement de maladies auto-immunes, d'autres chercheurs affirment que les cellules polarisées Th17 sont capables d'exprimer une signature proche de celle des cellules mémoires. Fonctionnellement, ces caractéristiques leur procurent non seulement une capacité accrue dans le traitement des tumeurs et dans la destruction du tissu de manière auto-immune mais également des propriétés similaires aux cellules souches telles que l'accroissement de la survie, l'auto-renouvellement, la génération de lignées effectrices et l'intégration au groupe des cellules mémoires avec une efficacité largement supérieure à celle des cellules polarisées Th1 (Muranski *et al.*, 2011).

B. Cytokines produites par les lymphocytes Th17

1. Cytokine IL-17A

Souvent appelée IL-17, l'IL-17A est la première cytokine découverte dans la famille de l'IL-17 qui contient cinq autres membres dont l'IL-17F (Rouvier *et al.*, 1993). Bien que les deux se lient au même récepteur, l'IL-17A est 10 à 30 fois plus puissante que l'IL-17F. Le mécanisme d'action de l'IL-17A s'exerce via sa fixation sur un complexe de récepteurs composé de l'IL-17RA et de l'IL-17RC. La liaison de l'IL-17A à son récepteur va permettre l'induction de voies de signalisation en aval du récepteur (Toy *et al.*, 2006). Les sous-unités du récepteur vont interagir avec ACT1 (une protéine adaptatrice) qui va médier le recrutement de TRAF6 et éventuellement TRAF3 (TNF Receptor-Associated Factor) nécessaires pour l'activation de la voie NF- κ B. ACT1 va également activer la famille des MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinase) conduisant à l'activation du facteur de transcription AP-1 (Activator Protein 1) (Onishi *et al.*, 2010).

L'IL-17A cause également l'activation du facteur de transcription C/EBP (CCAAT/enhancer-binding protein) qui régule notamment l'expression du gène codant l'IL-6 (Onishi *et al.*, 2010).

Le récepteur à l'IL-17A est largement exprimé par les cellules du système immunitaire (lymphocytes T et B, macrophages, neutrophiles...) mais également par d'autres types cellulaires (cellules épithéliales, cellules endothéliales, fibroblastes, cellules stromales mésenchymateuses et kératinocytes) ce qui confère une activité pléiotropique à l'IL-17A causant une variété d'effets inflammatoires qui lient systèmes immunitaires inné et adaptatif (Silva *et al.*, 2003). La liaison de l'IL-17A à son récepteur va induire l'expression de nombreuses molécules par un nombre varié de cellules comme indiqué dans la table 7.

Cellule Cible	Produits induits par l'IL-17
Macrophages	IL-1, TNF- α , IL-6, CRP, et MMP-9
Cellules Dendritiques	CD80, CD86, et CMH de classe II
Cellules Épithéliales	IL-6, GM-CSF, chimiokines (IL-8, CCL2, CCL20, CXCL1, CXCL2, et CXCL5), β -defensine-2, lipocaline, et mucines (MUC5B and MUC5AC)
Cellules Endothéliales	IL-1, IL-6, G-CSF, GM-CSF, iNOS, et MMP
Fibroblastes	IL-6, G-CSF, chimiokines (IL-8, CXCL1, CXCL10, CCL2, CCL7, et CCL20), et MMP
Neutrophiles	MPO et MMP-9
Keratinocytes	TNF- α , IL-6, GM-CSF, chimiokines (IL-8, CXCL1), et peptides antimicrobiens (β -defensine-2, S100A7, et S100A8, S100A9)
Chondrocytes	IL-1, IL-6, iNOS, COX-2, et MMP
Ostéoblastes	RANKL, MMP, COX-2, PGE ₂ , et chimiokines (CXCL1, CXCL2, CXCL5, et CCL2)

Table 7 : L'IL-17A induit la production de différents médiateurs par nombreux types cellulaires. Adapté de Miossec *et al.*, 2008.

Cette capacité de l'IL-17A à induire la production de molécules par divers types cellulaires va conférer à l'IL-17A de nombreuses actions. Notamment, le recrutement et l'activation des neutrophiles (G-CSF, CXCL1, CXCL5, CXCL8) (Laan *et al.*, 1999), le recrutement sur les sites d'inflammation des cellules CCR6+ (CCL20) (Hirota *et al.*, 2007), l'accumulation des monocytes (CCL2) qui pourront alors se différencier (Awane *et al.*, 1999), l'entretien de la polarisation Th17 (IL-6) (Ogura *et al.*, 2008).

L'IL-17A va également induire la production de médiateurs pro-inflammatoires tels que le NOS (Nitric Oxyde Synthase) et la COX (Cyclo Oxygénase) (LeGrand *et al.*, 2001), de métalloprotéases matricielles (MMP-1, -3, -9, -13) impliquées dans le remodelage tissulaire (Prause *et al.*, 2004) ou de peptides antimicrobiens tels que la β -défensine 2 ou les protéines de la famille S100 (Liang *et al.*, 2006) ou encore la LCN2 (Lipocalin 2 / 24p3) qui est une protéine de la phase aiguë exerçant sa fonction antimicrobienne en se fixant sur les sidérophores bactériens (Flo *et al.*, 2004).

L'IL-17A stimule le ligand RANKL (receptor activator of NF – κ B ligand) notamment dans les ostéoblastes ce qui promeut l'ostéoclastogénèse et donc la destruction osseuse (Lubberts *et al.*,

2003). Elle induit également le facteur BAFF qui va promouvoir la survie, la prolifération et la différenciation des cellules B en cellules plasmiques sécrétant des IgG (Doreau *et al.*, 2009).

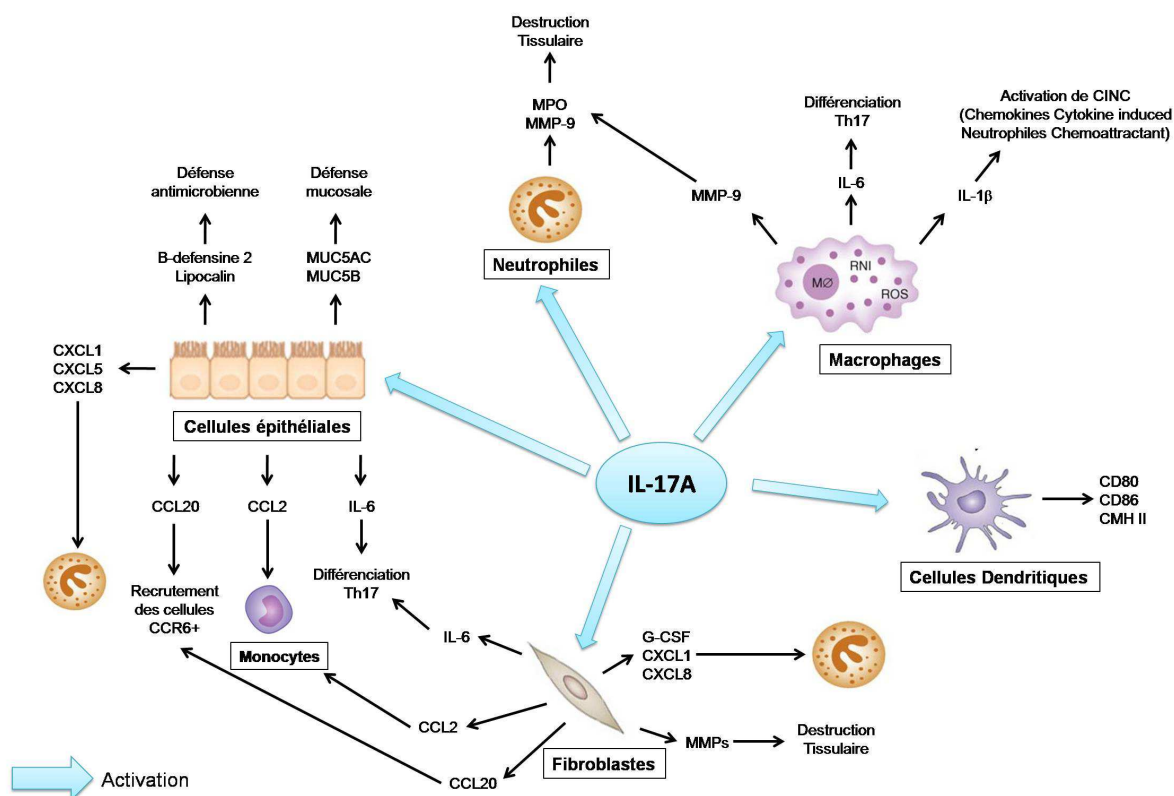


Figure 11 : Effets pléiotropes de l'IL17-A.

L'IL-17A est capable d'agir sur de nombreux types cellulaires qui produisent alors différents facteurs. L'action de l'IL-17A sur les cellules épithéliales induit la libération de chimioattractants pour les neutrophiles (CXCL1, -5 et -8), pour les cellules arborant le récepteur CCR6 (CCL20), pour les monocytes (CCL2). Les cellules épithéliales produisent également des peptides antimicrobiens (Lipocaline, β -défensine 2), des molécules impliquées dans la défense muqueuse (MUC5AC, MUC5B) et de l'IL-6 qui permet le maintien de la différenciation des cellules Th17. La production de Myélopéroxydase (MPO) et de MMP-9 par les neutrophiles en réponse à l'IL-17A entraîne la destruction tissulaire. Les macrophages produisent de la MMP-9, mais également de l'IL-6 et de l'IL-1 β . L'effet de l'IL-17A sur les cellules dendritiques induit leur activation (augmentation de l'expression de CD80, CD86 et des molécules du CMH de classe II). En agissant sur les fibroblastes, ceux-ci produisent de l'IL-6, du CCL2, du CCL20, des protéases ainsi que du G-CSF, du CXCL1 et du CXCL8 qui induiront la maturation, l'activation et le recrutement des neutrophiles.

Bien que l'IL-17 soit généralement un faible inducteur de ses gènes cibles *in vitro*, cette cytokine a un impact majeur *in vivo*. Il est vraisemblable que les effets synergiques de l'IL-17 avec d'autres médiateurs produits dans le même temps ont un rôle important en dictant ses activités physiologiques (Onishi *et al.*, 2010). Par exemple, les ARN messagers codant CXCL1, CXCL2, CXCL5 et IL-6 sont induits faiblement par l'IL-17 et /ou le TNF α et sont sujets à une dégradation rapide. Cependant, en présence d'IL-17 et de TNF α , la stabilité de ces ARN messagers est augmentée de manière significative. Ces actions synergiques sont résumées dans le tableau 8.

Cytokines / stimuli ayant une action synergique avec l'IL-17	Gènes cibles
TNFα	Cytokines (IL-6, G-CSF, OSM) Chimiokines (CXCL1, CXCL2, CXCL5, CXCL8, CCL2, CCL7) Facteurs de transcription (C/EBP β , δ , I κ B ζ), Facteur de remodelage osseux (RANKL, MMP-13) Peptides antimicrobiens (Lcn2, BDs)
IL-1β	IL-6, CXCL8, LIF
CD40	IL-6, IL-8, RANTES
Oncostatine M	MMP-13
IL-22	Cytokines (IL-19, -20, -24, G-CSF) Chimiokines (CXCL1) Peptides antimicrobiens (BDs, S100A7, 8, 9)
Vitamine D3 (1, 25, D3)	LL-37 (cathelicidine)
Facteur d'activation des cellules B (BAFF)	Twist1
IFNγ	IL-6, IL-8

Table 8 : Gènes ciblés par l'action synergique de l'IL-17 et d'autres molécules. Adapté de Onishi *et al.*, 2010.

A l'origine, seules les cellules T semblaient produire de l'IL-17A mais maintenant on sait que l'IL-17A est sécrétée par différents types de cellules innées telles que les macrophages, les cellules dendritiques, les neutrophiles, les mastocytes, les cellules NK, les cellules NKT et les lymphocytes T $\gamma\delta$ (Korn *et al.*, 2009).

Récemment, un nouveau groupe de cellules immunitaires a été identifié, les cellules lymphoïdes innées ou ILCs. Les ILCs sont un groupe de cellules immunitaires qui appartiennent à la lignée lymphoïde mais qui ne répondent pas à un antigène spécifique (en raison de l'absence de TCR ou de BCR). Ce groupe de cellules présente différentes fonctions physiologiques dont certaines sont analogues à celles des lymphocytes T auxiliaires. Les ILCs présentent la particularité de sécréter très rapidement des cytokines généralement produites par le système adaptatif (Cua *et al.*, 2010). Ces cellules ont été classées en trois groupes selon notamment le type de cytokines produites. Le groupe 3 des ILC, constitué des ILCs3 et les LTi (Lymphoid Tissue inducers), sont des cellules capables de produire entre autres de l'IL-17 et de l'IL-22. Les ILCs de ce groupe vont exercer un rôle bénéfique dans, par exemple, le maintien de l'homéostasie intestinale ou dans la résolution des infections fongiques et bactériennes (Gladiator *et al.*, 2013), elles peuvent également avoir un rôle délétère dans les pathologies de type auto-immunes, telles que le psoriasis ou les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

L'IL-17A joue un rôle important dans la défense de l'hôte, particulièrement contre les pathogènes extracellulaires attaquant les sites des muqueuses. Cet effet protecteur est assuré par de nombreux mécanismes qui impliquent l'induction de l'expression de cytokines, de chimiokines et de peptides antimicrobiens. Elle va notamment induire, comme nous l'avons vu précédemment, l'expression de facteurs promouvant la maturation et de recrutement des neutrophiles au niveau du site d'infection. L'IL-17A va également stimuler l'expression de l'IL-6 qui va alors induire les réponses immunitaires lors de la phase aiguë de l'infection mais également permettre la différenciation de plus de cellules Th17 (amplifiant par là-même la

réponse). L'IL-17A va induire l'expression de CCL20 qui va recruter les cellules CCR6+ comme les cellules Th17 ou les cellules dendritiques. Ce mécanisme implique également l'effet de l'IL-17 sur l'expression des β -défensines et des membres de la famille S100A qui vont alors participer à l'élimination directe des pathogènes présents (Onishi *et al.*, 2010).

Malgré son rôle protecteur contre certains pathogènes, l'IL-17A peut présenter un rôle délétère chez certains individus contribuant par là, à la pathogénèse et/ou à la maintenance de maladies auto-immunes ou immuno-inflammatoires. Un rôle délétère de l'IL-17A a notamment été décrit dans des pathologies telles que le psoriasis, l'arthrite rhumatoïde, les maladies inflammatoires des intestins et l'asthme.

2. La cytokine IL-17F

Bien que la fonction de l'IL-17A ait été largement décrite, peu de choses sont actuellement connues sur la régulation et la fonction de l'IL-17F. Cette cytokine présente 55% d'homologie avec l'IL-17A. Bien que l'IL-17F et l'IL-17A utilisent le même complexe de récepteurs pour leur signalisation, les réponses géniques induites par l'IL-17F sont 10 à 30 fois plus faibles que celles induites par l'IL-17A. Il existe également un hétérodimère IL-17A/IL-17F qui induira des réponses de force intermédiaire (Gaffen *et al.*, 2009). Tout comme l'IL-17A, l'IL-17F induit l'expression de différentes cytokines, chimiokines et molécules d'adhésion notamment au niveau des cellules épithéliales pulmonaires humaines et va induire le recrutement de neutrophiles (Hizawa *et al.*, 2006).

3. La cytokine IL-22

La cytokine IL-22 fait partie de la famille de l'IL-10. Bien que les cellules polarisées Th1 produisent plus d'IL-22 que les cellules polarisées Th2, les cellules polarisées Th17 sont clairement la source dominante pour cette cytokine parmi les cellules T (Liang *et al.*, 2006).

Le récepteur à l'IL-22 est un hétérocomplexe constitué d'une sous-unité IL-10R2 et d'une sous-unité IL-22R1 (Kotenko *et al.*, 2001). Alors que la sous-unité IL-10R2 est exprimée de manière ubiquitaire, l'expression de la sous-unité IL-22R1, quant à elle, va plutôt être restreinte aux cellules résidentes des tissus et plus spécifiquement les cellules épithéliales (Aggarwal *et al.*, 2001). De manière intéressante, l'expression de la sous-unité IL-22R n'a pas été observée au niveau des cellules immunitaires suggérant que ces dernières ne sont pas directement sensibles à l'action de cette cytokine (Wolk *et al.*, 2002).

La production de l'IL-22 va induire des réponses pro-inflammatoires via la production de cytokines, de chimiokines et de protéines de la phase aigüe par de nombreux types cellulaires (Wolk *et al.*, 2004). Cette cytokine peut s'avérer protectrice par son rôle dans la réparation tissulaire comme cela a été démontré au cours de l'hépatite.

A travers la production de peptides antimicrobiens (β -défensines, famille de protéines S100 et Reg3...), l'IL-22 va participer à la défense de l'hôte (Wolk *et al.*, 2006).

Cependant, tout comme l'IL-17, cette cytokine peut également présenter un rôle délétère dans certaines pathologies auto-immunes comme le psoriasis, la maladie de Crohn, la colite ulcéreuse ou la polyarthrite rhumatoïde (Ouyang *et al.*, 2008). Dans certains contextes, comme

l'induction de la fibrose pulmonaire par la bléomycine dans un modèle murin, un rôle pro-inflammatoire (voire pathologique) de l'IL-22 a été montré dans l'inflammation respiratoire qui pourrait être régulé par l'IL-17A. L'effet délétère observé pourrait être en fait la conséquence de l'association de l'IL-22 et de l'IL-17 dans un contexte particulier (Sonnenberg *et al.*, 2010). Les différents effets délétères et protecteurs de l'IL-17 et de l'IL-22 sont schématisés dans la figure 12.

C. Réponses Th17 et Infection

Contrairement à ses effets délétères dans l'auto-immunité, l'IL-17 joue un rôle vital en protégeant l'hôte contre l'infection. Les cellules produisant de l'IL-17 sont nombreuses au niveau des surfaces des muqueuses telles que les poumons, les intestins et la cavité orale. Ces cellules Th17 vont exprimer des récepteurs CCR6 qui vont leur permettre d'être recrutées au niveau des muqueuses afin d'exercer leur rôle protecteur (Yamazaki *et al.*, 2008). Des cytokines inflammatoires induites par l'IL-17, telles que l'IL-6, l'IL-1 β et le TNF α , vont servir de médiateur à la réponse défensive de l'hôte. Ce mécanisme va s'ajouter à l'effet direct du pathogène sur le système immunitaire inné via notamment l'activation des PRR.

De plus, l'IL-6 agit comme un rétrocontrôle positif afin d'amplifier la différenciation Th17 (Ogura *et al.*, 2008) et d'activer les réponses de phases aiguës et le complément. L'IL-17 va sécréter des molécules qui induisent la survie et l'expansion des neutrophiles (G-CSF, GM-CSF) mais aussi leur recrutement (CXCL1, CXCL2 et CXCL5) (Laan *et al.*, 1999). Les chimiokines, telles que CXCL9, CXCL10 et CCL20, une fois exprimées présentent une activité chimiotactique pour les lymphocytes, les cellules dendritiques et d'autres cellules immunitaires vers les surfaces mucosales.

L'IL-17 va également induire l'expression de molécules ayant une activité antimicrobienne telles que le CCL20, la défensine B4, MUC5B/AC, S100A7, S100A8 ou encore la lipocaline 2 (Hirota *et al.*, 2007 ; Liang *et al.*, 2006 ; Fujisawa *et al.*, 1999 ; Flo *et al.*, 2004).

Ainsi, l'effet de l'IL-17 dans la production de molécules à activité antimicrobienne et dans le recrutement cellulaire va conférer à cette cytokine un rôle protecteur contre diverses infections incluant les infections bactériennes intracellulaires et extracellulaires, fongiques et même parasitaires. Dans des modèles murins d'infections pulmonaires, l'IL-17A joue un rôle dans la défense contre des pathogènes bactériens extracellulaires tels que *Streptococcus pneumoniae*, *K. pneumoniae* (Ye *et al.*, 2001), et *Pseudomonas aeruginosa* mais aussi intracellulaires tels que *Chlamydia muridarum* et *Mycoplasma pneumoniae*. En dehors du poumon, l'IL-17A joue également un rôle de protection contre les infections au niveau d'autres muqueuses, comme les infections à *Candida albicans* dans la cavité orale ou la dissémination de *Salmonella* dans les intestins (Tsai *et al.*, 2013).

D. Réponse Th17 et Auto-immunité

- **La Polyarthrite Rhumatoïde** est une maladie dégénérative inflammatoire chronique, elle est caractérisée par une atteinte articulaire souvent bilatérale et symétrique, évoluant par poussées vers la déformation et la destruction des articulations atteintes. Il

a été montré que dans cette maladie, l'IL-17 promeut à la fois l'inflammation chronique et la destruction de l'os. L'IL-17, en se fixant sur ses récepteurs situés à la surface des cellules constituant le cartilage, les synoviocytes, les macrophages et les cellules osseuses, va induire la sécrétion par ces dernières de TNF α , d'IL-1 β et d'IL-6 (Shen *et al.*, 2008). L'IL-17 va également stimuler la production de CXCL8, CXCL1, CXCL2, CCL20, CCL2 et CCL7 conduisant au recrutement de neutrophiles, de macrophages et de lymphocytes au site d'inflammation ne faisant qu'amplifier celle-ci. L'IL-17 va également participer à la dégradation du cartilage et de la matrice osseuse, d'une part via la production de métallo-protéases matricielles (MMP-1, -2, -3, -9 et -13) (Prause *et al.*, 2004) et d'autre part en induisant la différenciation des ostéoclastes (par la stimulation de RANKL) (Lubberts *et al.*, 2003).

- **Le Lupus Érythémateux Systémique** est une maladie auto-immune touchant différents organes et caractérisée par une production d'auto-anticorps. Il s'agit d'une maladie associée aux lymphocytes B, cependant, l'IL-17 semblerait également jouer un rôle dans cette pathologie. En effet, l'IL-17 stimule l'expression des gènes codant Rgs-13 et Rgs-16 (Regulator of G-Protein signaling) inhibant ainsi les récepteurs couplés aux protéines G (tel que CXCR4) et rompt le trafic des cellules B dans les nœuds lymphatiques ce qui semble promouvoir la génération spontanée de centres germinatifs auto-réactifs et par là-même une augmentation de la production d'auto-anticorps (Hsu *et al.*, 2008). De plus, en agissant en synergie avec BAFF (B Cells Activating Factor), l'IL-17 augmenterait le nombre de cellules produisant des auto-anticorps en protégeant les cellules B de l'apoptose (Doreau *et al.*, 2009).
- **Le Psoriasis** est une inflammation chronique de la peau caractérisée par une hyperplasie du derme et une hyperprolifération des kératinocytes. Dans cette pathologie, on peut également observer une prolifération vasculaire et une infiltration de macrophages, de neutrophiles et de lymphocytes T. Un polymorphisme du gène codant le récepteur IL-23 a été observé dans la pathologie du psoriasis (Cargill *et al.*, 2007). L'expression ectopique du récepteur à l'IL-23 et la production d'IL-22 vont avoir un rôle dans le développement de la pathologie. En agissant en synergie avec l'IL-22, l'IL-17 va également augmenter l'expression des peptides antimicrobiens retrouvés à la surface de la peau, une des caractéristiques du psoriasis étant de présenter une plus grande quantité de ces peptides qu'au niveau d'une peau saine (Liang *et al.*, 2006).
- **La Sclérose en plaque** est caractérisée par des scléroses multiples et est considérée comme une maladie auto-immune du système nerveux central contrôlée par les lymphocytes T. Dans un modèle expérimental murin de sclérose en plaque, l'activité pathogénique des cellules Th17 peut être contrôlée par l'IL-10. Cependant, l'IL-23 va inhiber l'action de l'IL-10 et augmenter l'expression de gènes cibles de l'IL-17 tels que le CXCL10, le CCL2, le CXCL2 et le CCL20 (McGeachy *et al.*, 2007). De manière synergique, l'IL-17 et l'IL-22 vont rompre la barrière hémato-encéphalique et les cellules Th17 vont alors pouvoir proliférer dans le système nerveux central et causer des dommages neuronaux (Kebir *et al.*, 2007).

E. Réponse Th17 et maladie de Crohn

La maladie de Crohn fait partie des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). Cette maladie peut toucher l'ensemble du tractus gastro-intestinal mais se développe préférentiellement dans le côlon, dans la partie distale de l'iléon ou au niveau de la zone anale. La maladie de Crohn est caractérisée par des poussées (phases aiguës) alternant avec des phases de rémission (disparition des signes cliniques de la maladie). Le principal symptôme, lors de la phase aiguë, est une douleur abdominale qui s'accroît après les repas, accompagnée de diarrhées chroniques. Les patients atteints de Crohn présentent également de la fièvre, une fatigue persistante ou une perte de poids. Cette maladie a été caractérisée comme maladie auto-immune présentant une prévalence de 322 cas pour 100.000 personnes (Molodecky *et al.*, 2012).

L'hypothèse la plus répandue expliquant la pathogénèse des MICI est qu'une réponse trop agressive du système immunitaire adaptatif à l'encontre d'une sous population de bactéries commensales de l'intestin se développe chez des sujets génétiquement susceptibles et que des facteurs environnementaux pourraient accélérer le développement ou la réactivation de la maladie. Cette hypothèse suggère donc une composante multifactorielle dans cette pathologie (Sartor RB., 2006).

Parmi les différents facteurs de risque se trouvent donc les **facteurs d'origine génétique**. En effet, de très nombreux polymorphismes d'un seul nucléotide (ou SNPs) sur différents gènes ont été décrits comme étant impliqués dans le développement de la maladie de Crohn (Anekboon *et al.*, 2014 ; http://www.snpedia.com/index.php/Crohn's_disease). Ces gènes présentant des polymorphismes jouent principalement un rôle dans les réponses immunitaires innées, la fonction de la barrière muqueuse et dans l'élimination des bactéries. Parmi ces gènes, on retrouve notamment CARD15 (également appelé NOD2). Des mutations dans ce gène ont été observées dans 25 à 35% des patients souffrant de Crohn en Europe (Newman *et al.*, 2005) et entraîneraient une diminution de la clairance par les cellules épithéliales de certains pathogènes tels que *Salmonella* (Hisamatsu *et al.*, 2003) probablement du à un défaut dans la sécrétion de la production des α -défensines (Kobayashi *et al.*, 2005). Ce défaut de CARD15 conduit donc à une altération dans la diminution des réponses immunitaires innées face aux bactéries, à une inefficacité dans la clairance bactérienne et à une prolifération de bactéries commensales adhérentes à la muqueuse. D'autres gènes pouvant être impliqués dans le développement de la maladie de Crohn sont les gènes codant des protéines de transport de cation (SLC22A4 et SLC22A5) (Peltekova *et al.*, 2004), des gènes codant des protéines impliquées dans la maintenance de l'intégrité épithéliale (DLG5) (Stoll *et al.*, 2004) ou encore, des gènes codant des protéines contrôlant les flux sortants de drogues ou de composants xénobiotiques depuis les cellules (MDR1) (Brant *et al.*, 2003).

Différents **facteurs environnementaux** ont également été impliqués dans le développement du Crohn. Cependant, les mécanismes par lesquels ces facteurs induisent le développement de la maladie ne sont pas bien définis. Par exemple, le stress est capable d'altérer la perméabilité de la muqueuse, le flux sanguin dans la muqueuse et l'expression de cytokines et de

neuropeptides. Les infections et l'utilisation d'anti-inflammatoires non stéroïdiens peuvent induire de manière transitoire une inflammation aspécifique, rompre la barrière épithéliale et engendrer ainsi des réponses immunitaires innées (Berg *et al.*, 2002). Un régime alimentaire riche en aluminium et en fer est capable d'induire une virulence bactérienne et donc une réponse immunitaire innée importante (Perl *et al.*, 2004). Parmi les facteurs environnementaux, l'exposition à la fumée de cigarette est peut être l'un des facteurs de risque les mieux documentés dans la maladie de Crohn (Somerville *et al.*, 1984).

L'influence du microbiote commensal a également été mis en cause dans le développement de la maladie de Crohn. En effet, plusieurs études ont montré que la diversité microbienne de l'intestin était diminuée chez les patients souffrant de MICI (Manichanh *et al.*, 2006). Ces études ont notamment observé une augmentation de la famille des *Enterobacteriaceae* et une diminution de celle des *Firmicutes* et plus précisément des espèces de *Clostridium* (Frank *et al.*, 2007). Il a notamment été montré qu'un des membres principaux de la famille des *Firmicutes*, *Faecalibacterium prausnitzii*, identifié comme une bactérie commensale à activité anti-inflammatoire, était présent en nombre réduit chez les patients souffrant de Crohn et que cela était associé avec un risque plus important de récurrence après résection chirurgicale (Sokol *et al.*, 2008). En plus de la dysbiose, d'autres paramètres suggèrent l'implication du microbiote intestinal dans la pathogénèse de la maladie de Crohn notamment, une augmentation de la virulence de certaines souches de *E.Coli* (Darfeuille-Michaud *et al.*, 1998), une augmentation de l'invasion de la muqueuse et de la translocation bactérienne (Liu *et al.*, 1995) ou encore l'efficacité des traitements antibiotiques et prébiotiques dans la limitation de la pathologie (Sartor RB. 2004a). La liste n'est pas exhaustive.

La **réponse immunitaire** chez les patients atteints de Crohn est inadéquate. En effet, chez ces patients, à la fois les réponses innées et adaptatives sont activées entraînant notamment une perte de tolérance vis-à-vis des bactéries commensales de l'intestin (Duchmann *et al.*, 1995).

Le nombre de macrophages et de cellules dendritiques activés présents dans la *lamina propria* est fortement augmenté chez les patients atteints de Crohn (Sartor *et al.*, 2005). Ces cellules vont produire de nombreuses cytokines et chimiokines pro-inflammatoires (telles que l'IL-1 β , le TNF, l'IL-6, le CXCL8, l'IL-12, l'IL-18, l'IL-23 et l'IL-27) et augmentent également leur expression de molécules d'adhésion et de costimulation. Il est à noter que ce sont les monocytes et les neutrophiles ayant migré vers le lieu de l'inflammation qui produisent principalement les cytokines pro-inflammatoires. De manière intéressante, les cytokines impliquées dans les polarisations Th1 (IL-12) et Th17 (IL-23) sont sélectivement augmentées dans la maladie de Crohn mais pas dans la colite ulcéreuse. En condition physiologique, les macrophages résidents et les cellules épithéliales présentent de faibles capacités de réponse envers le microbiote intestinal de par l'induction d'une tolérance immunitaire lors de l'établissement de la flore intestinale (Iwasaki *et al.*, 2004). La reconnaissance de motifs bactériens par les TLRs présents à la surface des cellules va induire, via la voie NF- κ B, l'expression de nombreuses molécules telles que l'IL-1 β , le TNF, l'IL-6, le CXCL8, les molécules d'adhésion de type ICAM, les molécules de costimulation CD40, CD80, CD86 ou encore le facteur d'induction des cellules T, ICOS. En parallèle, l'activation de cette voie induit également des molécules ayant un rôle protecteur

telles que CARD15, COX-2, β - défensines, PPAR γ mais également son propre inhibiteur, I κ B α qui limitera les réponses inflammatoires (Sartor *et al.*, 2005).

Chez les patients atteints de cette pathologie, le profil cytokinique de type Th1 (IFN- γ et IL-12) est prédominant (Sartor RB., 2004b).

Cependant, dans la maladie de Crohn, les niveaux d'IL-17 sont également élevés indiquant une réponse de type Th17 (Fujino *et al.*, 2003). La production d'IL-17 peut notamment être expliquée par une forte présence de cytokines pro-Th17 telles que l'IL-23, l'IL-6 ou le TGF- β produites par les cellules présentatrices d'antigène. De plus, la colonisation bactérienne peut induire une augmentation de l'expression de l'IL-23 par les cellules dendritiques présentes au niveau de l'iléon (Becker *et al.*, 2003).

L'implication de la réponse Th17 semble donc avoir un rôle prédominant dans le développement de la maladie de Crohn. En effet, les lésions associées à cette maladie sont marquées par une forte production également d'IL-17F, d'IL-22 et d'IL-26. Des études ont montré une corrélation entre ces pathologies et des gènes associés à la réponse Th17, dont JAK2, IL12B, STAT3, CCR6 et TYK2 et l'IL-23R. Certains polymorphismes observés dans le gène codant le récepteur à l'IL-23 (cytokine importante dans le maintien de la lignée Th17) semble fournir un fort effet protecteur contre le développement de la maladie de Crohn, suggérant l'importance de cette voie dans la pathologie (Duerr *et al.*, 2006). De plus, l'IL-23R est surexprimé dans la muqueuse des patients atteints de la maladie de Crohn qui sont alors plus sensibles à l'IL-23 (Geremia *et al.*, 2011). D'autre part, un défaut en IL-10 (cytokine produite notamment par les Treg) semble favoriser le développement de la maladie (Murai *et al.*, 2009).

Au cours de cette maladie, le taux de lymphocytes T régulateurs qui normalement favorise un climat de tolérance au sein de la muqueuse est réduit (Takahashi *et al.*, 2006) pouvant expliquer un défaut dans le contrôle de la réponse immunitaire.

De plus, une augmentation de la perméabilité de la barrière épithéliale puis la rupture de cette dernière et/ou une modification du microbiote intestinal vont entraîner une plus forte exposition aux bactéries qui sont présentes dans la lumière intestinale, l'activation des cellules du système immunitaire et déclencher une réponse immunitaire inappropriée entretenant ainsi l'inflammation intestinale (Maloy *et al.*, 2011).

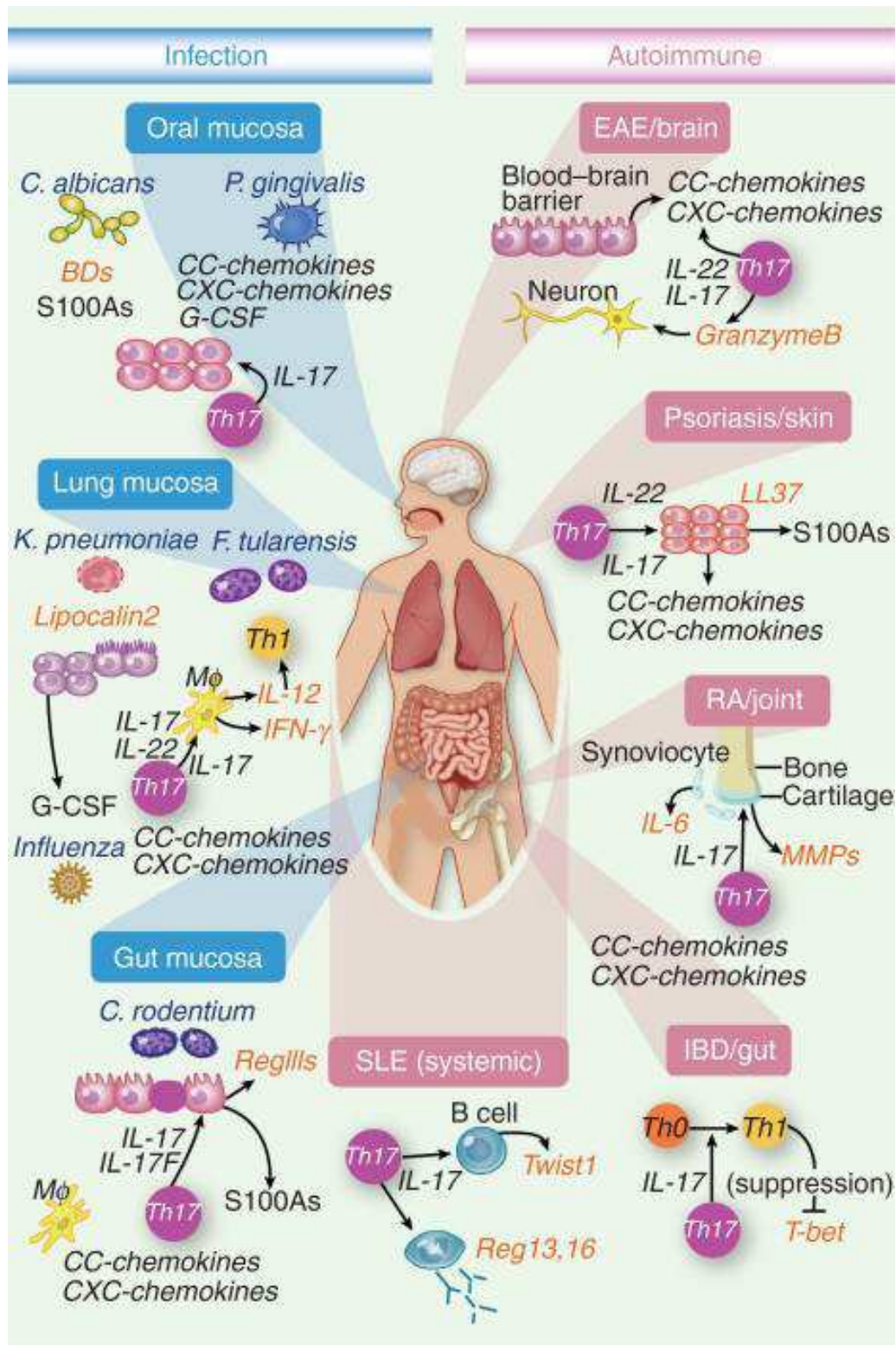


Figure 12 : Protections et pathologies associées à la réponse Th17. Schéma représentatif des gènes cibles de la signalisation IL-17 impliqués dans la réponse antimicrobienne et les pathologies auto-immunes. En bleu sont représentées les infections muqueuses où la signalisation IL-17 joue, le plus souvent, un rôle bénéfique ; en rose les maladies auto-immunes où la signalisation est plutôt délétère. (BDs : β -défensines, M Φ : macrophages, Th : lymphocyte T CD4+ auxiliaire, SLE : lupus érythémateux systémique, RA : poly arthrite rhumatoïde, IBD : maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, EAE : encéphalomyélite auto-immune expérimentale). Adapté de Onishi *et al.*, 2010.

Malgré leur rôle bénéfique dans la résolution de certaines infections, les cytokines de la réponse Th17, et plus particulièrement l'IL-17, ont un rôle très important dans l'initiation et la maintenance de maladies inflammatoires et auto-immunes (rôle présenté à la page 48). Cependant, alors que les cellules Th17 favorisent le développement de ce type de pathologies, d'autres lymphocytes, les lymphocytes T régulateurs, vont, quant à eux, avoir une fonction dans le contrôle de l'auto-immunité et jouent donc un rôle vraiment très important dans la pathogénèse des maladies auto-immunes en maintenant la tolérance du soi et en contrôlant l'expansion et l'activation de cellules T CD4+ auto-réactives.

F. Équilibre Th17 / T régulateurs

1. Les lymphocytes T régulateurs

Les lymphocytes T régulateurs sont une sous population de lymphocytes T CD4+ appelés à l'origine « cellules suppressives » (Gershon RK., 1975). Ces cellules jouent un rôle important dans la maintenance de la tolérance du soi et dans la modulation de l'ensemble des réponses immunes contre les infections et les cellules tumorales. Les cellules T régulatrices sécrètent du TGF- β et de l'IL-10 et nécessitent spécifiquement le TGF- β et le facteur de transcription Foxp3 pour leur différenciation. Ils inhibent l'auto-immunité, sont responsables de la tolérance envers les antigènes du Soi et protègent contre les dommages tissulaires et les maladies infectieuses (Sakaguchi S., 2004). Après la clairance des pathogènes, les lymphocytes T régulateurs régulent négativement les réponses immunitaires bloquant ainsi la survenue des pathologies chroniques (Sakaguchi *et al.*, 2006). Les lymphocytes T régulateurs sont capables de supprimer l'inflammation et les réponses immunes via divers mécanismes incluant le contact cellulaire (molécules inhibitrices de surface telle que la Galectin-1) et la production de cytokines immunomodulatrices telles que le TGF- β et l'IL-10 (Wan *et al.*, 2008).

Les lymphocytes T régulateurs peuvent être classés en deux groupes : les cellules T régulatrices naturelles (nTreg) et les cellules T régulatrices inductibles (iTreg). Ces deux types de lymphocytes T régulateurs expriment le facteur de transcription Foxp3, caractéristique de cette lignée. De manière intéressante, ces deux sous populations nécessitent le TGF- β soit pour leur induction (iTreg) soit pour leur maintenance (nTreg). Comme nous l'avons vu précédemment, le TGF- β est une cytokine impliquée également dans la polarisation des lymphocytes T Th17.

2. Équilibre de la balance Th17 / T régulateurs

Le contrôle dans l'équilibre de la balance Th17 / T régulateurs semble être critique dans le développement des maladies inflammatoires et auto-immunes. Les voies de développement de ces deux populations de lymphocytes T sont intimement liées. En effet, le TGF- β seul va induire à la fois le facteur de transcription FoxP3 (Treg) (Bettelli *et al.*, 2006) et le facteur de transcription ROR γ T (Th17) (Zhou *et al.*, 2007) dans les lymphocytes T CD4+ naïfs. Suite à l'induction de ces facteurs de transcription, le TGF- β ne sera capable de poursuivre la différenciation Th17 qu'en présence de la cytokine pro-inflammatoire IL-6 et de l'IL-21 (qui amplifie la différenciation Th17). Lorsque ces cytokines sont présentes, l'expression de FoxP3 induite par le TGF- β est réduite et celle de ROR γ T est stimulée. En effet, l'IL-6 et l'IL-21 induisent ROR γ T aux dépens de FoxP3 via l'activation de la voie de signalisation de STAT3

(Bettelli *et al.*, 2006). En absence d'inflammation et donc de cytokines pro-inflammatoires, le TGF- β stimule la différenciation des lymphocytes T régulateurs qui maintiennent alors une tolérance immunitaire. Cela est dû à l'inhibition de l'activité de ROR γ T par FoxP3, limitant donc la production de l'IL-17 et de l'IL-23 comme décrit dans la figure 13.

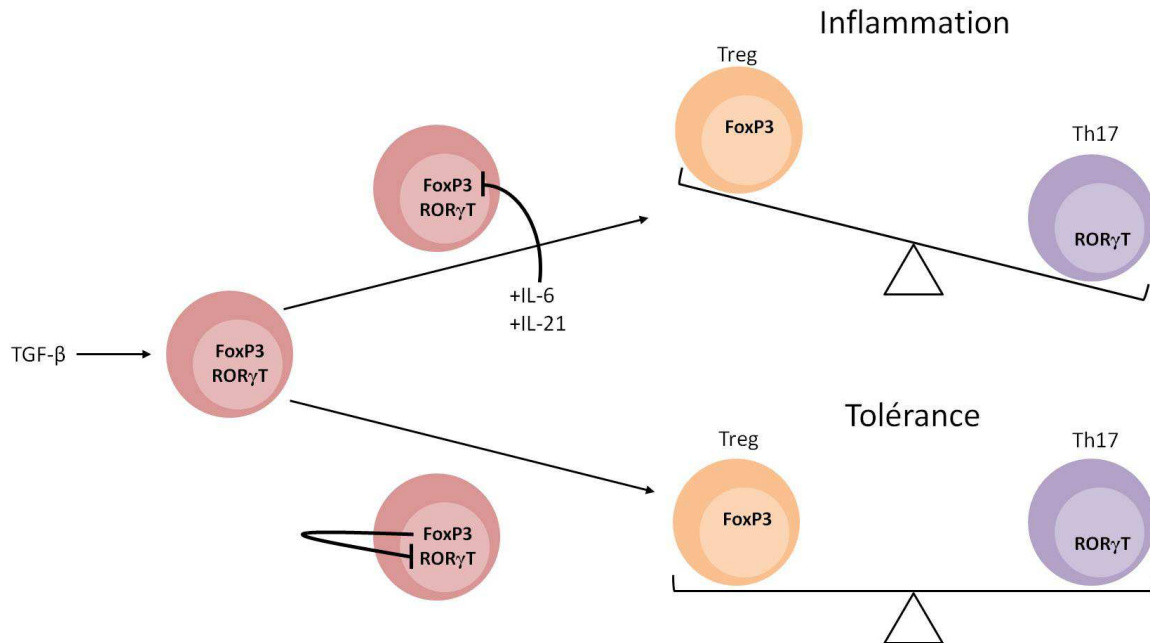


Figure 13 : Balance entre lymphocytes Treg et Th17.

Le TGF- β est capable d'induire l'expression de FoxP3 et de ROR γ T. En présence de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 ou l'IL-21, l'expression de Foxp3 est réduite et celle de ROR γ T est augmentée. En absence d'inflammation, le TGF- β favorise la différenciation des lymphocytes T régulateurs, due à l'inhibition de ROR γ T par FoxP3. Adapté de Noack *et al.*, 2014.

Dans de nombreuses maladies auto-immunes, cette balance entre Th17 et T régulateurs est déséquilibrée en faveur des cellules Th17 et favorise donc la poursuite de l'inflammation et du développement des maladies auto-immunes aux dépens de la tolérance. Ce déséquilibre de la balance entre Treg et Th17 a notamment été retrouvé dans les scléroses multiples, les MICI, la polyarthrite rhumatoïde,...

IV. Une molécule régulatrice : l'Interleukine 10

A. La famille de cytokines de l'IL-10

La famille de cytokines de l'IL-10 est actuellement constituée de neuf membres : l'IL-10, l'IL-19, l'IL-20, l'IL-24, l'IL-22, l'IL-26, l'IL-28A, l'IL-28B et l'IL-29. Ces différentes cytokines présentent entre 9 et 40% de similarité dans leur identité, ce qui est relativement faible.

Cette famille peut être séparée en quatre sous-groupes :

- l'IL-10,
- l'IL-20 (IL-19, IL-20, IL-24) (Sa *et al.*, 2007),
- l'IL-22 et l'IL-26,
- les Interférons de type III, IFN λ s (IL-28A, IL-28B et IL-29) (Fox *et al.*, 2009).

La famille de cytokines IL-10 peut être classée en sous groupes de différentes manières en fonction de leur structure, de la localisation de leurs gènes, de leur utilisation de récepteurs et des fonctions biologiques qu'elles exercent en aval.

Nom	Localisation chromosomique	Structure	Récepteurs		Source cellulaire principale	Cellules cibles	Fonction clé
			Chaîne α	Chaîne β			
IL-10	1q32	Dimère	IL-10R1	IL-10R2	Leucocytes	Leucocytes	Répression du système immunitaire
IL-19		Monomère	IL-20R1	IL-10R2	Cellules myéloïdes Cellules épithéliales	Cellules épithéliales	Réponse antibactérienne, remodelage tissulaire, cicatrisation
IL-20			IL-20R1 / IL-22R				
IL-24			\emptyset	\emptyset	Cellules myéloïdes, Cellules épithéliales, Cellules polarisées Th2		
IL-22	12q16	Dimère ?	IL-22R	IL-10R2	Cellules T, Cellules NK, Cellules NKT, Cellules LTi	Cellules épithéliales	Réponse antivirale
IL-26			IL-20R1				
IL-28A	19q13	Monomère	IL-28R	IL-10R2	Leucocytes, Cellules épithéliales	Cellules épithéliales, Leucocytes ?	Réponse antivirale
IL-28B							
IL-29							

Table 9 : La famille de Cytokines IL-10, Adapté de Ouyang *et al.*, 2011.

L'Interleukin-10 a été identifiée en 1989 par l'équipe de Mosmann dans les lymphocytes T polarisés Th2 (Fiorentino *et al.*, 1989) et a été initialement nommée CSIF pour Cytokine Synthesis Inhibitory Factor (Facteur inhibiteur de la synthèse de cytokines). L'IL-10 est une cytokine pléiotropique possédant d'importantes fonctions immuno-régulatrices dont l'action influence les activités de nombreux types cellulaires du système immunitaire. Cette cytokine présente également de puissantes propriétés anti-inflammatoires.

B. Récepteur à l'IL-10 et signalisation

Une fois sécrétée, l'IL-10 va interagir avec son complexe de récepteurs spécifiques composé d'un hétéro-dimère composé de l'IL-10R1 (Ho *et al.*, 1993) et de l'IL-10R2 (Liu *et al.*, 1994).

L'IL-10R1 est un récepteur de haute affinité principalement retrouvé sur les cellules immunitaires. Son expression est faible, variant généralement entre 100 et 800 molécules par cellule mais peut être modulée (Carson *et al.*, 1995 ; Jurlander *et al.*, 1997). Les monocytes et les macrophages sont les cellules qui présentent la plus forte expression de ce récepteur (Kunz *et al.*, 2006).

Contrairement à l'IL-10R1, l'IL-10R2 est un récepteur de faible affinité, largement et fortement exprimé dans la plupart des cellules et des tissus (Wolk *et al.*, 2008). Cela peut notamment s'expliquer par le fait que l'IL-10R2 appartient à d'autres complexes de récepteurs pour d'autres ligands tels que l'IL-22 (Xie *et al.*, 2000), l'IL-26 (Sheikh *et al.*, 2004), l'IL-28 et l'IL-29 (Sheppard *et al.*, 2003) (voir table 9). C'est donc l'expression de l'IL-10R1 qui va déterminer quelles cellules présenteront une sensibilité à l'IL-10.

La signalisation de l'IL-10, schématisée dans la figure 14, commence lors de la liaison de l'IL-10 à son récepteur. Cette liaison se déroule en deux étapes. L'IL-10 se lie d'abord au récepteur IL-10R1. Cette interaction IL-10 / IL-10R1 va entraîner un changement de conformation de la cytokine qui permettra alors la liaison du complexe IL-10 / IL-10R1 avec le récepteur IL-10R2 (Reineke *et al.*, 1999 ; Wolk *et al.*, 2005 ; Yoon *et al.*, 2006).

La liaison de l'IL-10 sur son complexe de récepteurs active les tyrosines kinases de la famille janus, Jak1 (associée à IL-10R1) et Tyk2 (associée à IL-10R2) afin de phosphoryler le domaine intra-cytoplasmique des récepteurs. Cette phosphorylation induit le recrutement et la phosphorylation du facteur de transcription STAT3 au niveau de l'IL-10R1 (Finbloom *et al.*, 1995). Les facteurs STAT3 ainsi phosphorylés forment des homodimères et transloquent au noyau où ils se fixent sur des éléments de haute affinité appelés SBE (STAT-Binding Element) situés dans les promoteurs des gènes réponse à l'IL-10. L'un de ces gènes est le gène codant l'IL-10 lui-même, qui est alors positivement régulé par STAT3 (Ito *et al.*, 1999).

Les formes constitutivement actives de STAT3 induisent l'expression de gènes codant des molécules anti-apoptotiques et impliquées dans la progression du cycle cellulaire telles que BCLXL, les cyclines-D1, -D2, -D3 et -A, Pim-1, c-Myc et p19 (INK4D) (Donnelly *et al.*, 1999).

D'autres voies de signalisation peuvent être activées par l'IL-10, notamment celles impliquant PI3K (Phosphoinositide-3 Kinase) et ses substrats en aval p70S6K (p70 S6 kinase) et Akt/PKB (Protéine Kinase B) (Crawley *et al.*, 1996). L'IL-10 interfère aussi avec la potentielle activation de la voie de signalisation des p38 MAPKs et bloque l'induction de l'expression des gènes dépendants de cette voie.

L'IL-10 va notamment induire l'expression de SOCS3 (Suppressor of Cytokines Signalling) via STAT3 qui contrôle la qualité et la quantité de l'activation des STAT (Piessevaux *et al.*, 2008).

SOCS3 est induit par l'IL-10 et exerce ses effets régulateurs négatifs sur de nombreux gènes codant des cytokines mais inhibe également la signalisation intracellulaire via le ciblage de certains récepteurs vers la voie de dégradation protéosomale. SOCS3 inhibe également l'activité Janus Kinase (Jak/STAT) entraînant la fin des effets de l'IL-10 (Ito *et al.*, 1999). L'IL-10

est donc capable d'autoréguler sa propre expression. Cette induction de SOCS3 confère à l'IL-10 la capacité d'inhiber l'expression de nombreux gènes dont le TNF- α et l'IL-1 β .

STAT3 et SOCS3 peuvent être activés par des stimuli inflammatoires comme le LPS ou le TNF et de plus, SOCS3 peut être induit par des mécanismes indépendants de STAT3 (Carow *et al.*, 2014). De plus, le LPS et l'IL-10 peuvent agir en synergie afin de prolonger la stabilité de l'ARNm de SOCS3 et donc de créer un stock rapidement activable en l'absence de nouvelle transcription de gènes. Ce stock prolonge l'action négative de SOCS3 (Meisel *et al.*, 1996).

L'IL-10 est également un inducteur puissant de HO-1 (Heme Oxygénase – 1) qui est impliqué dans de nombreux processus de détoxification cellulaire via notamment le contrôle du stress oxydatif (Goven *et al.*, 2009).

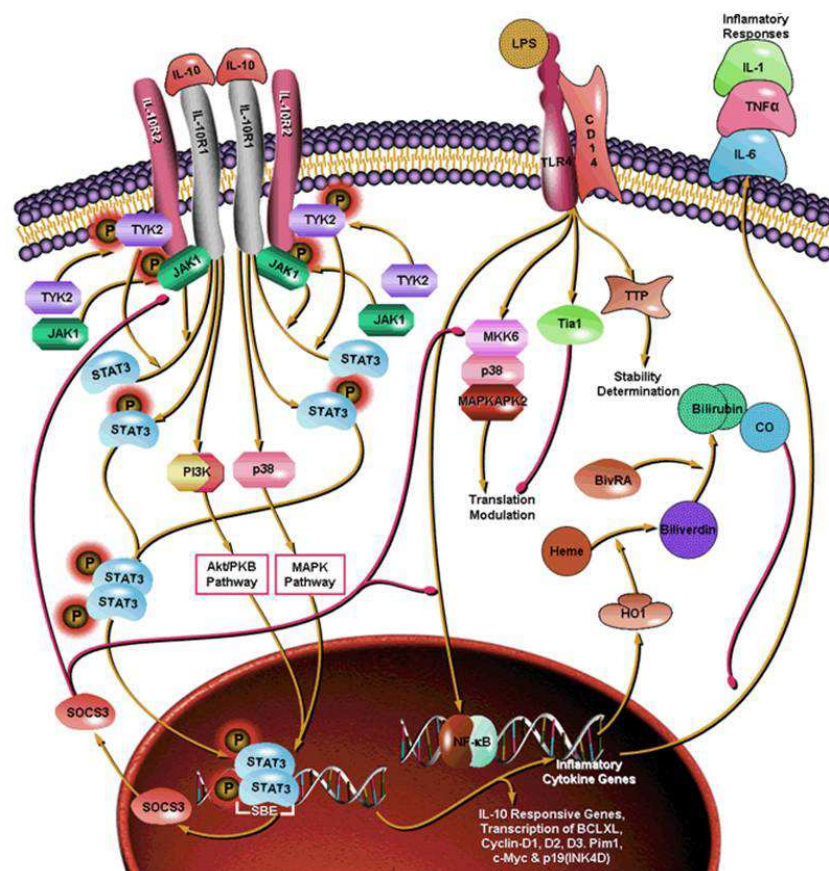


Figure 14 : Voie de signalisation de l'IL-10.

La liaison de l'IL-10 sur son complexe de récepteurs active les tyrosines kinases, Jak1 et Tyk2, conduisant au recrutement et à l'activation par phosphorylation de STAT3. STAT3 phosphorylé forme des homodimères qui transloquent au noyau où ils fixent des éléments de haute affinité appelés SBE situés dans les promoteurs des gènes de réponse à l'IL-10. Les gènes induits codent notamment des molécules anti-apoptotiques et impliquées dans la progression du cycle cellulaire telles que BCLXL, les cyclines-D1, -D2, -D3 et -A, Pim-1, c-Myc et p19 (INK4D). L'IL-10 active aussi les voies PI3K et Akt/PKB. L'IL-10 interfère également avec l'activation de la voie de signalisation des p38 MAPKs et bloque l'induction de l'expression des gènes dépendants de cette voie. L'IL-10 va notamment induire l'expression de SOCS3 qui exerce alors ses effets régulateurs négatifs sur de nombreux gènes codant des cytokines mais également l'activité Janus Kinase (Jak/STAT) entraînant la fin des effets de l'IL-10. L'IL-10 est aussi un inducteur puissant de HO-1 qui est impliqué dans de nombreux processus de détoxification cellulaire via notamment le contrôle du stress oxydatif. Adapté de Qiagen (<http://www.sabiosciences.com/pathway.php?sn=IL-10>).

C. Production et Régulation de l'IL-10

Les principales sources d'IL-10 sont les monocytes, les macrophages et les lymphocytes T auxiliaires.

De plus, l'IL-10 peut être produite par un large panel de cellules appartenant au système immunitaire inné et adaptatif comme les cellules dendritiques, les macrophages, les cellules mastocytaires, les cellules NK, les éosinophiles, les neutrophiles, les lymphocytes T $\gamma\delta$, les lymphocytes T CD4+ et CD8+, les lymphocytes B et les cellules épithéliales (Moore *et al.*, 2001).

Le type de cellules responsables de la présence d'IL-10 dans une situation définie va dépendre du type de stimulus, du type de tissu affecté et du moment précis du processus immunitaire.

1. Production de l'IL-10 par les cellules du système immunitaire inné

La production de l'IL-10 par les cellules de l'immunité innée est fortement dépendante de l'activation de certains récepteurs spécifiques appelés PRR qui incluent notamment les récepteurs TLRs. L'activation du TLR2 induit fortement l'expression de l'IL-10 dans les cellules présentatrices d'antigène (Agrawal *et al.*, 2003). D'autres TLRs, cependant, peuvent être impliqués dans cette production comme les TLR4, -9 (Higgins *et al.*, 2003), et -3 (qui lui n'entraînera la production d'IL-10 que dans les macrophages) (Boonstra *et al.*, 2006).

Des signaux dépendants des lectines de type C peuvent aussi être impliqués dans cette expression, par exemple DC-Sign (Geijtenbeek *et al.*, 2003) ou la dectin-1 (Rogers *et al.*, 2005). De plus, l'activation du CD40 va stimuler la production d'IL-10 dans les cellules dendritiques qui auront été préalablement stimulées via le TLR (Edwards *et al.*, 2002) ou la Dectin-1 (Rogers *et al.*, 2005).

La production de l'IL-10 suite à la stimulation par le TLR va être variable en fonction du type cellulaire. Dans les macrophages, elle va induire une forte production d'IL-10 tandis que dans les cellules dendritiques myéloïdes cette production sera faible. Par contre, dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes, la stimulation via les TLRs n'induirait pas de production d'IL-10 (Boonstra *et al.*, 2006).

Les voies de signalisation du TLR impliquées dans la production d'IL-10 incluent MYD88 et TRIF qui vont permettre l'activation des MAP-Kinases et de NF- κ B. La principale MAP-Kinase impliquée est la kinase ERK et son niveau d'activation est positivement corrélé à la production d'IL-10 (Chang *et al.*, 2007).

L'activation des neutrophiles en réponse à une stimulation du TLR et de lectines de type C, notamment lors d'infections pulmonaires à mycobactérie, induit la production d'IL-10 par ces cellules (Zhang *et al.*, 2009).

Outre l'activation via les TLRs, les monocytes et les macrophages sécrètent de l'IL-10 lors de la clairance des cellules apoptotiques dans un processus dépendant de CD36 (scavenger receptor) et des p38 MAPKs (Chung *et al.*, 2007).

Bien que l'IL-10 soit capable d'induire sa propre expression dans les monocytes par la voie de STAT3, elle est également capable de réguler négativement cette expression via l'induction de DUSP1 (Dual specificity phosphatase 1) qui régule négativement la phosphorylation des p38 MAPKs et donc réduit la production d'IL-10 (Hammer *et al.*, 2005). De plus, l'IFN- γ réduit cette production dans les macrophages et les cellules dendritiques et l'IL-27 atténue l'expression de l'IL-10 induit par les TLRs dans les monocytes.

La production de l'IL-10 par les cellules dendritiques matures ou semi-matures permet d'entretenir un environnement tolérogène permettant ainsi la limitation des réponses immunitaires (Steinman *et al.*, 2003).

2. Production de l'IL-10 par les cellules du système immunitaire adaptatif

Les populations Th1, Th2 et Th17 sont dépendantes pour leur développement des facteurs dérivés des cellules dendritiques et des macrophages. Or, l'expression de ces facteurs est réduite par l'IL-10. Cependant, ces sous populations de lymphocytes peuvent toutes, dans certaines conditions, produire de l'IL-10 ce qui indique une boucle de rétrocontrôle négatif qui empêche les réponses exacerbées des lymphocytes T effecteurs dans des conditions d'inflammation.

L'IL-10 peut pratiquement être produite par toutes les sous populations de cellules T incluant Th1, Th2, Th17 et Treg mais en fonction des stimuli, les facteurs de transcription impliqués dans l'expression de l'IL-10 vont varier.

La liste des facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'expression de l'IL-10 est vaste reflétant le degré de précision et de complexité que l'expression de cette cytokine demande. La contribution exacte de ces divers facteurs de transcription est mal connue et ces derniers peuvent être soit spécifiques, soit dépendre du type de stimulus qui induit l'expression de l'IL-10.

Cependant, malgré la variété de facteurs de transcription impliqués dans l'induction de l'IL-10, un élément commun est retrouvé dans les différentes sous populations de lymphocytes. Il s'agit des kinases ERK1/2. Dans les lymphocytes T, la force de la signalisation à travers le TCR est proportionnelle à l'activation de ERK1/2 et donc de l'expression de l'IL-10 (Saraiva *et al.*, 2009).

Un autre facteur peut intervenir dans cette production : le facteur de transcription c-Maf. En effet, la sécrétion de l'IL-10 est corrélée avec l'expression de c-Maf. c-Maf induit directement l'expression de l'IL-10 en se fixant à un motif MARE (Maf recognition element) dans le promoteur de l'IL-10 (Xu *et al.*, 2009).

Les lymphocytes polarisés Th1 nécessitent une forte activation et la présence d'IL-12 pour co-exprimer l'IFN γ et l'IL-10 (Chang *et al.*, 2007). Cette co-expression peut être induite notamment via la fixation par le récepteur Notch à son ligand (Delta like 4 ou Dll-4). Ce récepteur agit

notamment en synergie avec l'IL-27 et l'IL-12 afin de potentialiser la production de l'IL-10 dans les cellules Th1 (Rutz *et al.*, 2008). L'expression de l'IL-10 nécessite notamment le facteur de transcription STAT4 (Saraiva *et al.*, 2009).

L'IL-10 a initialement été identifiée dans **les lymphocytes polarisés Th2** (Fiorentino *et al.*, 1989). L'expression de l'IL-10 par ces cellules est relativement stable et nécessite la voie de signalisation et les facteurs de transcription impliqués dans la polarisation Th2 tels que l'IL-4, STAT6 et GATA-3 (Zhu *et al.*, 2004 ; Shoemaker *et al.*, 2006).

Les lymphocytes polarisés Th17 nécessitent, comme nous l'avons vu précédemment, le TGF- β et l'IL-6 pour leur différenciation. Cependant, ces mêmes cytokines sont capables d'induire la production d'IL-10 dans ces cellules. Par contre, l'IL-23 qui est impliquée dans la maintenance de la lignée Th17 va, quant à elle, inhiber l'expression de l'IL-10 (McGeachy *et al.*, 2007). L'IL-10 peut également être produite par l'action combinée de l'IL-27 et de l'IL-6 (Stumhofer *et al.*, 2007). Alors que l'IL-27 seule, via l'activation de STAT3, est aussi capable d'induire la production d'IL-10, elle va, par contre, supprimer l'expression de l'IL-17 (Murugaiyan *et al.*, 2009). Dans la lignée Th17, la liaison du récepteur Notch et de son ligand favorise également l'expression de l'IL-10 mais à un niveau plus faible que celui observé dans les lymphocytes Th1. Les lymphocytes Th17 expriment des récepteurs à l'IL-10 et donc l'IL-10 peut agir directement sur ces cellules (Huber *et al.*, 2011). La production d'IL-10 par les cellules Th17 pourrait affiner les réponses Th17 pour cibler les pathogènes spécifiques. Le manque de sécrétion d'IL-10 par les cellules Th17 est associé à des conditions auto-inflammatoires soulignant l'importance de l'IL-10 dérivée des cellules T effectrices dans la régulation immunitaire (Ng *et al.*, 2013).

L'expression de l'IL-10 dans les cellules Th1, Th2 et Th17 va nécessiter les mêmes signaux mis en jeu dans chacun des programmes de différenciation.

Les lymphocytes T régulateurs se développent dépendamment du TGF- β , de l'acide tout-*trans* rétinolique (all-*trans* retinoid acid) et de la signalisation par le TCR (Littman *et al.*, 2010). Le TGF- β induit l'expression de Foxp3 et de l'IL-10 alors que l'acide tout-*trans* rétinolique va favoriser Foxp3 et inhiber la production d'IL-10 (Maynard *et al.*, 2009). L'IL-10 participe à la différenciation des lymphocytes T régulateurs sécrétant de l'IL-10 et assure ainsi un rétrocontrôle positif sur son induction. D'autres cytokines sont également capables d'induire l'expression de l'IL-10 dans les lymphocytes T régulateurs et, notamment, l'IL-2 (Barthlott *et al.*, 2005). La sécrétion d'IL-10 par les lymphocytes T régulateurs Foxp3⁺ apparaît comme particulièrement importante dans la régulation des réponses immunitaires aux interfaces corps / environnement.

Les lymphocytes T CD4⁺ Tr1 (Foxp3⁻) sont aussi capables de produire de l'IL-10 (Groux *et al.*, 1997). Ces cellules sont caractérisées par une faible prolifération, une rapide synthèse sélective de l'IL-10 et une capacité à supprimer la fonction des APC aussi bien que les cellules T effectrices antigène spécifiques via un mécanisme dépendant des cytokines. Les cellules T naïves en présence d'IL-27 va induire le facteur de transcription AhR (Apetoh *et al.*, 2010). Le

facteur Ahr se lie au facteur c-Maf et en synergie avec celui-ci, active les promoteurs des gènes IL-10 et IL-21 ainsi que la génération de cellules Tr1 (Gandhi *et al.*, 2010). L'IL-21 va augmenter l'expression de c-Maf et induire l'expression de l'IL-10 (Pot *et al.*, 2009). Ces cellules Tr1 peuvent aussi se différencier en cellules Th1.

D'autres cellules appartenant au système immunitaire adaptatif sont également capables de produire de l'IL-10. Par exemple, **les lymphocytes T CD8+** (cytotoxiques) expriment de l'IL-10 après la stimulation du TCR ou l'interaction avec le ligand CD40 exprimé par les cellules dendritiques plasmacytoïdes activées et cette production d'IL-10 peut être stimulée par l'IL-21 (Gilliet *et al.*, 2002). La stimulation des **cellules B** avec les auto-antigènes, les ligands TLR4 et TLR9 ou la vitamine D3 entraîne aussi la production d'IL-10 (Fillatreau *et al.*, 2002 ; Sun *et al.*, 2005 ; Heine *et al.*, 2008).

La production de l'IL-10 par les cellules immunitaires peut donc être induite par différents facteurs. Cependant, les mécanismes définissant la balance entre les rétrocontrôles positifs et négatifs de l'IL-10 sur sa propre production sont encore mal compris.

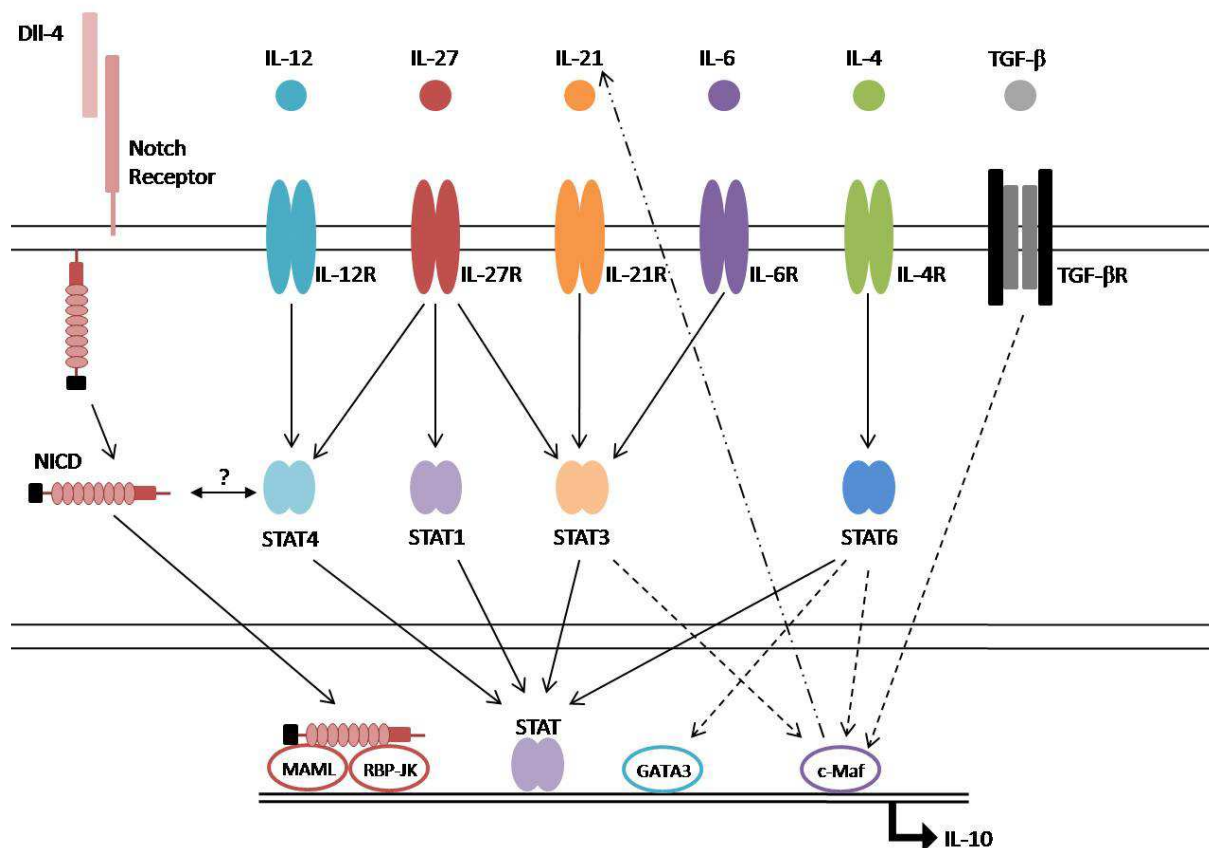


Figure 15 : Régulation de l'IL-10 dans les cellules T.

L'expression de l'IL-10 est contrôlée par différents facteurs de transcription. STAT3 et Notch sont impliqués dans la régulation de cette cytokine. L'activation de STAT3 par l'IL-27, seul ou en combinaison avec l'IL-6, ou par le TGF- β + l'IL-6, favorise la production de l'IL-10. La stimulation de Notch par le DII-4 induit la production de l'IL-10 dans les cellules Th1 en synergie avec STAT4. D'autres facteurs tels que c-Maf et GATA3 contrôlent l'expression de l'IL-10. (DII-4, Delta-like-4; MAML, Mastermind-like; NICD, Notch intracellular domain; RBP-J κ , recombining binding protein suppressor of hairless.). Adapté de Ouyang *et al.*, 2011.

En dehors des cellules du système immunitaire, il a été montré que les cellules épithéliales, et notamment les cellules épithéliales bronchiques, produisent de manière constitutive de l'IL-10 (Bonfield *et al.*, 1995). Cette production est réduite dans les poumons de patients présentant une mucoviscidose et infectés de manière chronique. Dans le poumon normal, cette production constitutive par les cellules épithéliales bronchiques doit moduler la réponse inflammatoire aux irritants environnementaux en supprimant l'activité des macrophages, la présentation d'antigènes et en retardant l'accumulation de neutrophiles (Bonfield *et al.*, 1995).

D. Action de l'IL-10

Les monocytes et macrophages sont les principales cibles des effets inhibiteurs de l'IL-10. L'IL-10 va influencer trois fonctions importantes des monocytes, des macrophages et des cellules dendritiques :

- la présentation d'antigène,
- la libération de médiateurs immunitaires,
- la phagocytose.

L'IL-10 inhibe la présentation d'antigène par les monocytes et les macrophages en réduisant l'expression du CMH de classe II à la fois de ceux exprimés de manière constitutive et de ceux dont l'expression est induite par l'IFN- γ (de Waal Malefyt *et al.*, 1991a). L'IL-10 réduit également l'expression des molécules de co-stimulation (CD86) et d'adhésion (CD54) et inhibe la synthèse, par exemple, de l'IL-12 ou de l'IL-23 bloquant ainsi le développement et la maintenance des populations Th1 et Th17 respectivement. (Willems *et al.*, 1994 ; D'Andrea *et al.*, 1993 ; Schuetze *et al.*, 2005).

D'un autre côté, l'IL-10 stimule les fonctions inhibitrices, de tolérance et éboueurs (scavenger) de ces monocytes et des macrophages.

L'IL-10 va induire la phagocytose des monocytes et des macrophages en augmentant l'expression de divers récepteurs responsables de l'absorption des micro-organismes mais va cependant inhiber la destruction de ces micro-organismes (Buchwald *et al.*, 1999 ; Roilides *et al.*, 1998).

Dit simplement, l'IL-10 va supprimer toutes les fonctions des monocytes et macrophages qui sont responsables d'un rôle positif de ces cellules, à la fois dans l'immunité innée et adaptative.

En effet, les effets immunosuppresseurs de l'IL-10 sur les cellules présentatrices d'antigène sont responsables de l'inhibition de l'immunité Th1, Th2 et Th17.

L'IL-10 peut cependant réduire elle-même la différenciation Th1 en générant un déficit en IFN- γ et en entraînant ainsi une « désactivation » des cellules présentatrices d'antigène (Del Prete *et al.*, 1993).

L'IL-10 inhibe la libération de cytokines pro-inflammatoires telles que les TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-8, le G-CSF et le GM-CSF par les monocytes et les macrophages activés par le LPS ou l'IFN γ

(de Waal Malefyt *et al.*, 1991b ; Fiorentino *et al.*, 1991). L'IL-10 va également permettre la libération de médiateurs anti-inflammatoires tels que l'antagoniste IL-1R et les récepteurs TNF- α solubles (Jenkins *et al.*, 1994 ; Hart *et al.*, 1996).

IL-10 dérivée des macrophages peut inhiber la différenciation des cellules avoisinantes en macrophages activés classiques ce qui permet une auto-régulation des populations macrophagiques (Vicioso *et al.*, 1998).

L'IL-10 influence également d'autres types cellulaires. Sur les neutrophiles, l'IL-10 inhibe la libération de médiateurs pro-inflammatoires tels que le TNF- α et l'IL-1 β induits par le LPS ou la phagocytose de bactéries (Rubtsov *et al.* 2008). L'IL-10 va également inhiber la sécrétion de chimiokines impliquées dans le recrutement de neutrophiles (Kasama *et al.*, 1994). Dans les lymphocytes B, l'IL-10 va inhiber l'apoptose, induire leur prolifération et leur différenciation ainsi que l'expression du CMH de classe II (Burdin *et al.*, 1997 ; Levy *et al.*, 1994 ; Rousset *et al.*, 1995). Dans les cellules NK, l'IL-10 stimule l'activité cytotoxique (Carson *et al.*, 1995).

E. Rôle de l'IL-10 et réponses immunitaires

L'IL-10 est une cytokine à action tardive qui va plutôt agir après les médiateurs pro-inflammatoires. De par son rôle dans l'immunorégulation, l'IL-10 est importante dans la résolution d'états inflammatoires causés par diverses maladies et infections.

La dérégulation de la production d'IL-10 a un impact conséquent sur le développement et les conséquences de certaines pathologies.

En effet, la surproduction de l'IL-10 va entraîner des effets immunosuppresseurs non désirés. Cette surproduction est délétère notamment dans le cas du lupus érythémateux (Gröndal *et al.*, 1999), des lymphomes associés au virus Epstein Barr (Stewart *et al.*, 1994), des mélanomes (Yue *et al.*, 1997), lors d'infections (Salhi *et al.*, 2008) et peut causer une paralysie immunitaire dans certains contextes médicaux (Steinhauser *et al.*, 1999).

Le déficit en IL-10, quant à lui, va causer une activation immunitaire persistante qui est alors délétère dans la maladie de Crohn (Murai *et al.*, 2009), le psoriasis (Asadullah *et al.*, 1998), la polyarthrite rhumatoïde (Katsikis *et al.*, 1994) et à la suite de transplantations d'organes (DeBruyne *et al.*, 1998). En absence d'IL-10, on peut observer une meilleure clairance de certains pathogènes (Brooks *et al.*, 2006). Pour d'autres pathogènes, cette absence conduit au développement d'une pathologie immune qui sera délétère pour l'hôte (Li *et al.*, 1999). L'absence d'IL-10 n'est donc pas toujours compensée par d'autres mécanismes régulateurs suggérant que l'IL-10 n'a aucun rôle redondant dans la limitation des réponses inflammatoires *in vivo*.

1. Rôle de l'IL-10 dans la défense de l'hôte

Lors d'une infection, l'IL-10 empêche les dommages tissulaires causés par cette infection et par l'inflammation qui en découle. Pour cela, elle régule et réprime l'expression de cytokines pro-inflammatoires pendant la phase de convalescence des infections et donc réduit les dommages

tissulaires causés par ces cytokines et par les réponses adaptatives exacerbées dans ce contexte. En effet, la sécrétion de l'IL-10 par les cellules Th1 (activées spécifiquement dans le contexte des infections virales et bactériennes) représente une boucle d'autorégulation puissante limitant ainsi l'inflammation excessive et la destruction tissulaire lors des réponses Th1. L'IL-10 est une cytokine répressive générale et joue un rôle central dans la résolution de l'inflammation.

Dans le cadre d'une infection par *Toxoplasma Gondii*, les cellules Th1 produisant de l'IL-10 sont capables de stimuler les macrophages infectés dans la libération d'oxyde nitrique et la médiation de la destruction intracellulaire du parasite tout en bloquant la libération de l'IL-12. L'IL-10 est connue pour inhiber l'activité microbicide mais lorsqu'il y a sécrétion simultanée d'IFN- γ , il y a reprogrammation de nombreuses fonctions suppressives de l'IL-10. Par exemple, la suppression de l'IL-12 par les lymphocytes Th1 IL-10+ va limiter la différenciation Th1 supplémentaire agissant comme un frein dans le développement de l'immunopathologie. Cependant, les cellules Th1 (tout comme les cellules Th17) produisant de l'IL-10 ne représentent pas une population stable de lymphocytes T CD4+. L'expression de l'IL-10 est une propriété inductible et transitoire de ces cellules, alors que dans les cellules Th2, cette propriété est stable (Jankovic *et al.*, 2010).

Cependant, l'augmentation de l'expression de l'IL-10 a été associée à de nombreuses infections virales et bactériennes chroniques. Des pathogènes ont, de manière évolutive, exploité les fonctions de l'IL-10 pour réprimer les réponses inflammatoires normales de l'hôte pendant les infections et établir des états infectieux chroniques. Quelques virus, dont le virus d'Epstein Barr, le virus Herpes équin de type 2, le virus Orf et le cytomégalovirus peuvent produire leur propre version de l'IL-10 (appelée v-IL-10) afin de supprimer directement les réponses immunes de l'hôte (Moore *et al.*, 2001). De plus, l'induction de l'IL-10 dans les cellules dendritiques et les macrophages représente un puissant mécanisme d'évasion immunitaire utilisé par de nombreux pathogènes (Moore *et al.*, 1990).

2. Rôle de l'IL-10 dans les maladies autoimmunes et inflammatoires

L'IL-10 est associée à de nombreuses maladies autoimmunes et inflammatoires en raison de ses fonctions anti-inflammatoires.

a) *L'IL-10 dans la Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive*

Lors d'une inflammation pulmonaire, comme celle que l'on peut retrouver dans la pathologie de la BPCO, l'IL-10 peut influencer sur cette inflammation de différentes manières. En effet, comme nous l'avons dit, l'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire puissante. Elle est capable d'inhiber la production de cytokines par les monocytes telles que l'IL-6, l'IL-12, l'IL-18 ou le TNF- α et de limiter la libération par les neutrophiles de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-8 et l'IP-10. De plus, l'IL-10 pourrait mitiger l'inflammation pulmonaire en induisant l'apoptose des neutrophiles (Cox G., 1996). L'IL-10 agit également en protégeant le poumon du remodelage tissulaire, en réduisant l'expression de MMP-9 et en augmentant l'expression de TIMP-1 chez les fumeurs (Lim *et al.*, 2000). Cette production par les monocytes de l'IL-10 retrouvée dans le poumon peut être induite par l' α 1-antitrypsine.

Comme nous l'avons énoncé précédemment, le déficit en α 1-antitrypsine représente un facteur de risque génétique pour la BPCO. Les maladies monogénétiques rares, telles que le déficit pour cette enzyme, sont souvent caractérisées par une variabilité phénotypique marquée et des polymorphismes dans des gènes additionnels qui pourraient contribuer à cette variabilité. Parmi les gènes additionnels pouvant présenter des polymorphismes, le gène codant l'IL-10 présente des SNP qui peuvent être associés de manière cohérente et significative à un déficit en α 1-antitrypsine chez certains patient BPCO (Demeo *et al.*, 2008).

Ces polymorphismes, détectés notamment dans le promoteur du gène codant l'IL-10, entraînent des niveaux de production d'IL-10 altérés. Il a notamment été observé une plus faible quantité d'IL-10 dans les crachats de patients BPCO en comparaison des sujets non fumeurs contrôle (Takanashi *et al.*, 1999).

L'altération dans la production de cette cytokine conduit, entre autres, à une augmentation de la MMP-9 qui dégrade le collagène de type IV et à un déséquilibre entre les métalloprotéases et les inhibiteurs tels que TIMP-1 (Lim *et al.*, 2000).

Donc, des niveaux altérés d'IL-10 dus aux variations polymorphiques dans le gène contribuent à la BPCO chez les sujets déficients pour l'AAT. Cela entraîne un déséquilibre combiné entre protéases et anti-protéases.

De plus, et de manière intéressante, il a été montré que ces polymorphismes dans le gène codant l'IL-10 associés à un déficit en α 1-antitrypsine pouvaient être corrélés, chez ces patients, avec une augmentation du risque de développer une maladie de Crohn ou une colite ulcéreuse (Ekbohm *et al.*, 2008).

b) L'IL-10 dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

La surface de la muqueuse intestinale est exposée à de fortes concentrations d'antigènes dérivés de l'alimentation et des micro-organismes, conduisant à une stimulation constante du système immunitaire intestinal. Dans la muqueuse intestinale, la famille de cytokine de l'IL-10 exerce des fonctions importantes en régulant les états homéostatiques du système immunitaire et de l'épithélium de la muqueuse ainsi qu'en stimulant les défenses de l'hôte pendant l'invasion de nombreux micro-organismes (Braat *et al.*, 2003).

Au cours des MICI, l'IL-10 est considéré comme un gène de susceptibilité à la maladie. Un nombre de polymorphismes (principalement des SNPs) ont été identifiés dans le promoteur de l'IL-10 (Franke *et al.*, 2008). Certains de ces SNPs sont associés avec une expression différentielle de l'IL-10 *in vitro*.

Lors d'un déficit en IL-10, notamment lors de l'utilisation de souris KO pour cette cytokine, les animaux développent de manière spontanée des entérocolites chroniques touchant l'ensemble du tractus gastro-intestinal (caractérisées par une inflammation de la muqueuse, une augmentation du taux d'IgA produites par les cellules plasmiques et une expression du CMH de classe II au niveau de l'épithélium du colon alors que les souris WT ne l'expriment pas) et présentent au niveau de l'intestin une architecture mucosale anormale ainsi qu'une infiltration importante de nombreuses sous populations de leucocytes (Kühn *et al.*, 1993).

Dans des conditions normales, l'activation des macrophages est probablement étroitement contrôlée par l'IL-10 produite par les lymphocytes T et peut-être par les cellules épithéliales intestinales. L'activation est non contrôlée chez les IL-10^{-/-} entraînant une augmentation de la stimulation des cellules Th1, des NK menant à une surproduction d'IFN- γ et d'autres cytokines. L'IFN- γ va induire l'expression du CMH de classe II sur les cellules épithéliales (Kühn *et al.*, 1993).

Or, en inhibant directement la production d'IL-12 (cytokine clé dans la polarisation Th1) par les cellules dendritiques et les macrophages, l'IL-10 est capable de limiter la différenciation Th1 et ainsi la poursuite de l'inflammation (D'Andrea *et al.*, 1993). De plus, l'IL-10 est également capable d'inhiber la production d'IL-23 qui est impliquée dans la maintenance de la polarisation des cellules Th17, lignée qui est fortement présente au cours des maladies inflammatoires de l'intestin (Schuetze *et al.*, 2005). Dans ce contexte, l'IL-10 est notamment produite par les cellules Th1.

Puisque l'IL-10 est un suppresseur puissant de la synthèse de cytokines par les macrophages, les cellules NK et les lymphocytes T, le défaut primaire des souris déficientes en IL-10 pourrait être un échec dans le contrôle des réponses immunitaires normales contre les antigènes entériques, conduisant à une inflammation chronique via une surproduction continue de cytokines telles que le TNF- α , l'IL-1 β , ou l'IFN γ . Dans un second temps, l'expression accrue du CMH de classe II au niveau des cellules épithéliales, la présentation d'antigènes et les lésions épithéliales mènent à une exposition massive des cellules lymphoïdes dans la muqueuse aux antigènes de la lumière et aux composants des parois bactériennes renforçant ainsi le processus inflammatoire. Ainsi la pathologie des souris déficientes en IL-10 est probablement due à une production chronique de cytokines (Kühn *et al.*, 1993).

Lorsque les souris déficientes en IL-10 sont hébergées en condition exempte d'organismes pathogènes spécifiques, on observe moins de symptômes. Ce qui permet de suggérer que la réponse inflammatoire est stimulée par le microbiote intestinal dont la composition déterminera la sévérité de la maladie. En effet, l'IL-10 permet, au niveau de la muqueuse intestinale, de maintenir un environnement tolérogène qui permettra aux cellules immunitaires d'éliminer spécifiquement les bactéries pathogènes sans altérer la composition du microbiote intestinal et son quota de bactéries bénéfiques pour l'organisme et participant à la défense de l'hôte (Kühn *et al.*, 1993).

V. Le Microbiome

A. Définition

Le terme "microbiome" (du grec micro = petit et bios = vie) a été introduit par Joshua Lederberg pour intégrer la notion d'une communauté écologique comprenant symbiotes, commensaux et pathogènes partageant notre espace corporel, dans le but de reconnaître leurs fonctions de déterminants de la santé et de la maladie (Lederberg *et al.*, 2001).

Le microbiome est défini par l'ensemble des microbiotes qui réside chez l'humain ou à sa surface cutanée. Le microbiote est quant à lui défini par l'ensemble des micro-organismes résidant dans un site particulier par exemple, au niveau du tractus gastro-intestinal, de la peau ou des voies respiratoires. Ces micro-organismes sont divers et peuvent être des bactéries, des virus ou des champignons. Les micro-organismes les plus étudiés actuellement dans le microbiome sont les bactéries. Au niveau du corps humain, le nombre de bactéries surpasse le nombre de cellules par un facteur 10. La plupart de ces bactéries sont retrouvées au niveau du tractus gastro-intestinal mais les autres sites de colonisation fréquents sont le nez, la bouche et la peau comme montré dans la figure 16. Malgré leur abondance, le rôle fonctionnel de ces bactéries est méconnu dans la plupart des organes humains.

Le concept de microbiome embrasse les notions de communauté microbienne, de biodiversité microbienne (en nombre d'individus, les microbes sont les organismes les plus nombreux sur terre), d'écologie microbienne et d'interactions durables et fonctionnelles entre micro-organismes et avec l'organisme (allant du simple commensalisme jusqu'à la symbiose). Par extension, le microbiome peut aussi désigner la somme des génomes des micro-organismes vivant dans ou sur un organisme animal ou végétal (hors état pathologique). Les micro-organismes du microbiome humain sont généralement non-pathogènes et la cohabitation se déroule en harmonie et en symbiose avec leur hôte.

Le microbiome de l'homme était très mal connu mais, depuis 2007, le National Institut for Health (NIH) aux États-Unis a développé le projet « the Human Microbiome Project » (<http://www.hmpdacc.org/>) en lien avec d'autres projets notamment européens : le MetaHIT (qui sera plus spécialisé dans le microbiote intestinal) dont le but est de séquencer les génomes des micro-organismes vivant normalement chez l'homme à partir d'échantillons divers (bouche, nez, peau, tractus gastro-intestinal,...).

Les bactéries dominantes du microbiote peuvent être réparties en 3 phyla bactériens majeurs (Bacteroidetes, Firmicutes et Actinobacteria) qui sont identifiés chez tous les individus d'où ressortent deux grandes catégories d'espèces : celles qui sont présentes chez tous les individus (noyau central) et celles qui sont propres à chacun d'entre nous et qui représentent l'identité métagénomique. Au final, le microbiome de chaque individu est unique (Benson *et al.*, 2010) et peut varier sous certaines conditions telles que l'alimentation ou encore l'environnement. De plus, chez un individu sain, le microbiote fournit un large panel de fonctions métaboliques dont l'être humain n'est pas doté (Gill *et al.*, 2006).

Le microbiote va avoir un impact important sur certains aspects physiologiques du corps humain. Le microbiote intestinal va notamment avoir un rôle dans la protection contre les bactéries exogènes pathogènes, dans la nutrition ou dans la maturation et la régulation du système immunitaire.

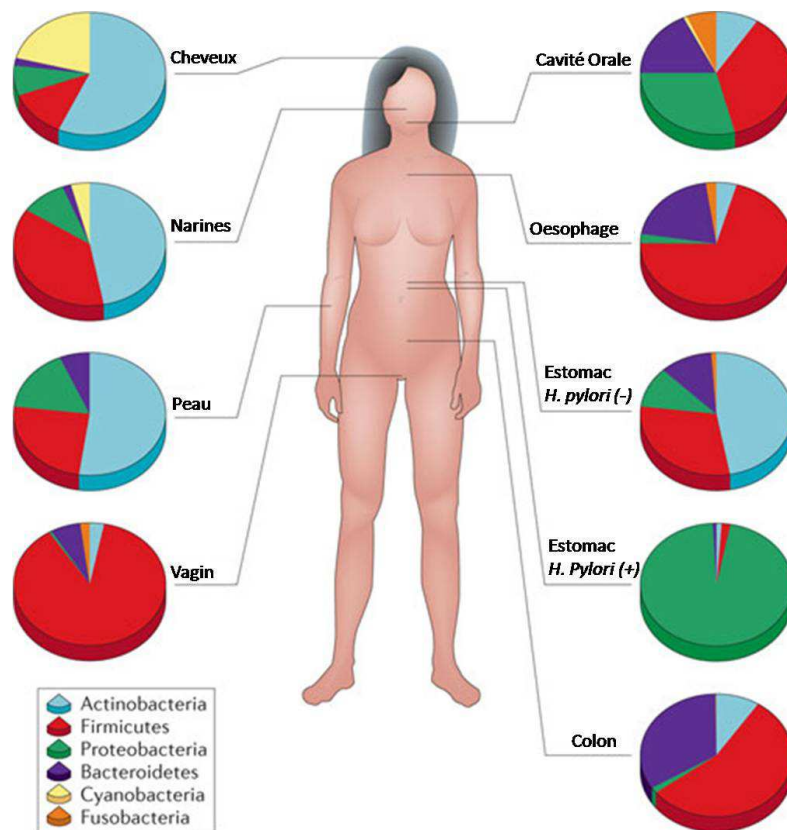


Figure 16: Le microbiome humain.

Les techniques de cultures cellulaires et le développement du séquençage à haut débit ont révélé la présence de variations du microbiome humain entre les différentes zones du corps et pouvant varier d'un être humain à l'autre. Cependant, les niveaux de certains phyla montrent une stabilité en fonction des sites anatomiques spécifiques. De telles différences « site – spécifique » aussi bien que les phénomènes de conservation observés entre les hôtes humains, fournissent un système déterminant l'importance biologique et pathologique de la composition particulière du microbiome. Cette figure indique les pourcentages des différents phyla présents au niveau de certaines zones anatomiques. Adapté de Ilseung *et al.*, 2012.

B. Microbiome et système immunitaire

Le système immunitaire est composé d'un réseau complexe de composants innés et adaptatifs possédant une capacité d'adaptation et de réponse à une grande diversité d'agents d'agression. Ce réseau agit comme régulateur de l'homéostasie de l'hôte qui opère de manière à maintenir et à restaurer la fonction des tissus à la suite d'agressions environnementales et microbiennes. Le développement d'armes spécifiques par le système immunitaire, plus particulièrement la réponse adaptative, a coïncidé avec l'acquisition d'un microbiote complexe, supportant le concept qu'une grande partie de cette « machinerie » a évolué en tant que moyen pour maintenir une relation symbiotique entre les diverses communautés bactériennes.

Au moment de la naissance, l'enfant va passer d'un environnement quasi-stérile (faiblement peuplé en micro-organismes) à un environnement riche en micro-organismes. Le premier contact va se faire avec la flore vaginale de la mère lors d'un accouchement par voie basse ou avec la flore épidermique dans le cas d'un accouchement par césarienne. Les muqueuses sont alors rapidement colonisées par certaines des espèces bactériennes issues de son environnement immédiat. La mise en place progressive du microbiome durant les deux premières années de la vie semble suivre un schéma relativement organisé mais néanmoins spécifique, en terme d'espèces, à chaque individu. Cette instauration du microbiote chez l'enfant, et notamment le microbiote intestinal, a un rôle important dans le métabolisme, la nutrition, la défense contre les pathogènes et les fonctions immunologiques (Lécuyer E., 2012).

Les bactéries intestinales ont un rôle clé dans la promotion du développement précoce du système immunitaire de la muqueuse intestinale de manière à instaurer une réponse appropriée en détruisant les bactéries dangereuses et en établissant une tolérance vis à vis des bactéries bénéfiques à l'organisme. Différentes hypothèses tendent à expliquer ce phénomène de tolérance vis-à-vis des bactéries commensales. Il semblerait notamment que les récepteurs PRR tels que les TLRs aient une expression ou une répartition spécifique à la surface des cellules (Cario E., 2005). La polarisation de l'épithélium intestinal jouerait un rôle crucial (Lee *et al.*, 2006). Par exemple, l'activation du TLR9 situé sur la membrane apicale stimule la tolérance alors que l'activation de ce même récepteur au niveau basal entraînerait la stimulation de la voie NF- κ B. La situation des récepteurs permettrait donc d'orienter la réponse aux stimuli bactériens (Kelly *et al.*, 2005 ; Wells *et al.*, 2010). De plus, il semblerait que les récepteurs PRR se trouveraient préférentiellement au niveau des cellules épithéliales de la crypte et donc positionnés de manière à ne déclencher une réponse que dans le cas d'une violation de la barrière épithéliale par des bactéries (Duerkop *et al.*, 2009).

D'un autre côté, l'expression de certains facteurs semble également moduler la réponse aux bactéries. Par exemple, la phosphatase alcaline intestinale limite le potentiel pro-inflammatoire du LPS constituant certaines bactéries limitant ainsi la réponse immunitaire innée (Duerkop *et al.*, 2009).

Les bactéries commensales contribuent également à l'équilibre dans les réponses des lymphocytes T auxiliaires. La reconnaissance des bactéries via les TLRs active les cellules dendritiques qui produisent alors un environnement cytokinique propice au développement et à la maturation des lymphocytes Th1, Th2, Th17 et T régulateurs, présents alors en homéostasie dans la sous-muqueuse intestinale (Sommer *et al.*, 2013). L'immunité adaptative est alors éduquée en cas de défaut de la réponse immunitaire innée. L'environnement immunitaire rencontré alors dans la muqueuse intestinale est un environnement tolérogène vis-à-vis des bactéries commensales et une relation homéostatique hôte / micro-organismes commensaux s'établit de manière durable.

Une part importante des fonctions du système immunitaire est dédiée au contrôle de la relation entre hôte et micro-organismes commensaux. Ces mécanismes font appel à des phénomènes d'éviction et à des processus de régulation (cellules T Régulatrices et IL-10, notamment) qui sont déterminants pour l'homéostasie de ce système.

La plupart des cellules immunitaires dans le corps résident au niveau des muqueuses colonisées par les micro-organismes commensaux telles que le tractus gastro-intestinal ou la peau. En retour, le microbiote va agir de manière à protéger sa niche écologique en renforçant la barrière immunitaire et donc son propre confinement. En effet, la principale stratégie développée par l'hôte afin de maintenir une relation homéostatique est de limiter au maximum les contacts entre les micro-organismes et la barrière épithéliale (Macpherson *et al.*, 2009).

Le mucus présent au niveau de la muqueuse représente la première barrière entre le microbiote et l'hôte. Les cellules épithéliales vont également produire des peptides antimicrobiens qui joueront un rôle important dans la limitation de l'exposition au microbiote commensal (McGuckin *et al.*, 2011).

Lorsque des micro-organismes "commensaux" parviennent à transloquer à travers la barrière épithéliale intestinale alors ceux-ci sont rapidement éliminés par les macrophages présents dans la sous-muqueuse ou capturés par les cellules dendritiques (Kelsall B., 2008). Ces cellules migreront alors jusqu'aux nœuds lymphatiques présents dans la *lamina propria* et entraîneront une différenciation de lymphocytes T régulateurs (et particulièrement les Treg Foxp3+), de lymphocytes polarisés Th17 (qui grâce à leur production d'IL-17 et d'IL-22 vont agir sur les cellules épithéliales et donc dialoguer avec les micro-organismes commensaux) et de cellules B productrices d'IgA (Macpherson *et al.*, 2004). Ce système, développé par la barrière mucale, va limiter l'activation du système immunitaire via une régulation spécifique du tissu et donc éviter le développement d'une inflammation chronique et de diverses pathologies (figure 17).

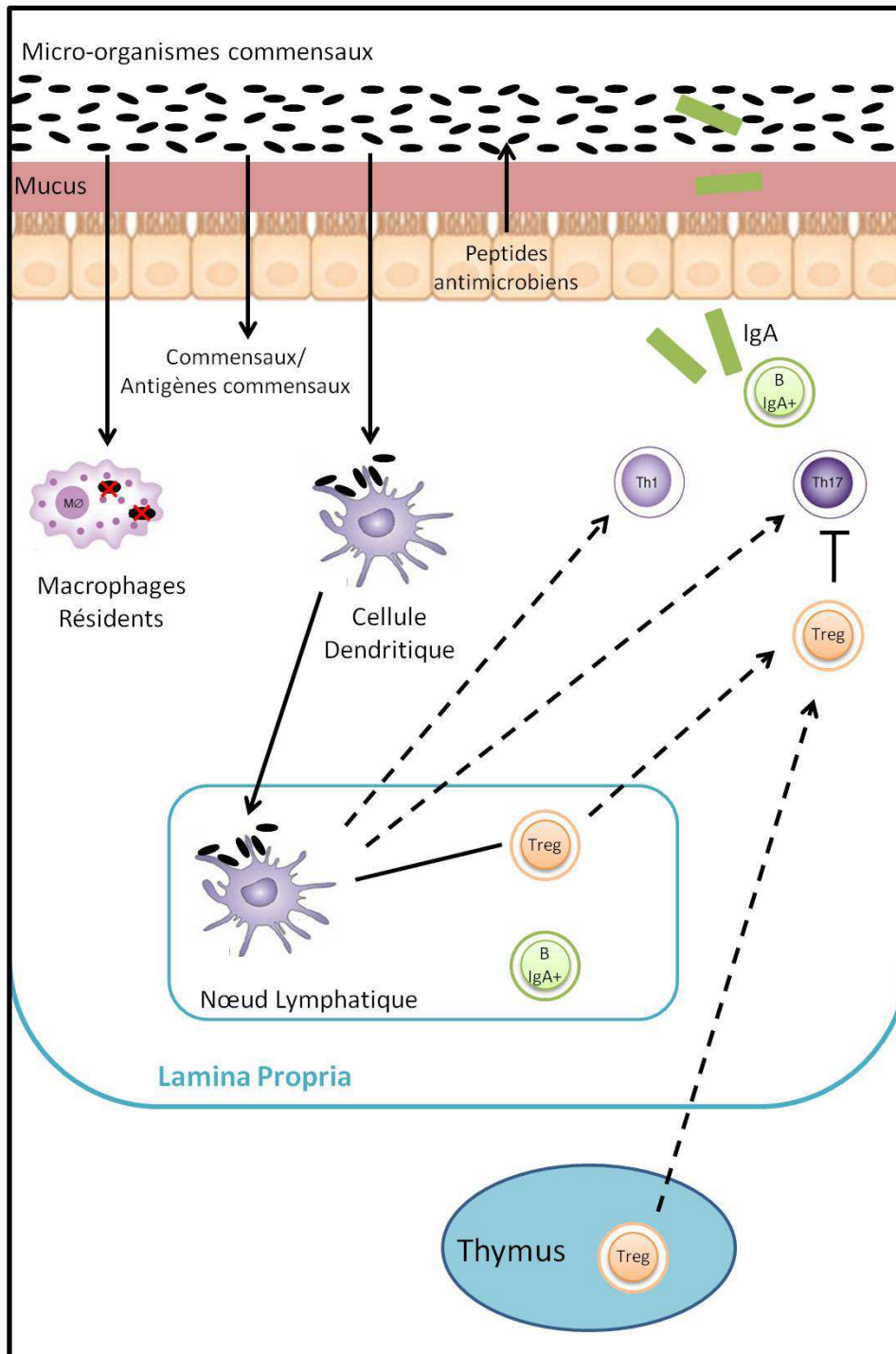


Figure 17 : Maintenance de l'homéostasie Hôte / microbiote

Le mucus représente la première barrière limitant le contact entre le microbiote et le tissu de l'hôte empêchant ainsi la translocation microbienne. Les cellules épithéliales produisent des peptides antimicrobiens qui joueront également un rôle important dans la limitation de l'exposition au microbiote commensal. Lorsque des bactéries commensales transloquent, celles-ci sont rapidement dégradées par les macrophages résidents du tissu. Les bactéries commensales ou des antigènes issus de celles-ci, peuvent également être capturés par les cellules dendritiques qui migrent alors jusqu'aux nœuds lymphatiques présents dans la *lamina propria*. La présentation de ces antigènes par les cellules dendritiques conduira à la différenciation de lymphocytes T régulateurs, de lymphocytes polarisés Th17 et de cellules B productrices d'IgA. Ce système va permettre le contrôle de l'activation du système immunitaire évitant ainsi le développement d'une inflammation chronique et de diverses pathologies. Adapté de Belkaid *et al.*, 2014.

Cette maintenance de l'homéostasie tissulaire est nécessaire pour la survie de l'hôte. Ce processus fondamental dépend d'un ensemble de réponses immunitaires innées et adaptatives complexes et coordonnées qui sélectionne et calibre les réponses contre le soi, la nourriture (dans le cas de la muqueuse intestinale), les micro-organismes commensaux et les pathogènes de la manière la plus appropriée.

Le microbiote va permettre le maintien des réponses régulatrices via différents moyens tels que:

- La production de polysaccharide A (PSA) reconnu par le TLR2 exprimé par lymphocytes T activant et permettant la prolifération des lymphocytes T régulateurs (Mazmanian *et al.*, 2008),
- La production d'IL-10 par les lymphocytes T régulateurs permettra ainsi de limiter les réponses Th1 et/ou Th17,
- La création par certaines bactéries (comme les espèces de Clostridium) d'un environnement riche en TGF- β favorable au développement des lymphocytes T régulateurs (Atarashi *et al.*, 2011),
- La production d'acide rétinoïque par les cellules dendritiques stimulées favorise la différenciation des cellules T régulatrices au dépend des lymphocytes Th17, en inhibant l'expression de ROR γ T (Coomes *et al.*, 2007),
- L'action des Acides Gras à chaîne courte (issus des fibres non digérées par l'hôte mais transformées par les bactéries) permettra la régulation de la taille et de la fonction du réseau de cellules T régulatrices (Arpaia *et al.*, 2013).

Une part de l'effet protecteur du microbiote dans le contexte de l'inflammation réside en cette capacité de soutenir ce réseau de régulation. De plus, le microbiote est capable d'agir directement sur les cellules immunitaires telles que les monocytes inflammatoires (impliqués dans le contrôle des pathogènes) ou sur les neutrophiles (limitant leur activation et donc les dommages tissulaires qui en découlent) (Grainger *et al.*, 2013).

Les muqueuses dans lesquelles sont trouvés les différents microbiotes (telles que la peau, le tractus gastro-intestinal ou les poumons) sont aussi les principales portes d'entrée des pathogènes. Cela implique que la première rencontre entre le pathogène et le système immunitaire a lieu dans un environnement conditionné et régulé par son microbiote endogène. Le microbiote va participer au contrôle de l'infection par ce pathogène de manière directe (compétition, production de toxines, production de peptides antimicrobiens...) ou indirecte (renforcement de la barrière mucoale, entraînement du système immunitaire,...).

Le microbiote est un composant nécessaire pour la réponse effectrice de l'hôte. Même si certaines études essaient actuellement d'associer certains microbes à un statut immunologique unique, le microbiote est un composé complexe et hautement dynamique de microbes qui expriment tous une grande variété de ligands interagissant avec les récepteurs de reconnaissance et de métabolites, comme les acides gras à chaînes courtes produites suite à la fermentation des fibres issues de l'alimentation, régulant la fonction de ce système. Dans des

conditions d'homéostasie, à la fois les signaux inflammatoires et régulateurs sont intégrés en permanence, et la somme de ces signaux conduit à l'établissement d'une inflammation contrôlée compatible avec l'immunité tissulaire.

C. Microbiote Pulmonaire

Pendant très longtemps, le poumon a été considéré comme un organe stérile principalement du au fait que les techniques basées sur la culture cellulaire étaient dans l'incapacité de détecter les micro-organismes présents. Si bien que, lors de la mise en place du projet « the Human Microbiome Project » par le National Institute of Health, le poumon ne faisait pas partie des sites de recherches intégrés dans le projet (Proctor *et al.*, 2011). Cependant, le développement de nouvelles techniques indépendantes de la culture a montré que les poumons des personnes saines présentaient différentes communautés bactériennes présentes en faibles quantités et composées de divers types de bactéries.

L'étude du microbiome pulmonaire n'en est donc encore qu'à ses balbutiements et de nombreuses analyses sont encore nécessaires afin de pouvoir développer une connaissance approfondie de ce sujet. Cependant, de nombreux travaux ont été réalisés depuis 2011 et grâce au séquençage à haut débit utilisant l'ARN ribosomique 16S afin d'identifier les bactéries, il a pu être montré que phylogénétiquement parlant, diverses communautés bactériennes étaient présentes au niveau du poumon. Selon les techniques d'échantillonnage utilisées (analyse des lavages broncho-alvéolaires, biopsies de différentes régions du poumon, « brossage » de la muqueuse...), les résultats diffèrent d'une équipe à l'autre. De plus, des études ont également montré que les communautés bactériennes variaient chez un même individu en fonction des régions pulmonaires analysées avec une charge bactérienne plus importante dans l'axe oro-pharyngé et dans les voies aériennes hautes en comparaison aux voies aériennes basses (Erb-Downward *et al.*, 2011). La contamination d'une région pulmonaire à l'autre peut donc fausser les résultats et la plus importante viendrait certainement de l'axe oro-pharyngé. De plus, l'analyse du microbiome pulmonaire ne peut pas rendre compte d'un microbiome unique pour l'ensemble de la population. En effet, et comme nous l'avons dit en introduction de ce chapitre, des facteurs environnementaux peuvent modifier la composition du microbiome et notamment, la zone géographique, la possession d'animaux de compagnie,... Cependant, certains phyla sont communément retrouvés tels que les Proteobacteria, les Firmicutes et les Bacteroidetes. Certains genres sont prédominants dans l'analyse du microbiome pulmonaire, notamment *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Prevotella*, *Fusobacteria*, *Veillonella*, *Sphingomonas*, *Acinetobacter*, *Megasphaera* et *Staphylococcus* et dans une moindre mesure, certains pathogènes potentiels tels que *Haemophilus* et *Neisseria*. Ces micro-organismes seront retrouvés principalement dans le mucus. Actuellement, le microbiome pulmonaire serait représenté par environ 2000 génomes bactériens par cm² (Erb-Downward *et al.*, 2011).

D. Dysbiose et pathologies

Le microbiome permet donc l'éducation et le bon fonctionnement du système immunitaire mucosal dont le rôle est de protéger l'hôte des infections et des dommages environnementaux à la surface des muqueuses. Différents travaux démontrent que la composition du microbiote intestinal, qui est pour l'instant le microbiote le plus étudié, détermine le bon fonctionnement du système immunitaire. Bien qu'une grande diversité bactérienne soit l'expression d'un microbiote sain («eubiose»), une modification du microbiote, appelée dysbiose, avec une diversité plus faible et une prédominance de certaines bactéries, participe à différents états pathologiques. Les expériences de transfert de microbiote ont permis de démontrer l'importance de ces mécanismes.

Par exemple, dans le cas des maladies inflammatoires de l'intestin, certains composants bactériens sont associés au développement de la maladie de Crohn (diminution des bactéries appartenant au groupe des *Clostridiales*) (Frank *et al.*, 2007).

Un microbiote intestinal humain de « type obèse » a également été décrit avec une augmentation du ratio *Firmicutes/Bacteroidetes*. Entre autres, il semblerait que le microbiote augmente la vascularisation et le flux sanguin de la muqueuse et stimule l'absorption de nutriments. Le microbiote est également impliqué dans le contrôle de l'obésité et de l'activité métabolique en augmentant le dépôt lipidique au niveau des adipocytes (Icaza-Chavez *et al.*, 2013).

Des analyses en métagénomique ont pu montrer que des patients atteints de diabète de type 2 présentaient une dysbiose modérée du microbiote intestinal avec une diminution du nombre de bactéries productrices de butyrate et une augmentation de quelques pathogènes opportunistes. Il a également été observé un enrichissement au niveau d'autres fonctions microbiennes entraînant une résistance au stress oxydatif (Qin *et al.*, 2012).

De par la capacité de certains micro-organismes à modifier la production de neurotransmetteurs pouvant être trouvés dans le cerveau, le microbiome pourrait aussi avoir un rôle dans la schizophrénie, la dépression, les désordres de type bipolaires et dans d'autres déséquilibres neurochimiques.

La dysbiose semblerait être encore à l'origine de nombreuses pathologies, notamment les pathologies auto-immunes, le syndrome métabolique ou même certains cancers. Des données récentes montrent que l'activité anti-tumorale de molécules anti-cancéreuses est altérée du fait de la présence d'une dysbiose liée aux traitements reçus par les patients (Viaud *et al.*, 2013).

Plusieurs paramètres peuvent être à l'origine d'une dysbiose et notamment, l'alimentation (David *et al.*, 2013), les traitements antibiotiques, le stress, la physiologie de l'hôte, les pathogènes exogènes, les pesticides, les polluants... Parmi les polluants, il a été montré que l'exposition chronique à la fumée de cigarette pouvait avoir une influence à la fois sur le microbiote intestinal et sur le microbiote pulmonaire.

1. Effet de l'exposition à la fumée de cigarette sur le microbiote intestinal

La dysbiose du microbiote intestinal peut conduire à diverses pathologies et notamment aux MICI incluant la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse. De manière intéressante, il a été montré que le tabagisme présentait un effet protecteur contre le développement des colites ulcéreuses (Harries *et al.*, 1982) alors qu'au contraire, il était considéré comme un facteur de risque dans le développement de la maladie de Crohn (Somerville *et al.*, 1984).

Une étude récente a montré que chez les fumeurs (fumeurs sains et fumeurs avec un Crohn) la proportion de *Bacteroides-Prevotella* était augmentée par rapport aux groupes non fumeurs (sains et Crohn). L'augmentation du nombre de *Bacteroides* pourrait être à l'origine de colite induite par les lymphocytes CD4 et augmenterait le nombre de cellules dendritiques activées produisant de l'IL-12. L'exposition à la fumée de cigarette diminuerait également l'espèce bactérienne *Faecalibacterium prausnitzii* qui serait associée, lorsqu'elle est en faible proportion à un plus fort risque de rechute après résection chirurgicale du colon (Sokol *et al.*, 2008). En effet, cette espèce présente des caractéristiques immunorégulatrices comme l'inhibition de la production d'IL-12 ou l'augmentation de la production d'IL-10 (Murugananthan *et al.*, 2012).

Cependant, l'influence directe du tabac sur le microbiote intestinal n'est pas encore établie et les effets observés pourraient être en lien avec d'autres comportements associés au tabagisme tels que l'alimentation (Parkes *et al.*, 2014).

2. Effet de l'exposition à la fumée de cigarette sur le microbiote pulmonaire

Dans les maladies inflammatoires du poumon telle que la BPCO, les conditions anormales dans lesquelles se trouvent les voies respiratoires facilitent la colonisation par des bactéries, des mycobactéries, des particules virales et des champignons inhalés. L'inflammation et le remodelage associés à la BPCO fournissent un environnement approprié pour la croissance de ces micro-organismes.

La relation entre le microbiote pulmonaire et le statut BPCO des patients est un sujet actuellement étudié par différentes équipes. L'étude menée par Erb-Downward et ses collaborateurs en 2011, sur différents groupes de patients incluant des non fumeurs, des fumeurs sains et des patients BPCO à différents stades de la pathologie, n'a montré que peu de différences entre les groupes. Cependant, les échantillons provenant des patients atteints de BPCO modérée et sévère présentaient une diminution dans la diversité des communautés bactériennes (Erb-Downward *et al.*, 2011).

Une étude de Pragman et ses collaborateurs en 2012 (Pragman *et al.*, 2012), montre une diversité plus importante des populations bactériennes chez les patients atteints de BPCO modérée à sévère, ces résultats étant contradictoires avec l'étude de Erb-Downward (Erb-Downward *et al.*, 2011).

Une étude de Sze et ses collaborateurs en 2012 (Sze *et al.*, 2012), a montré que le groupe de fumeurs sains présentait une plus forte quantité d'Actinobacter alors que le groupe BPCO sévère quant à lui, possédait une quantité plus importante de Firmicutes.

En 2010, Hilty et ses collaborateurs (Hilty *et al.*, 2010) avaient observé des différences entre des sujets sains et des sujets asthmatiques ou atteints de BPCO. En effet, leur étude avait montré une surreprésentation du phylum Proteobacter dans les poumons de patients allergiques et BPCO alors que le phylum Bacteroidetes était marginalisé. Cependant, ces différences, observées dans les deux pathologies, mènent à se demander si c'est la modification du microbiote qui conduit à la maladie ou si c'est l'inflammation pulmonaire chronique présente dans ces deux pathologies qui modifie le microbiote pulmonaire en créant un environnement plus propice au développement de certaines bactéries au détriment d'autres.

Les données concernant la composition et la diversité des populations bactériennes composant le microbiote pulmonaire et les possibles modifications de ce dernier dans le contexte de la BPCO sont encore en trop faible quantité. De plus, le nombre de sujets inclus dans ces études nécessiterait d'être augmenté en intégrant des contrôles les plus pertinents possibles (de même contexte et origine). La standardisation des méthodes d'analyses semble également être nécessaire de manière à homogénéiser les résultats obtenus.

Il est à noter également que la BPCO est ponctuée d'exacerbations qui sont principalement dues à des pathogènes tels que *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* et *Moraxella Catarrhalis*. Ces organismes peuvent souvent être trouvés colonisant les voies respiratoires des patients BPCO entre les épisodes d'exacerbations et, puisque beaucoup de ces bactéries persistent entre les exacerbations, leur présence pourrait promouvoir une inflammation chronique au niveau pulmonaire participant ainsi à la pathogénèse de la BPCO.

E. Interactions muqueuses intestinale et pulmonaire sous influence du microbiote

Des études réalisées dans le but de déterminer l'importance du microbiote dans les maladies pulmonaires allergiques ont montré que l'utilisation d'antibiotiques afin de perturber le microbiote intestinal était suffisante pour entraîner le développement d'une réponse respiratoire allergique, indépendante de l'antigène utilisé ou du fond génétique de l'animal (Noverr *et al.*, 2004).

Une autre étude, utilisant des souris stériles (Germ-free), a montré que l'absence totale de microbiome entraînait des réponses immunitaires biaisées et une inflammation due principalement aux lymphocytes polarisés Th2 (spécialisés dans la réponse allergique). En absence de microbiome, l'environnement pulmonaire contient des cellules dendritiques et des macrophages présentant des états d'activation dérégulés. De plus, les souris stériles présentent moins de macrophages alvéolaires que les souris non stériles, indiquant un rôle pour le microbiome à la fois dans la maturation et le recrutement de certains types de cellules (Herbst *et al.*, 2011).

D'autres études ont aussi montré l'importance du microbiome dans l'immunité anti-virale ou encore dans le développement normal des cellules du système immunitaire (Hill *et al.*, 2010). Une dysbiose intestinale provoquée par l'antibiothérapie conduit à une aggravation de la pathologie pulmonaire due à l'infection par le virus de la grippe (Ichinohe *et al.*, 2011).

Ces données seraient en faveur du concept « Microbiome comme organe à part entière », ce qui suggérerait que la modification d'un microbiote peut, non seulement altérer la physiologie de la niche où il se trouve et moduler le système immunitaire de celle-ci, mais également avoir un impact extra-tissulaire et engendrer des altérations physiologiques dans d'autres organes. Les mécanismes évoqués font appel à une re-circulation des cellules immunitaires qui n'a pas encore été démontrée. Une diffusion des micro-organismes prépondérants au cours de la dysbiose ou de leurs dérivés ne peut pas être écartée pour le moment. De plus, les traitements comme les antibiotiques affectent également le microbiote pulmonaire en plus du microbiote digestif. Cette théorie a engendré un nombre croissant d'études essayant de démontrer divers axes de pathologies avec pour point commun les microbiotes (axe intestin-cerveau, axe intestin – poumon,...).

VI. Objectifs du travail

La Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive est une maladie inflammatoire chronique du poumon se traduisant par une progression lente et peu réversible vers une bronchite chronique et un emphysème. Cette pathologie d'abord pulmonaire affecte également la muqueuse digestive et le système cardiovasculaire. De ce fait, l'exposition à la fumée de cigarette favorise la survenue de pathologies inflammatoires du tube digestif (la maladie de Crohn) et de désordres métaboliques (diabète de type 2).

Le principal facteur de risque impliqué dans le développement de la BPCO dans les pays industrialisés est l'exposition à la fumée de cigarette. En effet, selon la SPLF (Société de Pneumologie de Langue Française), 80% des patients atteints de BPCO sont fumeurs ou anciens fumeurs.

L'exposition chronique à la fumée de cigarette entraîne une forte libération d'espèces réactives de l'oxygène et d'autres oxydants au niveau pulmonaire conduisant à un déséquilibre de la balance oxydants / anti-oxydants (Church *et al.*, 1985).

Ce stress oxydatif causé par la fumée de cigarette est directement incriminé dans la physiopathologie de la BPCO de part son rôle dans le recrutement de différents types cellulaires de l'immunité innée et adaptative ainsi que sur l'induction de médiateurs inflammatoires participant ainsi à l'instauration d'une inflammation chronique au sein du poumon. L'IL-17 semble avoir un rôle déterminant dans le contrôle de l'inflammation et l'altération de la fonction respiratoire bien que les mécanismes conduisant à la production de cette cytokine ne soient pas élucidés. Dans le laboratoire, nous avons récemment montré que contrairement à la muqueuse respiratoire, l'exposition à la fumée de cigarette n'induit pas dans la muqueuse digestive d'augmentation d'IL-17, mais plutôt une surexpression de l'IL-10, une cytokine immuno-régulatrice associée à une perturbation du microbiote digestif.

Ainsi, l'objectif de cette thèse était premièrement de préciser le rôle du stress oxydatif dans le développement de la réponse IL-17 et secondairement d'identifier l'implication d'un mécanisme régulateur dans le contrôle de la pathologie au travers de la production d'IL-10. Un défaut de ce mécanisme pourrait expliquer la survenue de la pathologie et le fait que 60 à 70 % des fumeurs ne développent pas d'atteinte respiratoire.

Dans la première partie de ce travail, nous nous sommes intéressés à la capacité du stress oxydatif à activer le système immunitaire inné et à déclencher la production de l'IL-17. Nous avons ainsi identifié un rôle essentiel des cellules *i*NKT, dans le développement de la BPCO. Ces cellules avaient déjà montré une implication dans le contrôle de l'inflammation des voies respiratoires notamment dans des modèles allergiques (Akbari *et al.* 2003) ou de stress oxydatif induit par l'ozone (Pichavant M. *et al.*, 2008).

Ce premier travail a donné lieu à une publication en co-auteur dans le journal « Mucosal Immunology » et nous a notamment permis de confirmer un rôle pilier de la cytokine IL-17 dans la physiopathologie de la BPCO.

L'exposition à la fumée de cigarette induit l'expression de l'IL-10 dans la muqueuse colique et cette cytokine permet d'inhiber la survenue d'une rectocolite hémorragique. Dans la deuxième partie de ce travail, nous nous sommes donc interrogés sur le rôle qu'exerce l'IL-10 dans le cadre des atteintes pulmonaires et intestinales induites par une exposition chronique à la fumée de cigarette. Nous avons, dans un premier temps, identifié les sources cellulaires d'IL-10 dans le cadre d'une exposition à la fumée de cigarette puis, dans un second temps, nous avons voulu étudier le rôle de cette cytokine dans les atteintes fonctionnelles en précisant le rôle du microbiote dans ce contexte.

Ce second travail a donné lieu à la préparation d'un article qui sera très rapidement soumis.

VII. Résultats

A. Partie 1: L'activation des cellules iNKT induite par le stress oxydatif est impliquée dans la pathogénèse de la BPCO

Oxidative stress-mediated iNKT cell activation is involved in COPD pathogenesis.

M Pichavant *^{1,2,3,4,5}, G Rémy *^{1,2,3,4,5}, S Bekaert⁶, O Le Rouzic^{1,2,3,4,5,8}, G Kervoaze^{1,2,3,4,5}, E Vilain^{1,2,3,4,5}, N Just^{1,2,3,4,5,7}, I Tillie-Leblond^{1,2,3,4,5,8}, F Trottein^{1,2,3,4,5}, D Cataldo⁶, P Gosset^{1,2,3,4,5}

* Equal contribution of the authors

¹Institut Pasteur de Lille, Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, F-59019 Lille, France;

²Université Lille Nord de France, F-59000 Lille, France;

³Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 8204, F-59021 Lille, France;

⁴Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1019, F-59019 Lille, France;

⁵Institut Fédératif de Recherche 142, F-59019 Lille, France;

⁶ Laboratoire de Biologie des Tumeurs et du Développement (GIGA-research), Université de Liège et CHU de Liège, Liège, Belgium;

⁷ Service de Pneumologie, Hôpital Victor Provo, Roubaix, France.

⁸ Service de Pneumologie, Hôpital Calmette, CHRU, Lille, France.

Corresponding author:

Muriel Pichavant, PhD, Inserm U1019, Team 8 "Lung infection and innate immunity", Institut Pasteur de Lille, 1 Rue du Professeur Calmette, 59019 Lille cedex France, Phone : +33 3 20 87 79 65, Fax : +33 3 20 87 78 88, muriel.pichavant@pasteur-lille.fr

**Cet article a été publié dans « Mucosal Immunology »,
Facteur d'impact : 7.000**

1. ABSTRACT

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a major clinical challenge mostly due to cigarette smoke exposure. Invariant Natural Killer T (*i*NKT) cells are potent immunoregulatory cells that have a crucial role in inflammation. In the current study, we investigate the role of *i*NKT cells in COPD pathogenesis. The frequency of activated NKT cells was found to be increased in peripheral blood of COPD patients relative to controls. In mice chronically exposed to cigarette smoke, activated *i*NKT cells accumulated in the lungs and strongly contributed to the pathogenesis. The detrimental role of *i*NKT cells was confirmed in an acute model of oxidative stress, an effect that depended on interleukin (IL)-17. Cigarette smoke extracts directly activated mouse and human dendritic cells (DC) and airway epithelial cells (AECs) to trigger interferon (IFN)- γ and/or IL-17 production by *i*NKT cells, an effect ablated by the anti-oxidant N-acetylcystein. In mice, this treatment abrogates *i*NKT cells accumulation in the lung and abolished the development of COPD. Together, activation of *i*NKT cells by oxidative stress in DC and AECs cells participates in the development of experimental COPD, a finding that might be exploited at a therapeutic level.

Word count: 187 words.

Key words: inflammation, innate cells, antigen presenting cells, anti-oxidant.

2. INTRODUCTION

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is characterized by not reversible airflow limitation (1). This disease affects more than 200 million people and is a leading cause of morbidity and mortality worldwide (2). Cigarette smoke (CS) exposure is the most important risk factor for COPD (3).

Exposure to CS induces a strong burden of reactive oxygen species (ROS) in the lung leading to imbalance between oxidants and antioxidants (4). An important part of this oxidative stress is related to lipid peroxidation, a phenomenon that can be mimicked by administration of cumen hydroperoxide (CHP) (5). CS-induced oxidative stress is involved in COPD development through its role in airway inflammation. Long term exposure to CS leads to the recruitment of macrophages, neutrophils and CD8⁺ T cells (6) which amplify the oxidative stress in the lungs (7). Previous findings have provided evidences that cells of the innate immune system, including NK cells, are sufficient to induce inflammation and emphysema after chronic CS exposure (8). Invariant Natural Killer T (*i*NKT) cells comprise a subset of lymphocytes that express features of classical NK and T cells, including restricted TCR consisting of an invariant V α J α -chain (V α 24-J α 18 in humans and V α 14-J α 18 in mice) combined with a more polyclonal V β -chain (V β 11 in humans, V β 8.2, 7 and 2 in mice). *i*NKT cells recognize (glyco)lipid Ag presented by the non polymorphic MHC class I-like protein, CD1d, widely expressed by macrophages, dendritic cells (DC), airway epithelial cells (AEC) and B cells (9). Recognition of CD1d-presented lipids by *i*NKT cells is highly conserved among different mammalian species, suggesting that *i*NKT cells play a pivotal role in immunity (9, 10). Activation of *i*NKT cells results in an innate-like immune response characterized by an important production of cytokines (IFN- γ , IL-4 and IL-17) (9, 11), and cytotoxic proteins (granzyme B and perforin) (12, 13). This rapid response endows *i*NKT cells with the capacity to critically amplify innate and adaptive immunity. Several studies have defined the impact of *i*NKT cell activation on the development of diseases, including infectious diseases and asthma (14-16).

Others and we have shown that *i*NKT are involved in the control of airway inflammation and hyperreactivity in mice, in models of allergic reaction (17, 18), and after exposure to oxidant pollutants such as ozone (19). Kim et al. also showed that *i*NKT cells are implicated in an experimental model of chronic lung disease induced by Sendai virus infection, with pathology that resembles asthma and COPD (20). Of interest is the recent observation that patients developing COPD have an increased number of *i*NKT cells in the blood and the lungs (20-23). In the current study, we investigated the potential role of *i*NKT cells in a model of chronic exposure to CS mimicking COPD symptoms, and in an acute model of lipid peroxidation using CHP as the trigger. We demonstrated that exposure of mice to CS and to CHP induced changes in lung functions that requires the presence of *i*NKT cells. These effects were dependant on oxidative stress since addition of the anti-oxidant N-acetylcystein (NAC) prevents the activation of *i*NKT cells and the deleterious effects of CS. We showed that CS-induced oxidative stress in AEC and DC was responsible for *i*NKT cell activation both in humans and mice. Targeting *i*NKT cells may represent an effective therapeutic approach to control COPD in humans.

3. MATERIALS AND METHODS

Patients with COPD

Peripheral blood and induced or spontaneous sputum were collected in stable COPD patients (n = 28) and in non smoker healthy controls (n =7) (CPP 2008-A00690-55) in order to evaluate the phenotype of iNKT cell and DC as well as cytokine concentrations.

Cigarette Smoke Exposure

Mice were exposed to CS generated from 5 cigarettes per day, 5 days a week, and up to 12 weeks (Emka, Scireq, Montréal, QC, Canada). The negative-control group was exposed to ambient air. N-acetylCystein (NAC; Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) was administrated in the drinking water (300 ng/mouse/day), from the beginning of the CS exposure till the day of killing.

Cumen hydroperoxide exposure

Mice were intranasally administrated either with 50 μ l PBS or 75 μ g/50 μ l cumen hydroperoxyde (CHP; Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) on days 0, 2 and 4. Mice were killed on day 5 to assess their lung function and inflammation. In adoptive transfer experiments, sorted WT iNKT cells were injected intravenously into $J\alpha 18^{-/-}$ mice one day before the first exposure to CHP.

Measurement of lung function

Lung function was assessed by invasive measurement, as previously described (40). Aerosolized methacholine (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) was administered in increasing concentrations (from 2.5 to 160 mg/ml of methacholine). We computed airway resistance, dynamic compliance and lung elastance by fitting flow, volume and pressure to an equation of motion (Flexivent System, Scireq).

NKT purification, expansion and adoptive transfer in mice

iNKT cells were sorted using a FACS Aria (BD Biosciences, Le pont de Claix, France), from the livers of naive animals, on the basis of PBS57 -loaded CD1d tetramer and TCR β staining. Freshly sorted iNKT cells were expanded *ex vivo* and maintained in culture for 1 month in RPMI 1640 with 10% FCS (Invitrogen, Paisley, UK) containing 30 ng/ml IL-15 (Peprotech, Neuilly sur Seine, France). For adoptive transfer experiments, $J\alpha 18^{-/-}$ recipient mice were inoculated intravenously either with 1×10^6 purified WT or $IL-17^{-/-}$ iNKT cells or with the same volume of medium alone 24h before exposure to CHP. iNKT cell purity after sorting was >98%.

Pulmonary APC cell sorting

Pulmonary APC were sorted using a FACS Aria on the basis of F4/80, CD11c and CD11b expression. Alveolar macrophages, CD11b $^-$ and CD11b $^+$ DC were sorted. Cell purity after sorting was >98%. Post-sort analysis was performed to evaluate the expression of CD103 on DC subsets. As expected, CD11b $^-$ DC subset was CD103 $^+$ (97% purity) and CD11b $^+$ DC subset was CD103 $^-$ (98% purity) (Supplementary Figure 1).

Cytokine quantification

The concentration of human IL-4, IL-17, IFN- γ and TNF- α (R&D systems, Lille, France) in coculture supernatants were determined by ELISA. Mouse IL-2, IL-4, IL-17 and IFN- γ concentrations were measured in supernatants of coculture by ELISA (R&D systems).

Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) analysis

Quantitative RT-PCR was performed to quantify mRNA of interest (supplementary Table 1). Results were expressed as mean \pm SEM of the relative gene expression calculated for each experiment in folds ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) using β -actin as a reference, and compared with controls (air).

Statistical analysis

Results are expressed as the mean \pm SEM. The statistical significance of differences between experimental groups was calculated by a one-way analysis of variance with a Bonferroni post test or an unpaired Student t test (GraphPad, San Diego, CA). The possibility to use these parametric tests was assessed by checking if the population is Gaussian and the variance is equal (Bartlett's test). Results with a p value <0.05 were considered significant.

4. RESULTS

Activated NKT cells in peripheral blood of COPD patients

We first aimed to determine the frequency of (*i*)NKT cells in COPD patients (supplementary Table 2). Compared with healthy controls, proportions of CD56⁺ CD3⁺ NKT cells, and to a lesser extent CD56⁺ CD3⁻ NK cells, were enhanced in COPD patients. This was associated with an enhanced expression of the activating marker CD69. Compared with healthy donors, COPD patients also exhibited a higher frequency of *i*NKT cells, identified as CD3⁺ PBS57-loaded CD1d tetramer⁺ cells (Figure 1a). Increased percentages of circulating DC, and higher expression of CD86 on DC were observed in COPD patients (Figure 1b). Pulmonary inflammation was confirmed by higher levels of CXCL-8 and TNF- α in their sputum, and increased production of IL-22 and IFN- γ by PBMC (supplementary Figure 2). These data suggest that (*i*) NKT cells could be involved in COPD pathology.

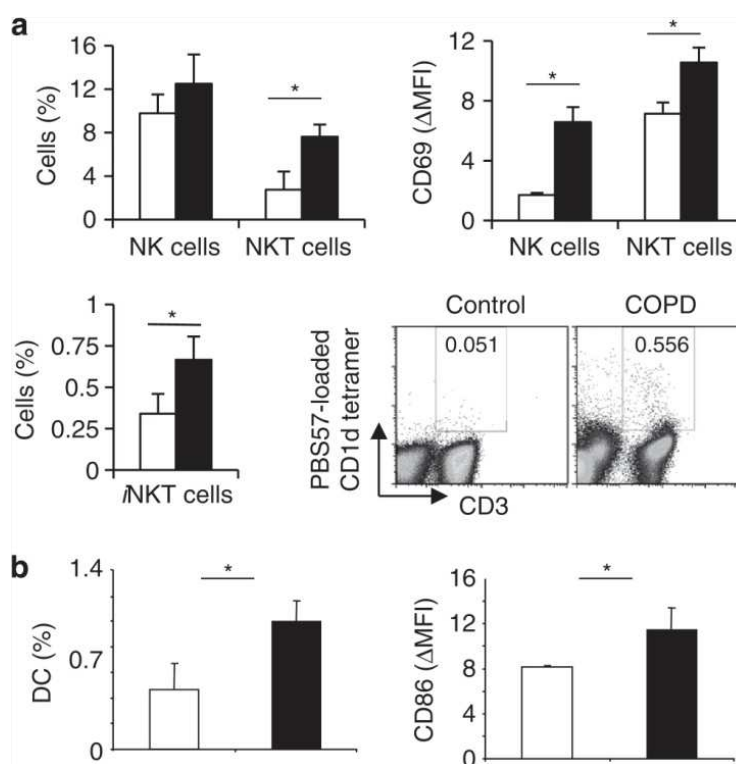


Figure 1. Characterization of cytokines and immune cells in human fluids of control donors and COPD patients.

A, Percentages of CD3⁻ CD56⁺ NK, CD3⁺ CD56⁺ NKT-like and CD3⁺ PBS57 loaded-CD1d tetramer⁺ *i*NKT cells, and CD11c⁺ HLA-DR⁺ myeloid DC were evaluated in the peripheral blood of 7 healthy controls (white bars) and 28 COPD patients (black bars). The Δ MFI of the activation markers CD69 relative to isotype controls was analyzed on NK, and NKT-like cells. **B**, Percentages of CD11c⁺ HLA-DR⁺ myeloid DC were evaluated in blood of healthy controls (white bars) and COPD patients (black bars). The Δ MFI of the activation markers CD86 relative to isotype controls was analyzed on DC. Gates were respectively drawn according to isotype controls, or unloaded CD1d tetramer. Data represent the mean \pm SEM. * $p < 0.05$.

CS exposure triggers the accumulation and the activation of *i*NKT cells in the lungs

Repeated exposure of C57BL/6 mice to CS induced an inflammatory lung reaction, mimicking COPD, as previously described (8). This was characterized by neutrophil, NK cell and macrophage recruitment (+30-50%) and/or activation after chronic exposure to CS, compared to mice exposed to ambient air (Fig. 3C, Fig. 5A). The frequency and number of pulmonary *i*NKT cells was enhanced after CS exposure (Fig. 2A); these parameters then returned to basal levels at week 2 post-exposure to again increase at weeks 4, 8 and 12. An increased expression of the activation marker CD69 on *i*NKT cells persisted all along the experiment (Fig. 2B and not shown). Analysis of CD5⁺ NK1.1⁺ cells confirmed these data (supplemental Fig. 3A and B, and not shown). In contrast, the proportion, the number and the activation status of *i*NKT cells remained unchanged in the spleen of CS-exposed mice (supplemental Fig. 3C-E). PMA/ionomycin stimulation of lung cells resulted in a higher frequency of IL-17⁺ and IFN- γ *i*NKT cells at 1 week post CS-exposure (Fig. 2C) and later (not shown). Stimulation of pulmonary cells from CS-exposed mice with the prototypical *i*NKT cell activator α GalCer resulted in a higher production of IL-17 at 1 and 12 weeks post-CS exposure. In contrast, a significant enhancement of IFN- γ production was observed only at 12 weeks post-exposure (Fig. 2D). No difference in IL-4 levels was observed (not shown). Collectively, CS exposure leads to an increased recruitment or a local expansion of activated *i*NKT cells in the lungs.

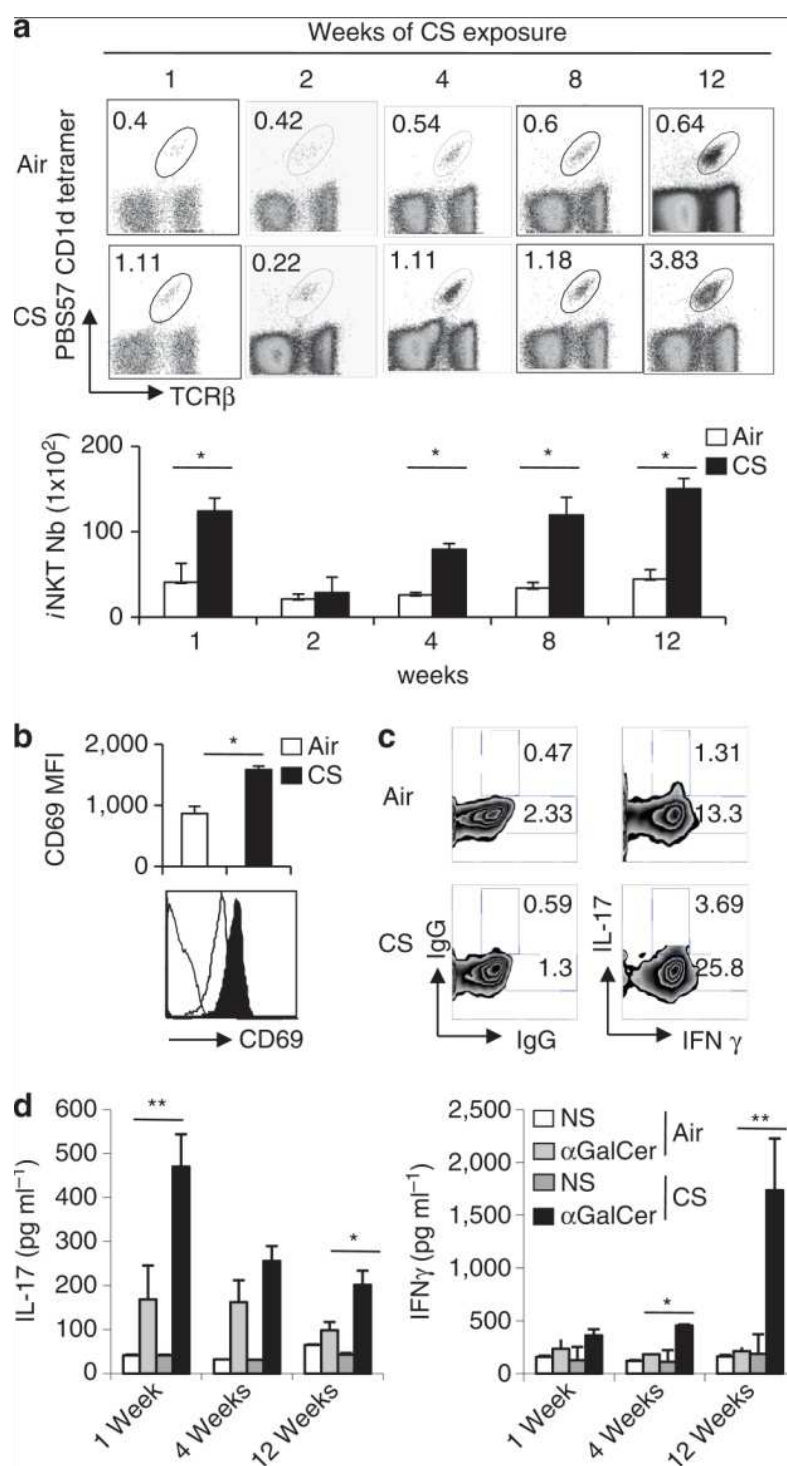


Figure 2. CS exposure enhances the number of pulmonary *i*NKT cells and triggers their activation.

A, Mice were exposed to CS 5 days a week for a period of 1, 2, 4, 8 and 12 weeks. The frequency (*upper panel*) and number (*lower panel*) of *i*NKT cells ($\text{CD45}^+ \text{TCR}\alpha^+ \text{PBS57-loaded CD1d tetramer}^+$ cells) in lung tissues were determined. Data are representative of one experiment out of three time courses performed (mean \pm SEM). **B**, Mice were sacrificed after 12 weeks of CS exposure and the expression level of CD69 on lung *i*NKT cells was determined. **C**, Lung mononuclear cells from mice exposed to CS for 1 week were restimulated with PMA/ionomycin for 3 hours. Gated *i*NKT cells were analyzed for intra-cellular IFN- γ and IL-17 production. Gates were set based on the relative isotype control. Representative dot plots are shown ($n=3$). **D**, Lung cells from mice exposed to CS for 1, 4 or 12 weeks were treated with α GalCer (100ng/ml) or not (NS, non stimulated) for 48 hrs. The concentrations of IL-17 and IFN- γ were analyzed by ELISA in the supernatants. Values represent the mean \pm SEM ($n = 5$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

***i*NKT cells are required in CS-induced airway inflammation and lung alterations**

Exposure of WT mice to CS resulted in a severe increase in lung resistance (Fig. 3A). Remarkably, both CS-exposed *Cd1d*^{-/-} mice, which lack *i*NKT and *variant* NKT cells, as well as *Jα18*^{-/-} mice, which are only devoid of *i*NKT cells, showed no changes in their lung resistance (Fig. 3A), dynamic compliance and airway elastance (supplemental Fig. 4A). CS exposure induced a significant weight loss (~15%) in WT mice, but not in (*i*)NKT cell deficient mice (supplemental Fig. 4B). Histological analysis revealed a decreased pathology in (*i*)NKT cell deficient animals (Fig. 3B). WT mice exposed to CS, but not *Cd1d*^{-/-} and *Jα18*^{-/-} mice, had enlarged alveolar spaces (emphysema) and airway remodelling associated to a mild inflammatory infiltrate. Measurements of airspace cord length were also performed to evaluate lung injuries. This was significantly increased in CS-exposed WT mice (49.7 μm ± 2.1 compared to 32.1 μm ± 1.1 in air-exposed mice, *p* < 0,001), but not in CS-exposed *Jα18*^{-/-} mice (40.6 μm ± 1.7). There is no statistical difference in airspace cord length between air- and CS-exposed *Cd1d*^{-/-} as well as *Jα18*^{-/-} mice (*p*=NS). CS exposure resulted in the infiltration of neutrophils and NK cells in the BAL (not shown) and in the lungs of WT mice (Fig 3C), as previously described (25). No significant recruitment of neutrophils and NK cells was observed after CS exposure in *Cd1d*^{-/-} and *Jα18*^{-/-} mice (Fig. 3C and not shown). CS exposure induced higher levels of *Il-17* and *Il-1b* mRNA, but this increased expression was not observed in *Jα18*^{-/-} mice (Fig. 3D and supplemental Fig. 4C). Pulmonary *Ifn-g* expression was not modulated in NKT-deficient mice exposed to CS (not shown). mRNA levels of *Mmp12*, a key mediator in smoke induced emphysema (26), were markedly induced by CS exposure in WT animals, but not in *Jα18*^{-/-} mice (Fig. 3E). Altogether, this indicated that CS-induced alterations of lung function, inflammation and emphysema strongly relied on *i*NKT cells.

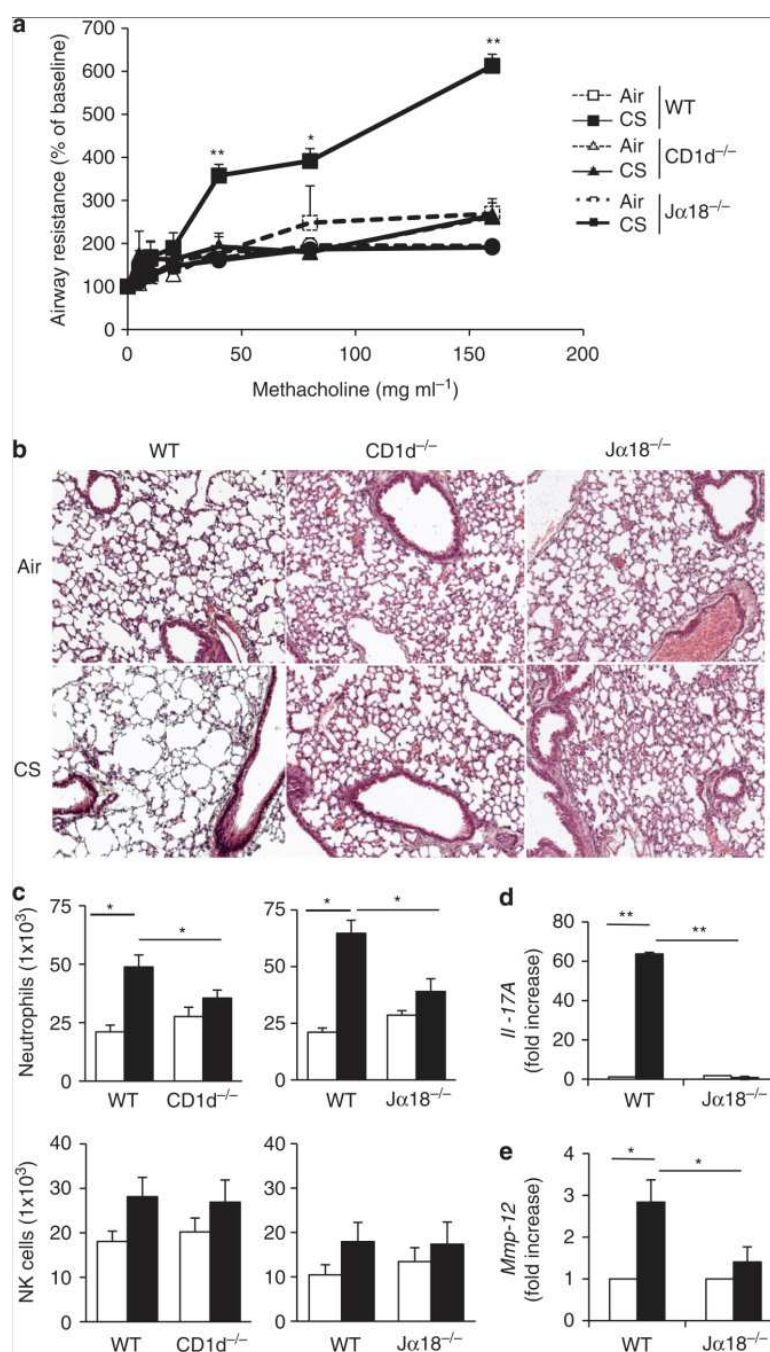


Figure 3. *i*NKT cells are essential to promote COPD features in mice.

A, Analysis of lung function decline induced by CS in *i*NKT-cell deficient mice. Age-matched WT, $J\alpha 18^{-/-}$ and $CD1d^{-/-}$ mice were exposed to CS, 5 days a week, over a period of 12 weeks. Changes in airway resistance were measured on anesthetized, tracheotomized, intubated, and mechanically ventilated mice, in response to increasing doses of methacholine. Results are expressed as the mean \pm the SEM. Results are representative of three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (WT mice vs *i*NKT-cell deficient mice). **B**, Histological analysis of lung sections from mice exposed to CS. Lungs were harvested 12 weeks post-air or CS exposure and histopathological analysis was performed on lung sections. Representative hematoxylin and eosin-stained tissue sections (magnification $\times 200$) are shown. Note that CS exposure induced lung infiltration and destruction of alveolar walls in WT mice, whereas lung structure was not changed in *i*NKT cell deficient mice. **C**, Absolute numbers of $CD45^{+} CD11c^{-} F4/80^{+} CD11b^{+} Ly6C^{+}$ neutrophils and $CD45^{+} TCR\alpha^{-} NK1.1^{+}$ NK cells were analyzed among lung mononuclear cells of mice exposed to CS for 12 weeks. Values represent the mean \pm SEM ($n=5$). **D and E**, The lungs were collected 12 weeks post-exposure, *Il-17* (**D**) and *Mmp-12* (**E**) mRNA copy numbers were determined by quantitative RT-PCR. Data are normalized to expression of *Gapdh* and are expressed as fold increased over average gene expression in air-exposed WT mice or $J\alpha 18^{-/-}$ mice, respectively ($n=5$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

***i*NKT cells mediate lung damage induced by acute exposure to CHP**

To confirm the role of *i*NKT cells in lung damage induced by oxidant stress, we developed a more acute model based on CHP treatment, a compound that specifically triggers lipid peroxidation (5). Exposure to CHP led to an enhanced frequency and number of pulmonary *i*NKT cells (Fig. 4A and B). CD69 expression was increased on *i*NKT cells (Fig. 4C). Exposure to CHP increased airway resistance (Fig. 4D), and neutrophil recruitment into the lungs (Fig. 4E). No changes in NK cells were observed (Fig. 4E). In sharp contrast, CHP-treated *J1818*^{-/-} mice displayed no change in their lung functions, and airway inflammation (Fig. 4D and E). Adoptive transfer of WT *i*NKT cells into *J1818*^{-/-} mice prior to CHP exposure resulted in a significant enhancement of airway resistance reaching levels observed in CHP-exposed WT animals, whereas negative fraction depleted in *i*NKT cells (not shown) and *Il-17*^{-/-} *i*NKT cells failed to do so (Fig. 4D). Thus, IL-17 expressing *i*NKT cells play a pivotal role in CHP-associated alterations of lung function.

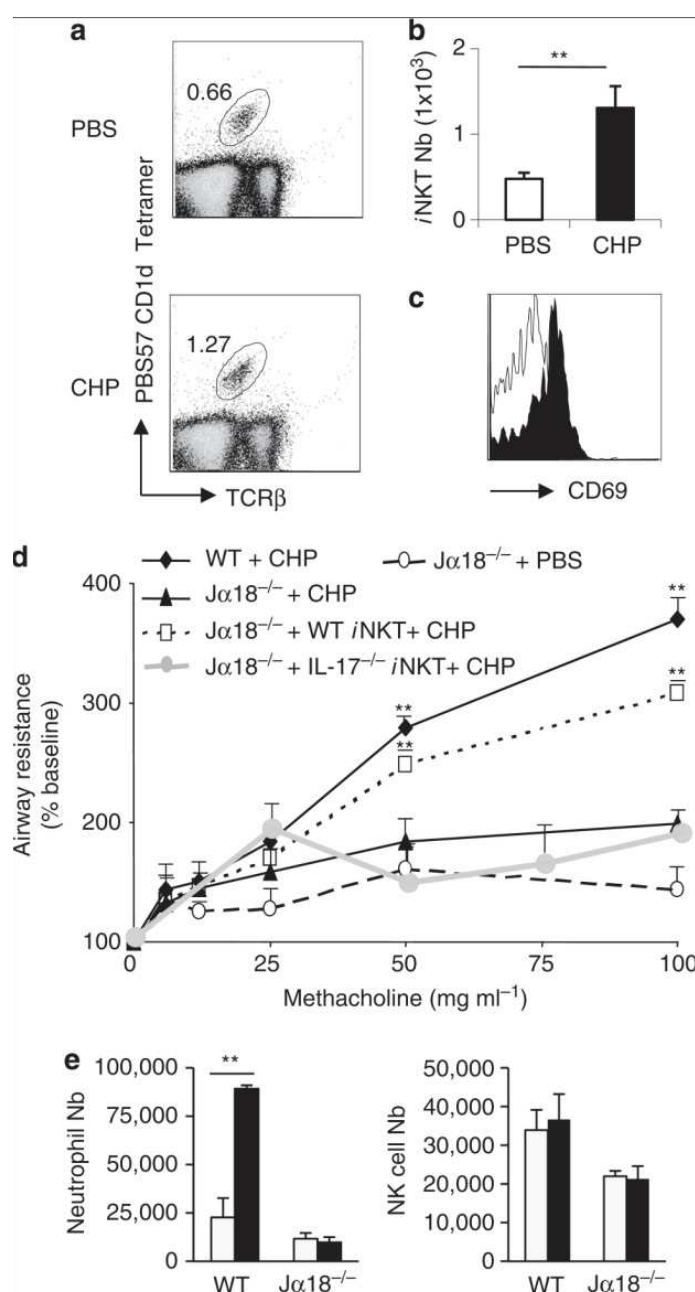


Figure 4. *i*NKT cells play a deleterious function in lung alteration induced by acute exposure to CHP.

A and B, WT mice were intranasally exposed 3 times to CHP (75 $\mu\text{g}/\text{mouse}$), and 24h after the last challenge, lung tissues were harvested and processed. The frequency (panel A) and number (panel B) of *i*NKT cells in lung tissues were determined. Data are representative of one experiment out of three performed (mean \pm SEM, $n = 4$), ** $p < 0.01$. **C**, Expression of CD69 by lung *i*NKT cells after CHP exposure. **D**, Age-matched WT or $J\alpha 18^{-/-}$ mice, either reconstituted or not with WT or *IL-17 $^{-/-}$* *i*NKT cells (1×10^6 WT *i*NKT cells/mouse, i.v. injection) were exposed to CHP. 24h after the last challenge, changes in airway resistance were measured in response to increasing doses of methacholine. Results are expressed as the mean \pm the SEM ($n = 4$) and are representative of three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. **E**, Absolute numbers of CD45 $^+$ CD11c $^-$ F4/80 $^-$ CD11b $^+$ Ly6C $^+$ neutrophils and CD45 $^+$ TCR β^- NK1.1 $^+$ NK cells were analyzed among lung mononuclear cells of mice exposed to CHP. Values represent the mean \pm SEM ($n = 4$), ** $p < 0.01$.

CSE-stressed APC stimulate *i*NKT cells

DC and macrophages play a key role in *i*NKT cells activation (10, 14). CS exposure induced a pulmonary inflammation, depicted by an increased number of total lung cells (supplemental Fig. 5A), which peaked at 2 weeks post-treatment and slowly decreased. Whilst the number of alveolar macrophages (AM) shows the same pattern, the number of respiratory DC was enhanced from 2 to 12 weeks post exposure (Fig. 5A). CS induced an up-regulation of CD40 and MHC class II (I-A) on AM and DC, a phenomenon also observed in $J\alpha 18^{-/-}$ mice (Fig. 5B and supplemental Fig. 5C). CD1d expression was enhanced on AM and DC, although not significantly for the latter (Fig. 5C).

To investigate the potential ability of AM and DC to trigger *i*NKT cell activation, we sorted AM and the two predominant lung DC subsets, namely CD11b⁺ CD103⁻ DC (referred to as CD11b⁺) and CD11b⁻ CD103⁺ DC (here referred to as CD103⁺) (supplemental Fig. 1) at 2 and 10 weeks post CS-exposure. Of interest, cell-sorted CD11b⁺ DC, but not CD103⁺ DC, nor AM, expressed higher levels of *Il-12p40* and *Cd1d* transcripts (Fig. 5D), two crucial factors for *i*NKT cell activation (14). The expression of *Il-23p19* was unchanged in these cells (not shown), whereas it was increased in the total lungs (supplemental Fig. 6A). The transcript level of *Ugcg* and to a lesser extent *St3gal5*, both enzymes initiating biosynthesis of glycolipids activators of *i*NKT cells (27), was enhanced in CD11b⁺ DC, but not in CD103⁺ DC or AM (Fig. 5D). *St3gal5* expression was increased in the lungs of CS-exposed animals (supplemental Fig. 6B).

To assess the possibility that CS directly drives DC to stimulate *i*NKT cells, BM-DC were exposed to CS extracts (CSE) *in vitro* and next co-cultured with sorted primary *i*NKT cells. Compared to unstimulated BM-DC, CSE-treated BM-DC triggered IL-17 and IFN- γ production by *i*NKT cells (Fig. 5E) although at a lower level compared to α -GalCer (not shown). Among structural pulmonary cells, AEC are numerous and are directly in contact with aero-pollutants. We therefore investigated the possibility that AEC might be important in *i*NKT cell activation. Primary mouse AEC exposed to α -GalCer induced in a CD1d-dependant manner the production of IL-2 by DN32 *i*NKT hybridoma and mainly IL-4 by sorted splenic *i*NKT cells (supplemental Fig. 7). In addition mouse AEC exposed to CSE had the potential to induce IFN- γ , but not IL-17, production by *i*NKT cells (Fig. 5F and not shown). These data showed that CS exposure in mice primed DC and AEC, to activate *i*NKT cells.

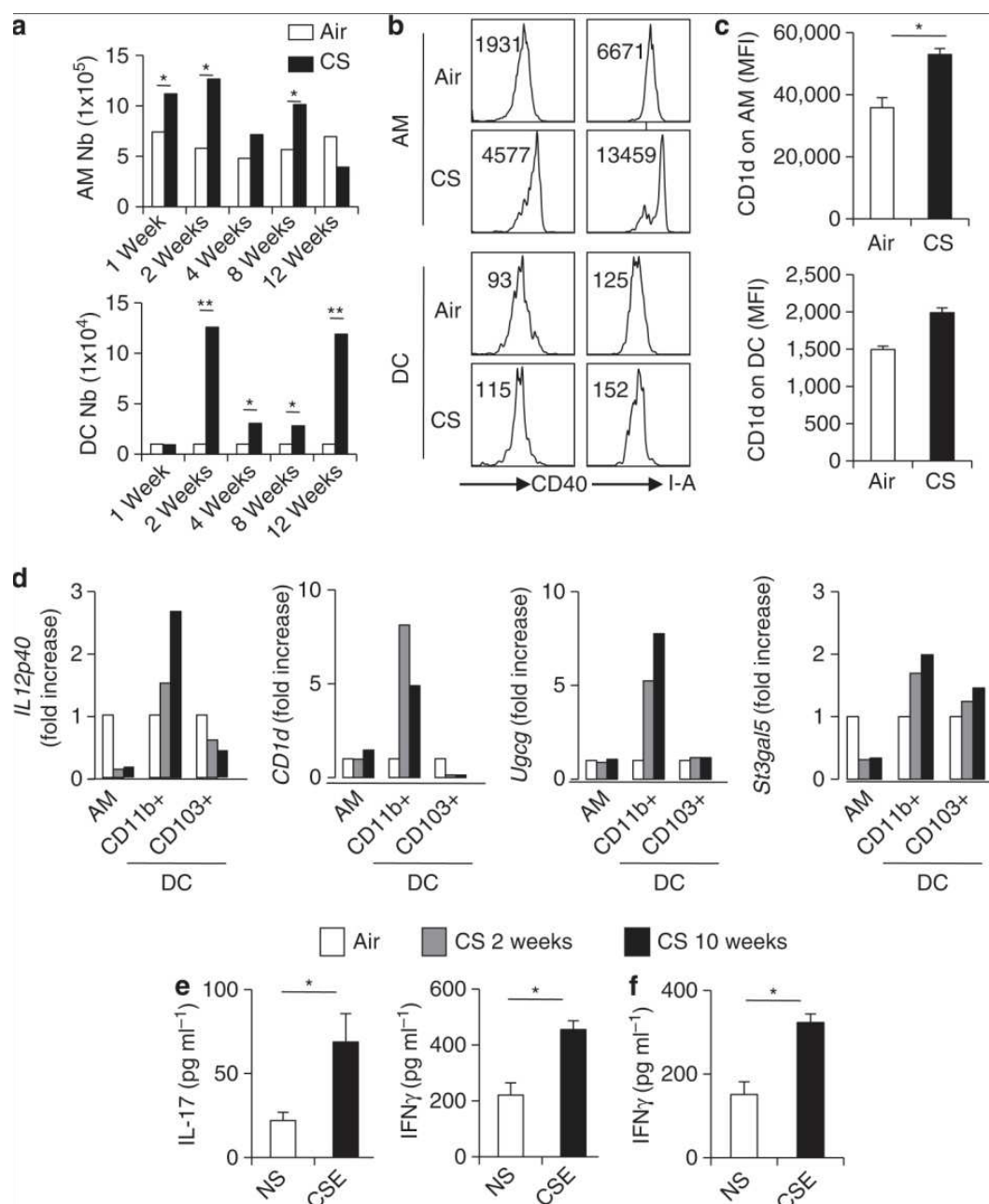


Figure 5. Respiratory APCs isolated from CS-exposed mice activate iNKT cells.

A, Twelve weeks after CS exposure, the number of alveolar macrophages (AM) (CD45⁺ CD11c⁺ F4/80⁺) and DC (CD45⁺ CD11c⁺ F4/80⁻) in the lung compartment were determined. Data are representative of one experiment out of three performed (mean \pm SEM, n = 6). **B**, Activation status of lung DC and AM. Representative histograms of CD40 and I-A on AM and DC are shown. MFI are represented on the dot plots. **C**, Expression of CD1d on AM and DC. Data are representative of one experiment out of three performed (mean \pm SEM, n = 6). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. **D**, Pulmonary AM, CD11b⁺ DC and CD103⁺ DC were sorted from air- or CS-exposed mice (2 or 10 weeks post-treatment), RNA samples were prepared and *IL-12p40*, *CD1d*, glucosylceramide synthase *Ugcg* and GM3 synthase *St3gal5* mRNA expression were measured by quantitative RT-PCR. Data are normalized to expression of *Gapdh* and are expressed as fold increased over average gene expression in air-exposed mice. Each group is a pool of cells from ten mice and is representative of three independent experiments. **E**, BM-DC were differentiated and exposed or not to CSE overnight before coculture with sorted iNKT cells. IL-17 and IFN- γ levels were measured by ELISA in the coculture supernatants 48h later. Data represent the mean \pm SEM of three independent experiments performed in triplicate. * $p < 0.05$.

Human CSE-stressed DC and AEC stimulate *i*NKT cells

We next aimed to validate these results using human cells. Both DC and AEC were exposed to CS and cocultured with *i*NKT cell lines. CSE-treated DC induced IFN- γ and IL-17 release by *i*NKT cells (Fig. 6A *right*). In contrast, CSE-treated AEC only induced IFN- γ production (Fig. 6A *left*).

Exposure to CSE enhanced mRNA expression of *UGCG* and *ST3GAL5*, and of the oxidation markers, NADPH Deshydrogenase Quinone-1 (*NQO-1*) and heme-Oxygenase-1 (*HO-1*) (Fig. 6B and supplemental Fig. 8) with a different time course in both DC and AEC. To test the implication of oxidative stress in *i*NKT cell activation, APC were pre-treated with the antioxidant N-AcetylCystein (NAC). NAC-pretreatment of CSE-exposed DC and AEC strongly diminished *i*NKT cell activation (Fig. 6C). This was associated with a strong decrease in levels of *HO-1* and *UGCG* in APC (Fig. 6D and supplemental Fig. 8). These data show that human DC and AEC exposed to CS-induced oxidative stress trigger *i*NKT cell activation.

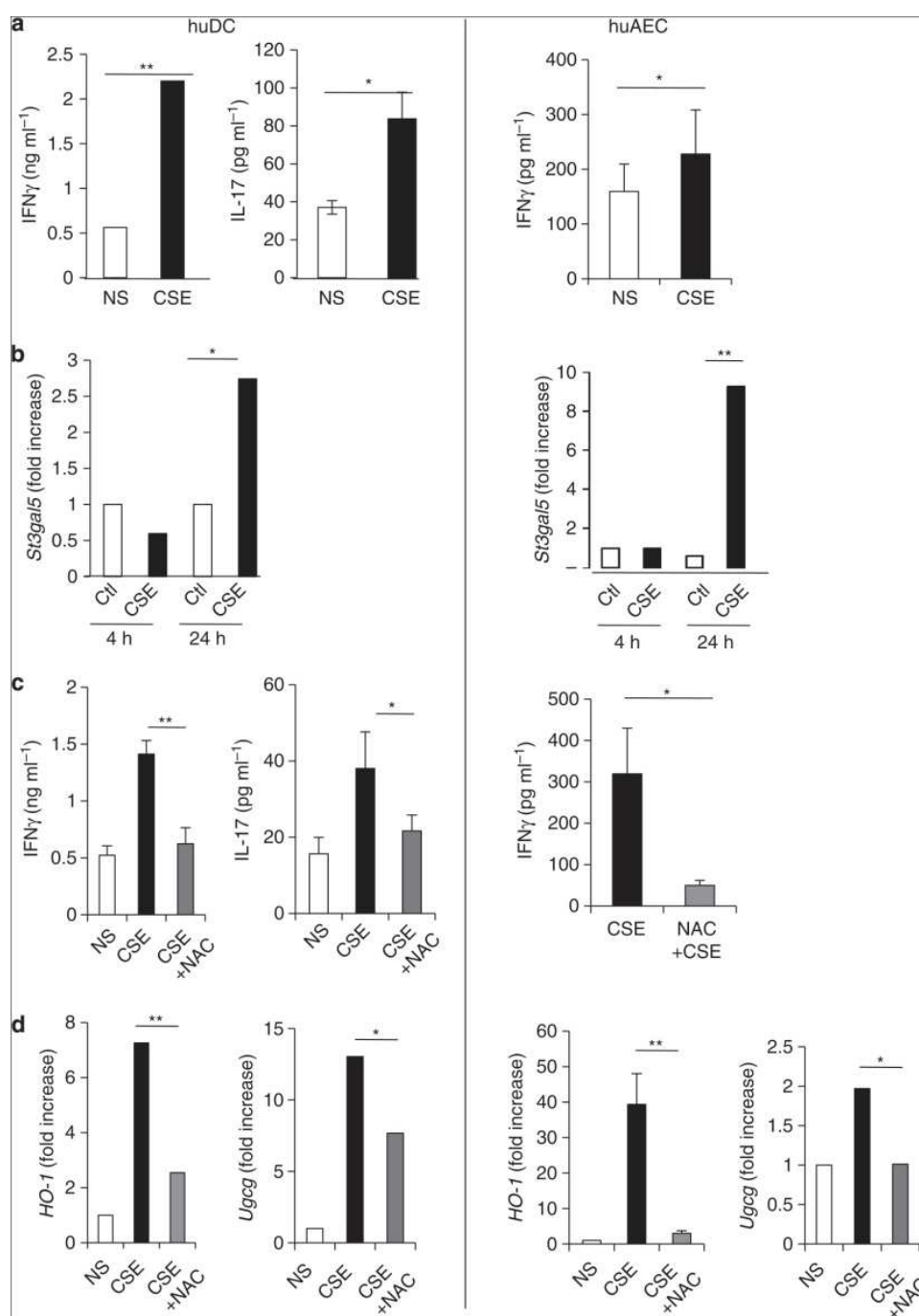


Figure 6. Human *i*NKT cells are activated by CS-exposed huDC and huAEC.

A, Human monocyte-derived DC (left column) or lung epithelial cells (right column) were exposed, or not, to CSE for 24 hours. After washes, cells were co-cultured with primary CD3⁺ 6B11⁺ *i*NKT cells. IL-17 and IFN- γ were measured by ELISA. Data represent the mean \pm SEM of three independent experiments performed in triplicate. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. **B**, DC and AEC were collected 4 and 24h after CSE exposure, RNA extracts were prepared, and *St3gal5* synthase mRNA copy numbers were measured by quantitative RT-PCR. Data are normalized to expression of β -actin and are expressed as fold increased over average gene expression in air-exposed cells. **C**, DC and AEC were pretreated with NAC (0.5 mM) for one hour prior CSE-exposure for 24h. After washes, cells were cocultured with primary *i*NKT cells. IL-17 and IFN- γ were measured by ELISA. Data represent the mean \pm SEM of three independent experiments performed in triplicate. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. **D**, DC and AEC were treated with NAC for one hour, and then exposed to CSE for 24h. RNA extracts were prepared, and *HO-1* and *Ugcg* mRNA copy numbers were measured by quantitative RT-PCR. Data are normalized to expression of β -actin and are expressed as fold increased over average gene expression in air-exposed cells. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

NAC prevents CS-induced decline in lung functions and *i*NKT cell activation

To establish a link between oxidative stress, *i*NKT cell activation and decreased lung functions, mice were treated with NAC during the course of chronic CS exposure. NAC treatment limited the alteration of lung function (Fig. 7A and supplemental Fig. 8). CS-exposed animals treated with NAC displayed less airway remodelling, as depicted by a reduced alveolar enlargement (Fig. 7B). NAC treatment significantly reduced the airspace cord length (from $49.7 \mu\text{m} \pm 2.1$ in CS exposed mice to $37.2 \mu\text{m} \pm 1.2$ in CS exposed NAC treated mice, $p < 0,001$). This was associated with a reduced expression of *Mmp12* in the lung (data not shown). Administration of NAC reduced the weight loss due to CS exposure (Fig. 7C). NAC treatment also prevented the accumulation and the increased expression of CD69 on pulmonary *i*NKT cells (Fig. 7D). In response to α GalCer, the level of IL-17 in supernatants from lung cells was reduced by 75% in the CS-exposed group receiving NAC, whereas no changes were observed for IFN- γ and IL-4 (Fig. 7E). Of note, upon CD3 Ab restimulation, NAC decreased both IFN- γ and IL-17 release in lung cells (Fig. 7E). These data showed that the anti-oxidant NAC prevents the mobilization and the activation of *i*NKT cells in CS-exposed mice, an effect that is associated with improved lung function and decreased pathogenesis.

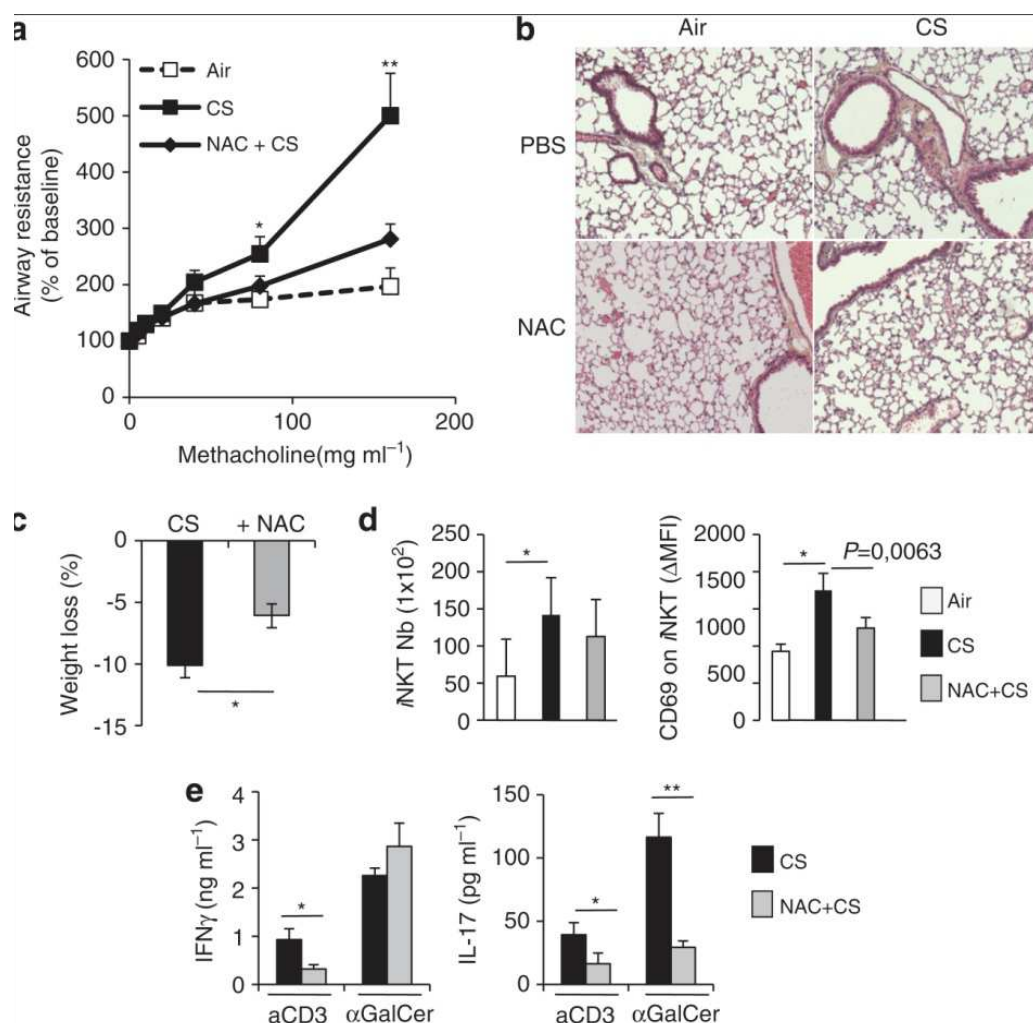


Figure 7. NAC prevents the recruitment/activation of iNKT cells and reduced COPD features induced by CS exposure.

WT mice treated or not with NAC in the drinking water were exposed to CS and compared to air mice. **A**, Changes in airway resistance were measured after 12 weeks in response to increasing doses of methacholine. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. **B**, Representative hematoxylin and eosin-stained lung sections (magnification x 200) are shown. **C**, Weight loss percentages of CS- and NAC+CS- exposed mice compared to air mice are shown. * $p < 0.05$. **D**, The number of iNKT cells and the expression of CD69 on iNKT cells are depicted. Data represent the mean \pm SEM of three independent experiments performed in triplicate. * $p < 0.05$. **E**, Lung cell suspensions from mice exposed to CS, with or without NAC treatment, were cultured for 48h in presence of anti-CD3 Abs or α -GalCer. Cytokine levels were analyzed in supernatants by ELISA. Data represent the mean \pm SEM of three independent experiments performed in triplicate. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

5. DISCUSSION

Oxidative stress induced by CS is part of the mainstay of COPD pathophysiology. This study for the first time demonstrates that *i*NKT cells are detrimental in experimental COPD, a phenomenon that can be reversed by abrogating oxidative stress *in vivo*. We also report that lung damage induced by acute exposure to CHP, another oxidative stress inducer, is dependent on *i*NKT cells. Finally, we report that DC and AEC are important sensors of oxidative stress mediated by CS and that downstream pathways triggered in these cells lead to *i*NKT cell activation.

CS contains a myriad of oxidant compounds inducing the production of deleterious ROS causing airway inflammation and loss of lung functions (7, 28, 29). Our COPD model showed an accumulation of *i*NKT cells in the lungs as early as 1 week post CS-exposure. These data are in line with recent studies showing the presence of *i*NKT cells in the BAL and induced sputum of COPD patients and in blood as shown in the present study (20-23). In contrast, Chi *et al.* and Vijayanand *et al.* showed that the frequencies of peripheral blood and alveolar CD3⁺ 6B11⁺ *i*NKT cells are significantly lower in patients with stable COPD, a finding that might be explained by the less stringent method used to identify NKT cells (30, 31). The present study highlights the need for a more complete assessment of the innate immune response. To establish a role for NKT cells in COPD, we analyzed NKT cells in the mouse model in combination with human patients. As reported here, *i*NKT cells displayed an activated phenotype (CD69), both in the blood of COPD patients and during the course of chronic exposure to CS in mice. Furthermore, whenever the time point, *i*NKT cells from CS-exposed mice produced enhanced levels of cytokines (mainly IL-17) upon stimulation. These results collectively indicate that *i*NKT cells are recruited, or locally expand, in the lungs and express an activated phenotype (Th17 bias) early during COPD.

The potential role of *i*NKT cells in COPD was next investigated. The absence of *i*NKT cells (*Cd1d*^{-/-} and *Ja18*^{-/-} mice) abolished most of the features of COPD pathogenesis. The absence of *i*NKT cells reduced IL-17 production and neutrophil recruitment, the latter being important in the pathophysiology of COPD (32, 33). In parallel, *i*NKT cell-deficient animals were protected against lung damage caused by acute CHP exposure, a phenotype restored by adoptive transfer of IL-17 competent *i*NKT cells. Since the lack of *i*NKT cells only reduced IL-17 in the lungs of COPD mice and neutralizing anti-IL-17 antibodies inhibit the development of COPD (33), *i*NKT cell-derived IL-17, rather than IFN- γ , might be instrumental in experimental COPD. We hypothesize that *i*NKT cell-derived IL-17 may participate in the recruitment of neutrophils and in the generation of deleterious proteases, including MMP12. Moreover, *i*NKT cells act as upstream activators of NK cells, other innate cells recently described to play part in COPD (34). Pulmonary NKT cells play also an essential role in mediating hypoxic acute lung injury (35). Our previous findings have revealed the deleterious role of *i*NKT cells in lung functions after ozone exposure, another oxidant (19), a phenomenon due to Th2-type cytokine production, whereas during COPD (and after CHP treatment, not shown) *i*NKT cells produced IFN- γ and IL-17. We postulate that, according to the type of oxidative stress, different subpopulations and/or pathways can be selected and/or induced in *i*NKT cells to impair lung functions. A better

understanding of the mechanisms by which *i*NKT cells exert their detrimental effects during COPD is required in the future.

We next sought to decipher the mechanisms of CS-dependent activation of *i*NKT cells. *i*NKT cells can be stimulated by the mobilization of their TCR and/or by cytokines produced by stressed APC, particularly IL-1 β , IL-12 and IL-23 (9, 27). Analysis of lung APC subsets from COPD mice indicated that CD11b⁺ DC strongly matured and expressed markers associated with *i*NKT cell activation, including CD1d, IL-1 β and IL-12. Modulation of expression of some glycosyltransferases involved in lipid metabolism in APC is associated with *i*NKT cell activation through the presentation of self glycolipids by CD1d (27, 36, 37). Of interest, the mRNA level of *Ugcg*, a key enzyme implicated in the generation of endogenous *i*NKT cell ligands, was strongly induced in CD11b⁺ DC during COPD. Importantly, the capacity of CSE-exposed DCs to activate *i*NKT cells was confirmed *in vitro*, both in the mouse and human systems. Whilst DC are critical activators of *i*NKT cells, other lung cells such as AEC can express CD1d (38), although their potential capacity to activate *i*NKT cells has not yet been examined. We herein showed that both mouse and human AEC sense CSE to trigger *i*NKT cell activation. Whilst DC induced both IFN- γ and IL-17 release, CSE-treated AEC only induced IFN- γ production. The mechanisms responsible for *i*NKT cell activation in response to CSE-exposed sentinel cells are still unknown and worth of future investigations. Our preliminary data using transwells and neutralizing anti-CD1d Abs suggest a major role for both membrane-bound molecules and a complementary participation of soluble factors in *i*NKT cell activation. The differential expression of activating factors by CSE-stressed DC vs AEC might explain the different profile of cytokines released by *i*NKT cells. Whatever the mechanisms, our data clearly show a direct link between oxidative stress and *i*NKT cell stimulation since NAC treatment ablated the capacity of CSE-treated DC and AEC to activate *i*NKT cells. Since NF- κ B activation is a hallmark of CS-induced oxidative stress in APC (39), it is possible that NF- κ B –mediated expression of cytokines, CD1d and/or glycosyltransferases is involved in *i*NKT cell activation.

In vivo preventive NAC-treatment reversed COPD symptoms. This protective effect was associated with a reduced accumulation and activation of *i*NKT cells, demonstrating the intricate between oxidative stress, *i*NKT cells and COPD. These data might explain some of the beneficial effects of anti-oxidant treatment in COPD patients (29). Indeed NAC affects different signaling pathways, such as NF- κ B and MAPK in APC (40), that could in turn alter *i*NKT cell cytokine production, and lead to decrease COPD symptoms,

Altogether, our data identified of a new pathogenic mechanism leading to COPD. Elucidating the mechanisms by which oxidative stress activates *i*NKT cells will be important for the understanding of COPD physiopathology. Direct targeting of APC may provide a potent therapeutic strategy for specifically dampening *i*NKT cell activation and controlling lung damage due to COPD.

Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

Acknowledgment

We acknowledge the generous support from the NIAID Tetramer Facility (Emory University, Atlanta, GA) for supplying CD1d tetramers. We gratefully acknowledge Drs T. Nakayama and M. Taniguchi (RIKEN Institute, Yokohama, Japan) for the gift of *Jα18^{-/-}* C57BL/6 mice, Dr L. Van Kaer (Vanderbilt University, Nashville, TN) for *Cd1d^{-/-}* mice, and Dr B. Ryffel (Orléans, France) for the *Il-17^{-/-}* mice. We also thank Eva Vilain and Gwenola Kervoaze for their excellent technical assistance, and Emeric Deruy (MicPal Plateform, Institut Pasteur de Lille, France) for his help on cell sorting on FACS Aria Flow Cytometer. This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), the CNRS, the University of Lille Nord de France, the Pasteur Institute of Lille, and the Region Nord-Pas-de-Calais.

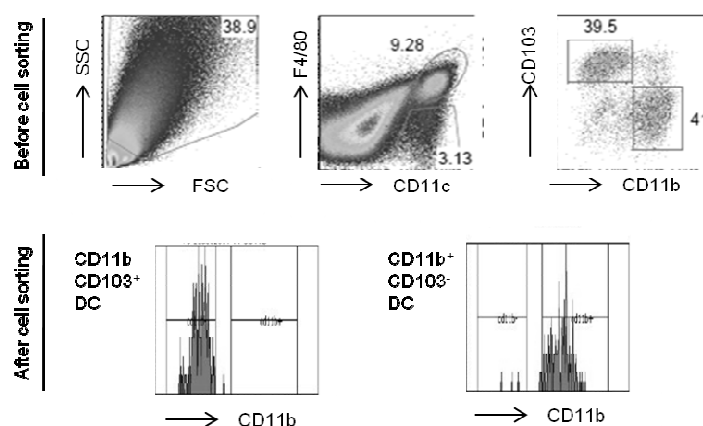
6. REFERENCES

1. Rabe, K.F., S. Hurd, A. Anzueto, P.J. Barnes, S.A. Buist, P. Calverley, Y. Fukuchi, C. Jenkins, R. Rodriguez-Roisin, C. van Weel, and J. Zielinski. 2007. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med* 176:532-555.
2. Lopez, A.D., and C.C. Murray. 1998. The global burden of disease, 1990-2020. *Nat Med* 4:1241-1243.
3. Mannino, D.M., and A.S. Buist. 2007. Global burden of COPD: risk factors, prevalence, and future trends. *Lancet* 370:765-773.
4. Church, D.F., and W.A. Pryor. 1985. Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ Health Perspect* 64:111-126.
5. Weiss, R.H., and R.W. Estabrook. 1986. The mechanism of cumene hydroperoxide-dependent lipid peroxidation: the significance of oxygen uptake. *Arch Biochem Biophys* 251:336-347.
6. Bosken, C.H., J. Hards, K. Gatter, and J.C. Hogg. 1992. Characterization of the inflammatory reaction in the peripheral airways of cigarette smokers using immunocytochemistry. *Am Rev Respir Dis* 145:911-917.
7. Kinnula, V.L. 2005. Focus on antioxidant enzymes and antioxidant strategies in smoking related airway diseases. *Thorax* 60:693-700.
8. D'Hulst A, I., T. Maes, K.R. Bracke, I.K. Demedts, K.G. Tournoy, G.F. Joos, and G.G. Brusselle. 2005. Cigarette smoke-induced pulmonary emphysema in scid-mice. Is the acquired immune system required? *Respir Res* 6:147.
9. Kronenberg, M. 2005. Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes. *Annu Rev Immunol* 23:877-900.
10. Brutkiewicz, R.R. 2006. CD1d ligands: the good, the bad, and the ugly. *J Immunol* 177:769-775.
11. Michel, M.L., A.C. Keller, C. Paget, M. Fujio, F. Trottein, P.B. Savage, C.H. Wong, E. Schneider, M. Dy, and M.C. Leite-de-Moraes. 2007. Identification of an IL-17-producing NK1.1(neg) iNKT cell population involved in airway neutrophilia. *J Exp Med* 204:995-1001.
12. Hodge, G., S. Hodge, C. Li-Liew, P.N. Reynolds, and M. Holmes. Increased natural killer T-like cells are a major source of pro-inflammatory cytokines and granzymes in lung transplant recipients. *Respirology* 17:155-163.
13. Hodge, S., G. Hodge, J. Nairn, M. Holmes, and P.N. Reynolds. 2006. Increased airway granzyme b and perforin in current and ex-smoking COPD subjects. *Copd* 3:179-187.
14. Bendelac, A., P.B. Savage, and L. Teyton. 2007. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol* 25:297-336.
15. Mercer, J.C., M.J. Ragin, and A. August. 2005. Natural killer T cells: rapid responders controlling immunity and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 37:1337-1343.
16. Nieuwenhuis, E.E., T. Matsumoto, M. Exley, R.A. Schleipman, J. Glickman, D.T. Bailey, N. Corazza, S.P. Colgan, A.B. Onderdonk, and R.S. Blumberg. 2002. CD1d-dependent macrophage-mediated clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from lung. *Nat Med* 8:588-593.
17. Akbari, O., P. Stock, E. Meyer, M. Kronenberg, S. Sidobre, T. Nakayama, M. Taniguchi, M.J. Grusby, R.H. DeKruyff, and D.T. Umetsu. 2003. Essential role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med* 9:582-588.
18. Lisbonne, M., S. Diem, A. de Castro Keller, J. Lefort, L.M. Araujo, P. Hachem, J.M. Fourneau, S. Sidobre, M. Kronenberg, M. Taniguchi, P. Van Endert, M. Dy, P. Askenase, M. Russo, B.B. Vargaftig, A. Herbelin, and M.C. Leite-de-Moraes. 2003. Cutting edge: invariant V alpha 14 NKT cells are required for allergen-induced airway inflammation and hyperreactivity in an experimental asthma model. *J Immunol* 171:1637-1641.
19. Pichavant, M., S. Goya, E.H. Meyer, R.A. Johnston, H.Y. Kim, P. Matangkasombut, M. Zhu, Y. Iwakura, P.B. Savage, R.H. DeKruyff, S.A. Shore, and D.T. Umetsu. 2008. Ozone exposure in a mouse model induces airway hyperreactivity that requires the presence of natural killer T cells and IL-17. *J Exp Med* 205:385-393.
20. Kim, E.Y., J.T. Battaile, A.C. Patel, Y. You, E. Agapov, M.H. Grayson, L.A. Benoit, D.E. Byers, Y. Alevy, J. Tucker, S. Swanson, R. Tidwell, J.W. Tyner, J.D. Morton, M. Castro, D. Polineni, G.A. Patterson, R.A. Schwendener, J.D. Allard, G. Peltz, and M.J. Holtzman. 2008. Persistent activation of an innate immune response translates respiratory viral infection into chronic lung disease. *Nat Med* 14:633-640.
21. Hodge, G., V. Mukaro, M. Holmes, P.N. Reynolds, and S. Hodge. Enhanced cytotoxic function of natural killer and natural killer T-like cells associated with decreased CD94 (Kp43) in the chronic obstructive pulmonary disease airway. *Respirology* 18:369-376.
22. Urbanowicz, R.A., J.R. Lamb, I. Todd, J.M. Corne, and L.C. Fairclough. Enhanced effector function of cytotoxic cells in the induced sputum of COPD patients. *Respir Res* 11:76.

23. Wang, J., R.A. Urbanowicz, P.J. Tighe, I. Todd, J.M. Corne, and L.C. Fairclough. Differential activation of killer cells in the circulation and the lung: a study of current smoking status and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *PLoS One* 8:e58556.
24. Martin, T.R., N.P. Gerard, S.J. Galli, and J.M. Drazen. 1988. Pulmonary responses to bronchoconstrictor agonists in the mouse. *J Appl Physiol* 64:2318-2323.
25. Motz, G.T., B.L. Eppert, B.W. Wortham, R.M. Amos-Kroohs, J.L. Flury, S.C. Wesselkamper, and M.T. Borchers. Chronic cigarette smoke exposure primes NK cell activation in a mouse model of chronic obstructive pulmonary disease. *J Immunol* 184:4460-4469.
26. Hunninghake, G.M., M.H. Cho, Y. Tesfaigzi, M.E. Soto-Quiros, L. Avila, J. Lasky-Su, C. Stidley, E. Melen, C. Soderhall, J. Hallberg, I. Kull, J. Kere, M. Svartengren, G. Pershagen, M. Wickman, C. Lange, D.L. Demeo, C.P. Hersh, B.J. Klanderman, B.A. Raby, D. Sparrow, S.D. Shapiro, E.K. Silverman, A.A. Litonjua, S.T. Weiss, and J.C. Celedon. 2009. MMP12, lung function, and COPD in high-risk populations. *N Engl J Med* 361:2599-2608.
27. Paget, C., T. Mallevaey, A.O. Speak, D. Torres, J. Fontaine, K.C. Sheehan, M. Capron, B. Ryffel, C. Faveeuw, M. Leite de Moraes, F. Platt, and F. Trottein. 2007. Activation of invariant NKT cells by toll-like receptor 9-stimulated dendritic cells requires type I interferon and charged glycosphingolipids. *Immunity* 27:597-609.
28. Rahman, I., and I.M. Adcock. 2006. Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. *Eur Respir J* 28:219-242.
29. Rahman, I., and I. Kilty. 2006. Antioxidant therapeutic targets in COPD. *Curr Drug Targets* 7:707-720.
30. Chi, S.Y., H.J. Ban, Y.S. Kwon, I.J. Oh, K.S. Kim, Y.I. Kim, Y.C. Kim, and S.C. Lim. Invariant natural killer T cells in chronic obstructive pulmonary disease. *Respirology* 17:486-492.
31. Vijayanand, P., G. Seumois, C. Pickard, R.M. Powell, G. Angco, D. Sammut, S.D. Gadola, P.S. Friedmann, and R. Djukanovic. 2007. Invariant natural killer T cells in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 356:1410-1422.
32. Alcorn, J.F., C.R. Crowe, and J.K. Kolls. TH17 cells in asthma and COPD. *Annu Rev Physiol* 72:495-516.
33. Shen, N., J. Wang, M. Zhao, F. Pei, and B. He. Anti-interleukin-17 antibodies attenuate airway inflammation in tobacco-smoke-exposed mice. *Inhal Toxicol* 23:212-218.
34. Brusselle, G.G., G.F. Joos, and K.R. Bracke. New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 378:1015-1026.
35. Nowak-Machen, M., M. Schmelzle, D. Hanidziar, W. Junger, M. Exley, L. Otterbein, Y. Wu, E. Csizmadia, G. Doherty, M. Sitkovsky, and S.C. Robson. Pulmonary NKT Cells Play an Essential Role in Mediating Hyperoxic Acute Lung Injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*
36. Hercend, T., S. Meuer, A. Brennan, M.A. Edson, O. Acuto, E.L. Reinherz, S.F. Schlossman, and J. Ritz. 1984. Natural killer-like function of activated T lymphocytes: differential blocking effects of monoclonal antibodies specific for a 90-kDa clonotypic structure. *Cell Immunol* 86:381-392.
37. Schumann, J., F. Facciotti, L. Panza, M. Michieletti, F. Compostella, A. Collmann, L. Mori, and G. De Libero. 2007. Differential alteration of lipid antigen presentation to NKT cells due to imbalances in lipid metabolism. *Eur J Immunol* 37:1431-1441.
38. Dougan, S.K., A. Kaser, and R.S. Blumberg. 2007. CD1 expression on antigen-presenting cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 314:113-141.
39. Brown, V., J.S. Elborn, J. Bradley, and M. Ennis. 2009. Dysregulated apoptosis and NFkappaB expression in COPD subjects. *Respir Res* 10:24.
40. Gosset, P., B. Wallaert, A.B. Tonnel, and C. Fourneau. 1999. Thiol regulation of the production of TNF-alpha, IL-6 and IL-8 by human alveolar macrophages. *Eur Respir J* 14:98-105.

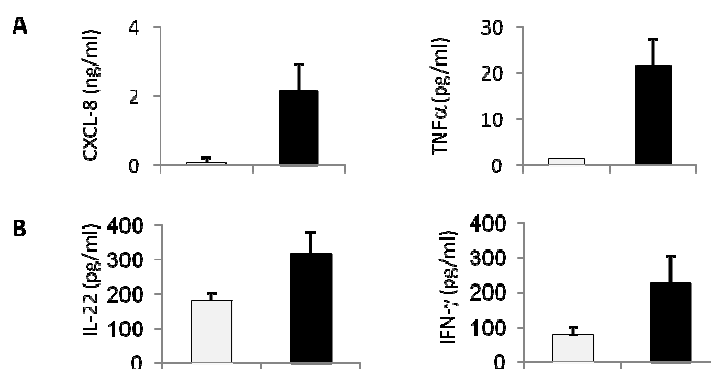
7. [Supplementary Datas](#)

Supplemental Figure 1



Supplemental Figure 1- Gating strategy for pulmonary APC sorting in murine lung. Large cells were selected based on the FSC/SSC dot plot. Alveolar macrophages (AM) and dendritic cell (DC) were identified as CD11c⁺ F4/80⁺ cells and CD11c⁺ F4/80⁻ cells respectively. Pulmonary DC were next separated into 2 subsets: CD11b⁺ CD103⁻ and CD11b⁻ CD103⁺ DC. DC phenotype was checked after cell sorting (lower panel).

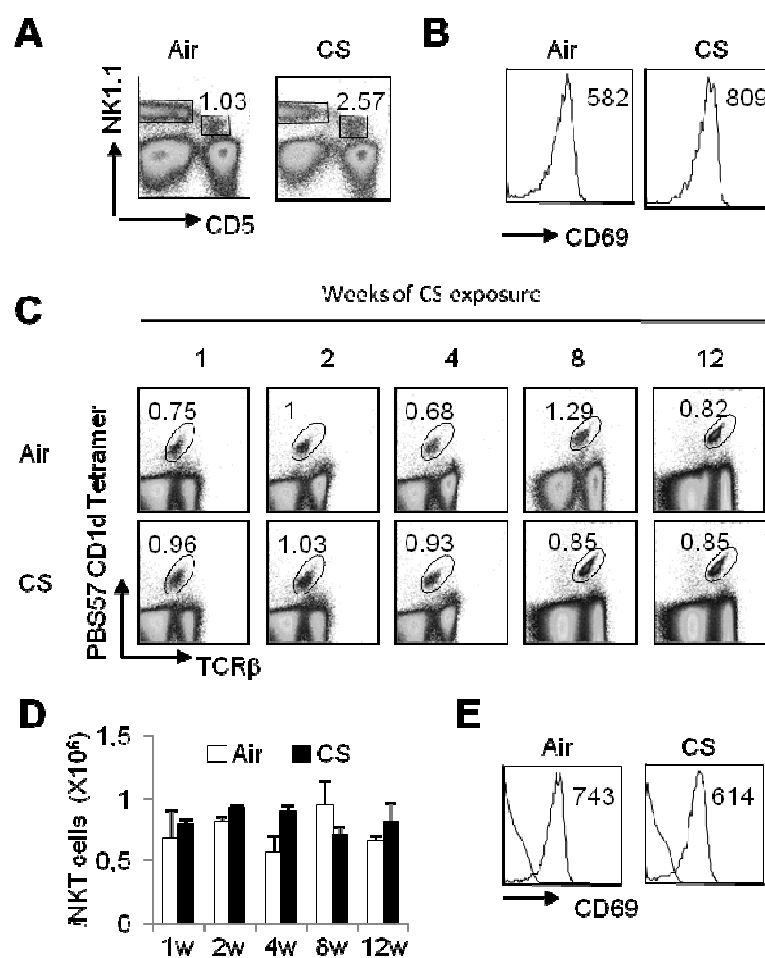
Supplemental Figure 2



Supplemental Figure 2. Characterization of cytokines in human fluids of control donors and COPD patients.

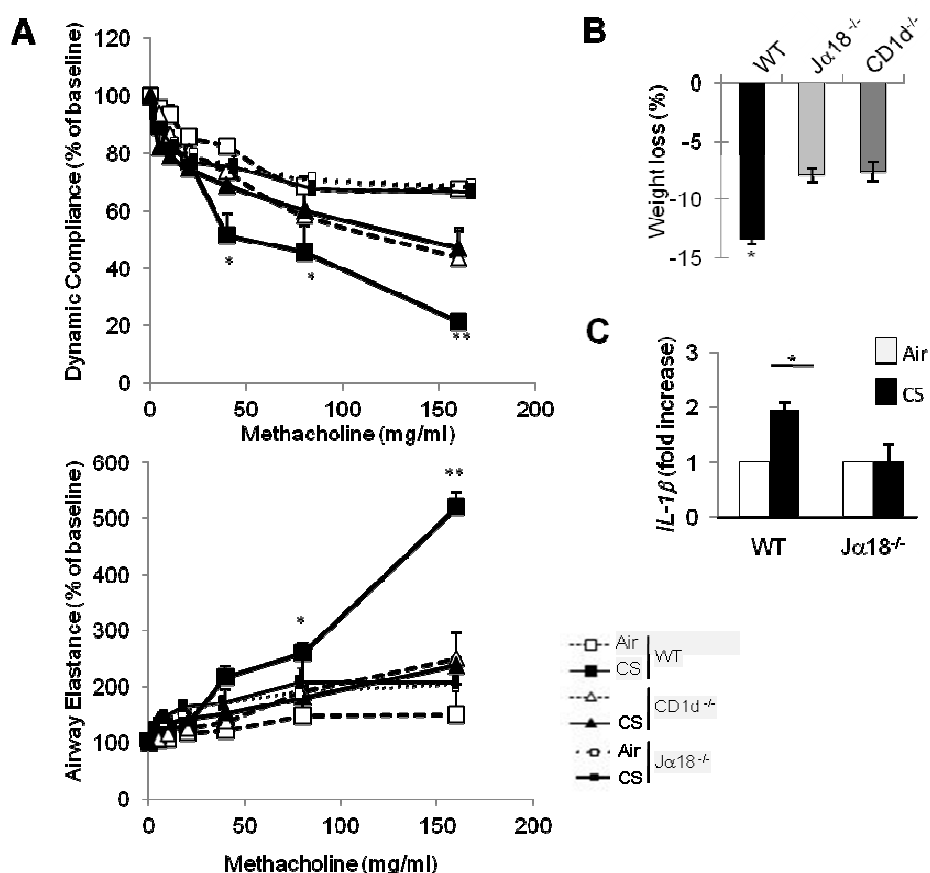
A, Lung inflammation in COPD patients compared to controls. CXCL-8 and TNF- α levels were evaluated by ELISA in sputum of control donors (white bars) and COPD patients (black bars). Data represent the mean \pm SEM of 7 controls and 28 COPD patients. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. **B**, Production of IL-22 and IFN- γ was evaluated by ELISA in blood mononuclear cells from controls and COPD patients, after 24 hour culture. Data represent the mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Supplemental Figure 3



Supplemental Figure 3- CS exposure enhances the number of activated NKT cells in the lungs, but not in the spleen in mice. *A and B*, The frequency and the expression level of CD69 on CD45⁺ CD5⁺ NK1.1⁺ NKT-like cells in lung tissues were determined 12 wk post CS-exposure. Data are representative of one experiment out of three performed. *C and D*, The frequency and the number of splenic NKT cells was determined in a kinetic manner. Data are expressed as mean ± SEM. *E*, The expression level of CD69 on splenic NKT cells is shown (12 wk post CS-exposure).

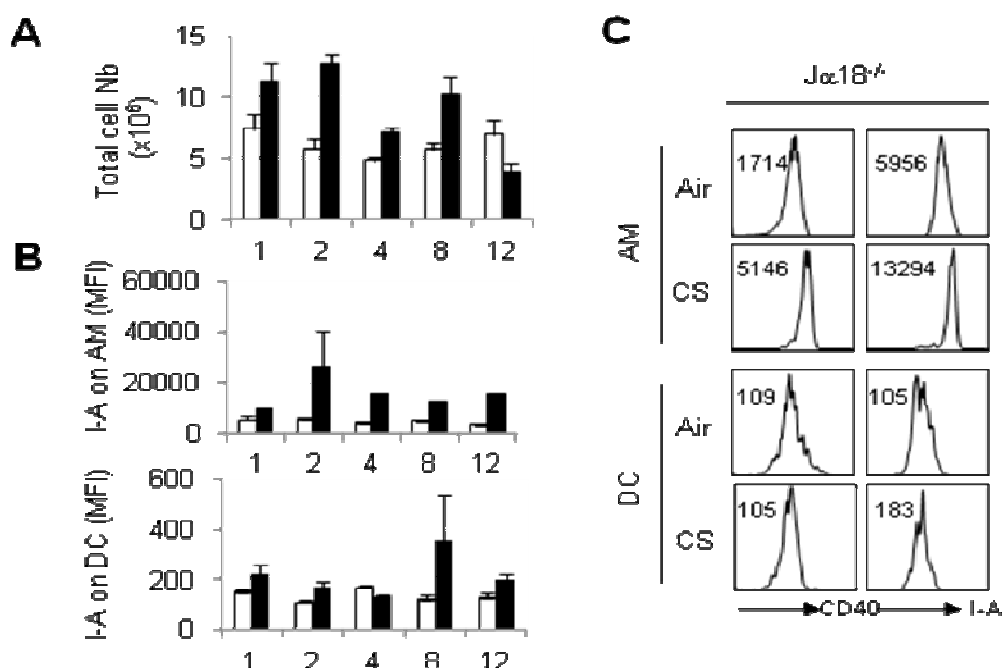
Supplemental Figure 4



Supplemental Figure 4- *i*NKT cells are essential to promote COPD features in mice.

A, Analysis of lung function decline induced by CS in *i*NKT-cell deficient mice. Age-matched WT, Ja18^{-/-} and CD1d^{-/-} mice were exposed to CS, 5 days a week, over a period of 12 weeks. Changes in dynamic compliance and airway elastance were measured on mechanically ventilated mice, in response to increasing doses of methacholine (week 12 post-CS exposure). Data are expressed as mean \pm SEM. Results are representative of three independent experiments. **, $p \leq 0.01$; *, $p \leq 0.05$ (WT mice vs *i*NKT-cell deficient mice). **B**, Percentage of weight loss after 12 weeks of CS exposure compared to the air groups in WT, Ja18^{-/-} and CD1d^{-/-} mice. Data are expressed as mean \pm SEM (n= 7-10 per group). **C**, Lungs were collected 12 weeks post-exposure to CS, *IL-1b* mRNA expression were determined by quantitative RT-PCR. Data are normalized to expression of *GAPDH* and are expressed as fold increased over average gene expression in air-exposed WT mice or Ja18^{-/-} mice, respectively (n=5). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

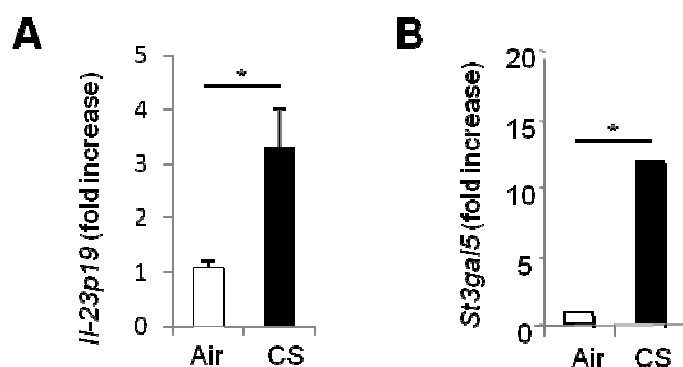
Supplemental Figure 5



Supplemental Figure 5- Priming of respiratory APC in CS-exposed mice.

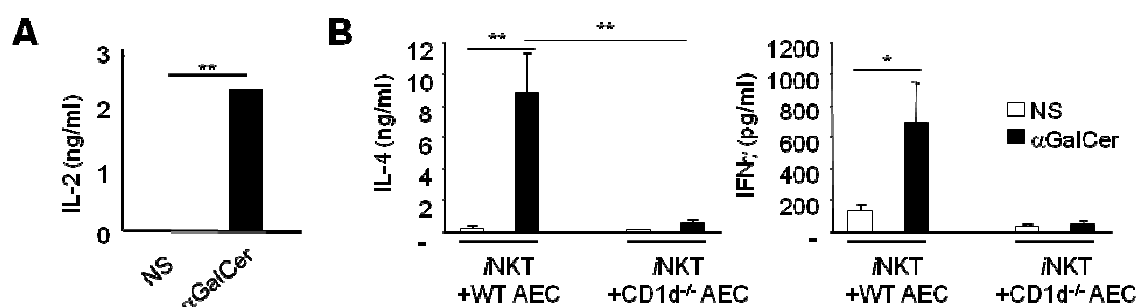
A, Total lung cell numbers were evaluated in WT mice after CS exposure (black bars) and control mice (white bars). Data are representative of one experiment out of three performed (mean \pm SEM, n = 6). **B**, Expression of I-A on CD45⁺ CD11c⁺ F4/80⁺ alveolar macrophages (AM) and CD45⁺ CD11c⁺ F4/80⁻ Dendritic cell (DC) in the lung of WT mice was determined in WT mice after CS exposure (black bars) and control mice (white bars). Data are representative of one experiment out of three performed (mean \pm SEM, n = 6). **C**, Representative histograms of CD40 and I-A expression on pulmonary AM and DC from Ja18^{-/-} mice after 12 wk CS-exposure are shown. MFI are represented on the dot plots. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Supplemental Figure 6



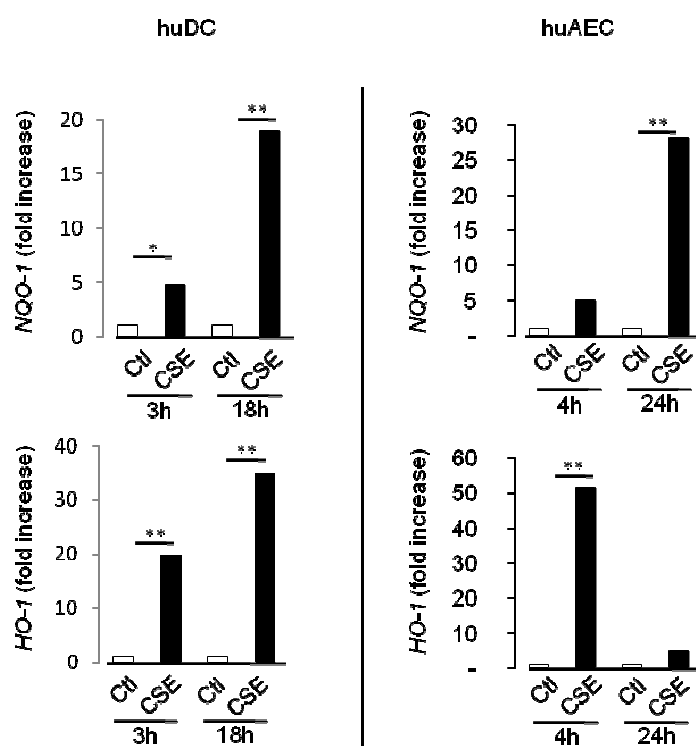
Supplemental Figure 6- *Il-23p19* and *St3gal5* mRNA levels in total lungs. Mice were exposed or not to CS for 12 weeks. Lung tissues were collected. *Il-23p19* and *St3gal5* mRNA expression were determined by quantitative RT-PCR. Data are normalized to expression of *GAPDH* and are expressed as fold increased over average gene expression in air-exposed WT mice (n=10). * $p < 0.05$.

Supplemental Figure 7



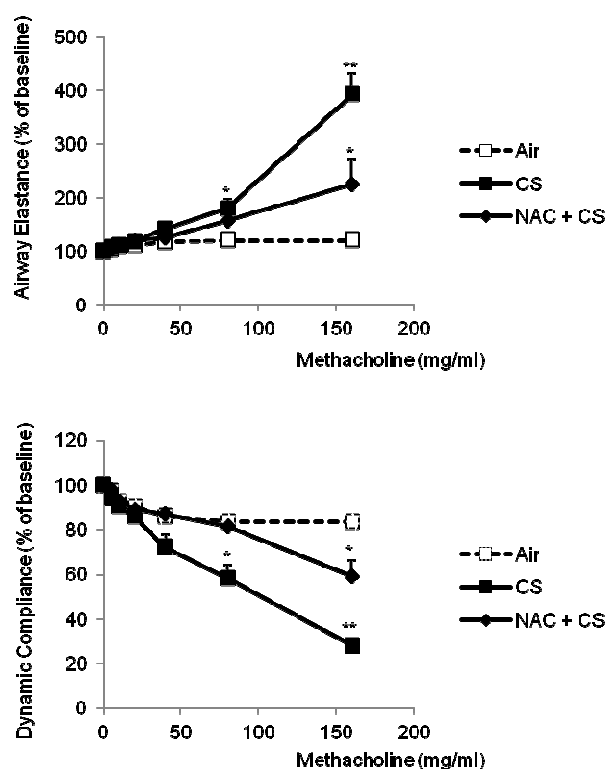
Supplemental Figure 7- Mouse airway epithelial cells (AEC) *in vitro* activate *i*NKT cells. Mouse AEC were exposed to α -GalCer (100 ng/ml) overnight and, after extensive washing, were co-cultured with DN32 *i*NKT hybridoma (panel A) or sorted *i*NKT cells (panel B) for 48 hours. IL-2, and IL-4 and IFN- γ were respectively measured by ELISA in coculture supernatants. Data represent the mean \pm SEM of three independent experiments performed in triplicate. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Supplemental Figure 8



Supplemental Figure 8- CSE triggers oxidative stress in human APC. Human DC and human AEC were exposed to CSE. mRNA were prepared at different time-points. NAD(P)H dehydrogenase quinone -1 (*NQO-1*) and heme-oxygenase -1 (*HO-1*) mRNA copy numbers were determined by quantitative RT-PCR. Data are normalized to expression of β -actin and are expressed as fold increased over average gene expression in unstimulated cells. Data represent one out of three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Supplemental Figure 9



Supplemental Figure 9- Oxidative stress is involved in changes of lung function.

Mice were exposed to CS, 5 days a week, over a period of 12 weeks. Some mice received the treatment with the anti-oxidant NAC in their drinking water all along the CS exposure. Changes in dynamic compliance and airway elastance were measured on mechanically ventilated mice, in response to increasing doses of methacholine (week 12 post-CS exposure). Data are expressed as mean \pm SEM. Results are representative of three independent experiments (n=5 mice per group). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Supplemental Table 1: Primer sequences for qRT-PCR

Target	Primer	Sequence
Human b-Actin	Forward	5'- CTGGAACGGTGAAGGTGACA
	Reverse	5'- AAGGGACTTCCTGTAACA ATGCA
Human HO-1	Forward	5'- ATGGCCTCCCTGTACCACATC
	Reverse	5'- TGTTGCGCTCAATCTCCTCT
Human ST3GAL5	Forward	5'- GCG AAG ACG GCT ATG GCT CT
	Reverse	5'- TCC GGA ATC CAA AAG GCG
Human UGCG	Forward	5'- TGGAGGGAATGGCCGTCTT
	Reverse	5'- TTGCCTTCTTGTTGAGGTGTAAT
Mouse GAPDH	Forward	5'- GTTCACCCACTAATAGGGAACGTGA
	Reverse	5'- GGATTCTGACTTAGAGGCGTTGAGT
Mouse HMOX1	Forward	5'- AAGCCGAGAATGCTGAGTTCA
	Reverse	5'- GCCGTGTAGATATGGTACAAGGA
Mouse IL-12p40	Forward	5'-GACCCTGCCCATTTGAACTGGC
	Reverse	5'-CAACGTTGCATCCTAGGATCG
Mouse IL-23	Forward	5'-CACCAGCGGGACATATGAA
	Reverse	5'- CCTTGTGGGTCACAACCAT
Mouse UGCG	Forward	5'- CTG CCG TAT GTA GCC GAC AGA
	Reverse	5'- AAA CAA GAC ATC CCC GTC ACA C
Mouse ST3GAL5	Forward	5'- GCG AAG ACG GCT ATG GCT CT
	Reverse	5'- TCC GGA ATC CAA AAG GCG

Supplemental Table 2: Characteristics of COPD patients

Nb	Sexe	Age	Smoking cessation	Blood pressure	BMI	Inhaled steroids	FEV1 % pred	PO2	BODE index
28	0.9 ± 0.07	60.5 ± 2.27	0.47 ± 0.11	53 ± 5.41	26.71 ± 1.15	0.63 ± 0.11	54.16 ± 5.25	74.1 ± 2.88	3 ± 0.58

COPD patients included subjects with a BODE index between 2 and 4, and are matched for age and sex with controls. BMI, Body Mass Index, FEV1% pred, predicted amount as a percentage of the forced expiratory lung volume in one second; PO2, partial pressure of oxygen.

Supplemental Material and Methods

Reagents and Abs

α -GalCer was from Axxora Life Sciences (Coger S.A., Paris, France). mAbs against mouse CD3 (APC-conjugated), CD5 (FITC-conjugated), NK1.1 (PerCp-Cy5.5-conjugated), TCR- β (V450-conjugated), CD25 (APC-conjugated), CD69 (Alexa700-conjugated), CD11b (V450-conjugated), Ly-6G (APC-Cy7-conjugated), CD8 (V500-conjugated), CD4 (APC-conjugated), CD103 (PE-conjugated), CD11c (APC-conjugated), CD45 (Q-dot605-conjugated), F4/80 (PerCP-Cy5.5-conjugated), CD86 (PE-conjugated), CD40 (PE-conjugated), I-Ab (FITC-conjugated), IFN- γ (PE-conjugated), IL-17 (APC-conjugated), CD11c (PE-Cy7-conjugated), F4/80 (PerCP-Cy5.5-conjugated), CD11b (V450-conjugated) and CD103 (PE-conjugated) and isotype controls were purchased from Biolegend (Le Pont de Claix, France). mAb against human CD were also used including anti-Lin-1 (FITC-conjugated), CD3, -HLA-DR (V450-conjugated), -CD4, -CD11c (Alexa-700 conjugated), CD8, CD14 (V500 conjugated), -CD25, -CD86 (APC-conjugated), -CD56, -CD123 (PerCP-Cy5.5 conjugated), CD69 (PE-Cy7 conjugated) and CD45 (APC-H7 conjugated) as well as the isotype controls (BD Biosciences). PE-conjugated PBS57-loaded human and mouse CD1d tetramers were from the NIH Tetramer Facility (Atlanta, GA). 3R4F research cigarettes were purchased from University of Kentucky. Cumen hydroperoxyde, N-acetylCystein were purchased from Sigma Aldrich.

Mice

Six- to eight-week-old male wild-type (WT) C57BL/6 (H-2D^b) mice were purchased from Janvier (Le Genest-St-Isle, France). J α 18^{-/-} mice and CD1d^{-/-} mice were a gift from Dr. M. Taniguchi (RIKEN Institute, Yokohama, Japan) and Dr. L. Van Kaer (Vanderbilt University, Nashville, TN), respectively. IL-17^{-/-} mice were a kind gift from Dr. B. Ryffel (Orléans, France). All animal work conformed to the guidelines of Animal Care and Use Committee from Nord Pas-De-Calais (agreement no. AF 16/20090).

Assessment of airway inflammation and remodeling

Mice were sacrificed for sampling the lung lumen by bronchoalveolar lavage (BAL). Total cell numbers per BAL was determined. A morphology-based differential cell count was conducted on cytopsin preparations, after staining with Diff-Quik solution (Sigma). For histopathology, lungs were fixed by inflation and immersion in Immuno-HistoFix and embedded in Immuno-HistoWax. To evaluate airway inflammation, lung slices (4- μ m sections) were done for H&E staining.

Pulmonary cells from air or COPD mice were prepared as previously described (19) and were analyzed by flow cytometry. To analyze *i*NKT cell cytokine profile, pulmonary cell suspensions were incubated with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; 20 ng/ml) and ionomycin (500 ng/ml) for 3 h. Cells were stained with PE-conjugated PBS57 -loaded CD1d tetramer and FITC-conjugated TCR β , and then fixed, permeabilized, and incubated with PE-conjugated mAb against IFN- γ and APC-conjugated mAb against IL-17, or control rat IgG1 mAb in permeabilization buffer. Cells were acquired and analyzed on a Fortessa (Becton Dickinson, Rungis, France) cytometer, and using the FlowJo software respectively.

Cytokine production was analyzed in total lung cells. For this, 5 \times 10⁵ lung cells were seeded on 96-well plates and then stimulated with α GalCer (100 ng/ml) and coated anti-CD3 Ab. Forty-eight hours later, supernatants were collected and analyzed for IFN- γ , IL-4, and IL-17 concentration by ELISA (R&D Systems).

BM-DC

Bone marrow-derived DC (BM-DC) were prepared as previously described (24).

Mouse primary airway epithelial cells (mAEC)

A catheter was carefully introduced into the trachea and BAL was performed by injection of 1ml PBS. 1ml dissociation buffer (1.4mg/ml pronase and 0.1mg/ml DNase (Boehringer Mannheim, UK)) was then injected and lungs were incubated for 20 min. After lung tissue grinding, cells were plated in DMEM-F12 5% FCS in 6-well plate for 1 hour at 37°C, to eliminate macrophages. Non adherent cells, i.e. murine airway epithelial cells (mAEC), were transferred onto a plate coated with matrigel (BD biosciences) and cultivated in Human Airway Epithelial cells complete culture medium (Promo-cell, Heidelberg, Germany) until confluence. mAEC were controlled as pan-cytokeratin⁺ vimentine⁻ cells.

Human cells

iNKT cells were purified from peripheral blood by positive selection over a MACS column using PE-conjugated 6B11 Ab and anti-PE microbeads. The purity of this population was confirmed using the PBS57-loaded CD1d tetramer (>98%). Cells were expanded in presence of autologous monocytes and maintained in culture for 1 month in RPMI 1640 with 10% FCS (Invitrogen, Paisley, UK) containing 30 ng/ml of IL-15 (Peprotech).

Blood monocytes were purified by positive selection (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany), and differentiated into DC as previously described. Immature DC were stimulated or not with CS extracts, or α -GalCer (10ng/ml).

The human bronchial epithelial cell line 16-HBE (a generous gift of Dr D Gruenert, San Diego) was cultured as previously described.

Coculture APC-iNKT

APC were cultured for 24 hours with CSE or α GalCer as a positive control. iNKT cells were directly added onto the APC, or on the upper compartment of a transwell, for additional 48 hours. Supernatants were collected 48 hours later. In some experiments, APC were pretreated with NAC (0.5 mM) for one hour prior CSE-exposure.

Patients with COPD

Peripheral blood and induced or spontaneous sputum were collected in stable COPD patients (n = 28) and in non smoker healthy controls (n =7) (CPP 2008-A00690-55, HypoCOPD Study). COPD patients included subjects with a BODE index between 2 and 4 and are matched for age and sex with controls (Supplemental Table 1). Plasma and sputum fluids were prepared as previously described. Blood mononuclear cells were collected by gradient centrifugation. The phenotype of NK/NKT cells was evaluated by flow cytometry based on CD3 and CD56 or expression whereas iNKT cells were identified as PBS57-loaded CD1d tetramer⁺, CD3⁺ cells. Among APC, mDC were isolated as Lin1⁻, CD11c⁺, HLA-DR⁺ whereas pDC were lin1⁻, CD123⁺, HLA-DR⁺.

B. Partie 2 : L'inflammation de la muqueuse induite par l'exposition à la fumée de cigarette est contrôlée par l'interaction entre l'IL-10, l'IL-17 et le microbiote intestinal

Smoking-induced mucosal inflammation is negatively regulated by the interplay between IL-10, IL-17 and the gut microbiota.

Gaëlle Remy^{1,2,3,4}, Muriel Pichavant^{1,2,3,4}, Teddy Grandjean , Gwenola Kervoaze , Annabelle Cesaro , Myriam Delacre , Vincent Billoud , Hicham Bouabe , David Hot , Philippe Gosset*, Mathias Chamaillard*

¹ University Lille Nord de France, F-59000 Lille, France. ² Institut Pasteur de Lille, Center for Infection and Immunity of Lille, F-59019 Lille, France. ³ Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 8204, F-59021 Lille, France. ⁴ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1019, Team 8, F-59019 Lille, France. ⁵ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1019, Team 7, Equipe FRM, F-59019 Lille, France.

The authors declare no conflict of interest.

Correspondence should be addressed to: philippe.gosset@pasteur-lille.fr and mathias.chamaillard@inserm.fr.

Manuscript information: Text pages;; Figures;; Supplementary text;; Supplementary figures:.

Word count (counting spaces): Title: 12 words; Abstract: 123 words; Text: characters.

Keywords: Colitis, Emphysema, Microbiota, Smoking exposure.

Abbreviations used in this paper: CS: smoking, IL: Interleukin.

**Cet article sera très prochainement soumis dans le « Journal of Clinical Investigation »,
Facteur d'impact : 12.812**

1. Abstract

Cigarette smoking remains the major environmental risk factor for Crohn's disease and Chronic Obstructive Pulmonary disease although the relationship between lung and intestinal lesions is not established. Due to its major role in the control of inflammation, we hypothesize that IL-10 may control the equilibrium between cigarette smoking, microbiota and mucosal immune response in order to limit the development of intestinal and respiratory diseases. Herein, we demonstrated that cigarette smoke enhanced IL-10 production. IL10 deficiency exacerbated tobacco smoking induced Th17-type intestinal and lung inflammation. Both IL10 deficiency and cigarette smoke altered the composition of the fecal microbiota but not in a similar way. Vancomycin, but not colistin, prophylaxis restricted IL-17 production (particularly in lung NKT cells), the inflammation in the ileum and reversed smoking-induced lung function decline. Collectively, we identified a tobacco smoking / IL-10 interaction that controls Th17-like inflammatory response to Gram positive bacteria. We propose that interplay of commensals and pathogenic microbiota finely tunes the impact of cigarette smoking on Crohn's disease and COPD and may represent a promising therapeutic approach.

2. Introduction

Numerous clinical studies identified cigarette smoking as the most important avoidable environmental risk factor for several common human illnesses with increased socio-economic problems, including chronic inflammatory bowel and lung diseases. Notably, there is an evidence of an increased risk of Crohn's disease (CD) among patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) (1), that will be the third most common cause of death worldwide by 2020. Disease progression and the need for surgery are markedly reduced with smoking cessation (2-4). Noteworthy, smoking results in profound changes on the composition of the intestinal microbiota (5). Conversely, prominent alterations of bacterial communities within the upper respiratory tract are observed among cigarette smokers and COPD patients (6). However, it remains elusive how the gut microbiota may promote tobacco smoking-related disease progression, since not all smokers will develop COPD and CD.

A meta-analysis of genome-wide association studies confirmed a key role of several CD-predisposing genes in the pathogenesis of COPD (7), such as the interleukin-10 (IL-10). IL-10 is a T-helper cell (Th) type 2 cytokine with broad anti-inflammatory properties. Notably, IL-10 is known to suppress Th17 activity (8, 9) that is associated with poor prognosis in COPD and CD (10, 11). In humans, single-nucleotide polymorphisms have been linked to a further decline lung function in individuals genetically at risk for COPD caused by a severe α 1-antitrypsin deficiency (12). Rare mendelian IL10 and IL10 receptor mutations are causing neonatal-onset IBD (13). Likewise, IL-10 deficiency is characterized by an altered composition of the gut microbiota (14) and results in spontaneous development of CD-like inflammatory lesions in mice (15). Altogether, this suggests that IL-10 may control the equilibrium between cigarette smoking, microbiota and mucosal immune responses in order to limit the development of intestinal and respiratory diseases. Herein, we report that IL-10 had a protective role during cigarette smoking on Th17-like diseases in the intestine and the lung through its impact on gut microbiota.

Material and Methods

Mice

Nine - to eleven-week-old wild-type (WT) Balb/c mice were purchased from Janvier (Le Genest-St-Isle, France). All animal work conformed to the guidelines of Animal Care and Use Committee from Nord Pas-De-Calais (agreement no. AF 16/20090).

ITIB Mice (Interleukin-Ten Ires Bla x2) were a gift from Dr Icham Bouabe, University of Cambridge, UK.

Reagents

Antibodies against mouse CD11c (PE-Cy7 conjugated), CD11b (APC conjugated), NKp46 (Alexa Fluor 700 conjugated), CD11b, -TCRb (V450 conjugated) and CD45 (V500 conjugated) were purchased from BD Biosciences. (Le Pont de Claix, France).

Antibodies against mouse F4/80 (PE conjugated), CD86 (Alexa Fluor 700 conjugated), Ly6C, -CD45 (BV570 conjugated), IFN γ (Alexa Fluor 488 conjugated), IL17 (Alexa Fluor 647 conjugated) and TCRb (PE-Cy7 conjugated) as well as the isotype controls were purchased from BioLegend (Le Pont de Claix, France).

Intracellular staining of cytokines was performed using BD Cytotfix/Cytoperm Plus including Golgi Plug (BD Biosciences) according to manufacturer's instructions.

Phorbol Myristate Acetate (PMA) and Ionomycin were purchased from Sigma.

For ITIB Mice experiments, CCF4-AM (Coumarin-cephalosporin-fluorescein (4)-acetoxymethyl) and probenidicid were purchased from Invitrogen (Saint Aubin, France) and used according manufacturer instructions.

3R4F research cigarettes were purchased from the University of Kentucky.

Cigarette Smoke Exposure and mice treatment

Mice were exposed to Cigarette Smoke (CS) from 5 cigarettes per day, 5 days a week during 4 days, 2 weeks, 4 weeks or 8 weeks (Emka, Scireq, Canada). The negative-control group named "Air" was exposed to ambient air.

For the experiment of IL17 neutralization, anti-IL17A antibody (a gift from Catherine Uyttenhove, Orléans, France) was injected intra-peritoneally weekly (100 μ g/mouse/week) from the fifth week of CS exposure till the day of sacrifice.

For the experiment of antibiotherapy, Vancomycine and Colimycine (Mylan) were administrated in the drinking water (2,5 mg/mouse/day), from the beginning of the CS exposure till the day of sacrifice.

Measurement of lung function

Lung function was assessed by invasive measurement as previously described (17)

Aerolized methacholine (Sigma) was administrated in increasing concentrations (from 20 to 160 mg/mL of methacholine). We computed airway resistance, dynamic compliance and lung elastance by fitting flow, volume and pressure to an equation of motion (Flexivent System, Scireq).

Cytokine quantification.

The concentration of murine IL-10 (Pharmingen, Le pont de Claix, France), IL-1 β (R&D systems, Lille, France), IL-17 and IFN- γ (eBiosciences, Paris, France) in supernatants were determined by ELISA.

Gene Expression

Quantitative RT-PCR was performed to quantify mRNA of interest, using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit and Power SYBR Green PCR Master Mix according to manufacturer's instruction (Applied bioSystems).

Results were expressed as mean +/- SEM of the relative gene expression calculated for each experiment in folds ($2^{\Delta\Delta Ct}$) using GAPDH as a reference and compared to controls (Air).

Target	Primer	Sequence
GAPDH	Forward	5'-TGC CCA GAA CAT CAT CCC TG -3'
	Reverse	5'- TCA CAT CCA CGA CGG ACA CA -3'
	Reverse	5'- GGT AGC TAT GGT ACT CCA -3'
IL-1 β	Forward	5'- TGA AGG GCT GCT TCC AAA CCT TTG ACC -3'
	Reverse	5'- TGT CCA TTG AGG TGG AGA GCT TTC AGC -3'
IL-10	Forward	5'- CAT TTG AAT TCC CTG GGT GAG A-3'
	Reverse	5'- TGC TCC ACT GCC TTG CTC TT -3'

In intestinal tissues, qRT-PCR analysis was performed as previously described (18).

Flow Cytometry

Pulmonary cells were incubated with PMA (20 ng/ml) / Ionomycine (500 ng/ml) / Golgi Plug (according to manufacturer instructions) for 4 hours. Then, cells were stained for extracellular and then fixed, permeabilized, and incubated with FITC-conjugated mAb against IFN- γ and APC-conjugated mAb against IL-17, or control rat IgG1 mAb in permeabilization buffer. Cells were acquired and analyzed on a BD LSRFortessa™ (Becton Dickinson, Rungis, France) cytometer, and using the FlowJo software respectively.)

Histopathological analysis.

Paraffin-embedded 5- μ m sections of formalin-fixed colon specimens were stained with H&E. The slides were blindly examined by two investigators with an AxioPlan2 microscope (Zeiss) using the score scale: 0 no inflammation, no epithelial hyperplasia, goblet cells are present; 1 small number of infiltrating cells, epithelial cells hyperplasia is minimal ; 2 important infiltrating cells, epithelial cells hyperplasia is obvious but not marked, mild loss of goblet cells; 3 pronounced infiltrating cells, marked epithelial hyperplasia, moderate loss of goblet cells and architecture distortion; 4 crypt abscesses, ulcers, transmural inflammation.

q-PCR analysis and high throughput sequencing analysis

Faecal samples were collected and stored frozen before DNA extraction for q-PCR analysis. Faecal samples were homogenised in 200 μ l TL buffer (tissue lysis buffer (200 mM HEPES, pH 7.5, 1 M KCl, 100 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 0.2% NaN₃)) and 25 μ l proteinase K was added before incubating at 55°C for 2 h (PeqLab, Erlangen, Germany). Mechanical force was applied to maximise bacterial cell wall lysis. The 16S rRNA gene coding region spanning variable region V1–V4 was amplified using the broad-range forward primer 8F 5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3' and 805R 5' GGA CTA CCA GGG TAT CTA AT 3'. Amplification reactions were performed in a total volume of 50 μ l containing 1 \times PCR buffer, 15 mM MgCl₂ (both Qiagen, Hilden, Germany), 0.2 μ M of each primer (Carl Roth, Karlsruhe, Germany), 0.2 μ M of each dNTPs (Qiagen), 1 U DNA Taq polymerase (Qiagen) and 100 ng of sample DNA. Absolute numbers of *Bacteria*, *Clostridiales*, *Lactobacillaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Firmicutes*, *Bacteroides* were determined by q-PCR analysis on a Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies) from serial dilutions of plasmid constructs with a reference 16S rDNA sequence. A total of 1,000 high-quality reads was generated from each of the biological replicates. 16S rRNA gene sequences with at least 97% similarity were clustered into species level OTUs using average neighbor algorithm. Phylogenetic affiliation of each OTU was governed by using RDP taxonomy and template file. Phylogenetic-based (fast UniFrac) beta diversity was on phylogenetic tree generated by using FastTree version 2.0. Nonabundance-based UniFrac matrices were calculated. PAST software was used for data visualization and for performing abundance-based PCoA, CCA, and SIMPER analysis on the bacterial genera observed in pyrosequencing data. Divergence-based phylogenetic diversity was calculated by phylo.diversity command implemented in mothur.

Statistical analysis.

Results are expressed as the mean \pm s.e.m. The statistical significance of differences between experimental groups was calculated by a one-way analysis of variance with a Bonferroni post test or an unpaired Student *t*-test (GraphPad, San Diego, CA). The possibility to use these parametric tests was assessed by checking if the population is Gaussian and the variance is equal (Bartlett's test). Results with a *P*-value <0.05 were considered significant.

3. Results and discussion

As we previously shown in the colon (19), cigarette smoking enhanced IL-10 mRNA and protein expression at both transcript and protein levels in the lung of WT mice when compared to controls (Figure 1). As expected, IL-10 was first expressed by alveolar macrophages (after 4 days of CS exposure) and over time by NK cells (Figure 1B, C). To assess the potential role of IL-10 on disease risk consecutive to tobacco smoking, WT and IL-10-deficient (IL10^{-/-}) mice were chronically exposed for 2 months to cigarette smoke (11). As expected, Invasive measurement of lung function revealed that cigarette smoking enhanced lung resistance in wild-type mice when compared to control animals (Figure 2A). Consistently, dynamic compliance and airway elastance were found reduced in response to cigarette smoking in WT animals (Supplementary Figure 2A, B). In contrast to controls, IL-10^{-/-} mice exhibited a spontaneous decline of lung function that was not further enhanced by cigarette smoking exposure at the macroscopic level (Figure 2A and Supplementary Figure 2A, B). The immune response to tobacco smoking of IL-10^{-/-} mice was characterized by an enhanced IL-17 secretion by lung cells (Figure 2B). Accordingly, cigarette exposure triggered an enhanced influx of activated T and NKT cells in IL10^{-/-} mice, among which most of them were found to secrete either IL-17 and/or IFN-gamma (Figure 2D, E). The development of Th17 cells requires polarizing factors such as IL-1 β and IL-23. Smoking exposed control mice exhibited enhanced secretion of IL-1 β that was found exacerbated in IL-10 deficient mice (Figure 2C). This inflammatory reaction was associated with a mild increase in neutrophil number and in the expression of MMP12 (Supplementary Figure 2C) in the lung from CS-exposed IL-10^{-/-} mice, two factors related with COPD development. Clearly, the overproduction of IL-17 in IL-10 deficient mice is responsible of the pathological evidences since the use of neutralizing anti-IL-17 Abs in these mice abrogates lung function decline (Supplementary Figure 4A) but also reduces inflammatory markers such as IL-1 β and IFN- γ expression and neutrophils recruitment (Supplementary Figure 4B, C, D). Altogether, these data indicated that tobacco-induced generation of lung pathogenic NKT17 cells (T helper 17 (pTH17)) is negatively regulated by IL-10.

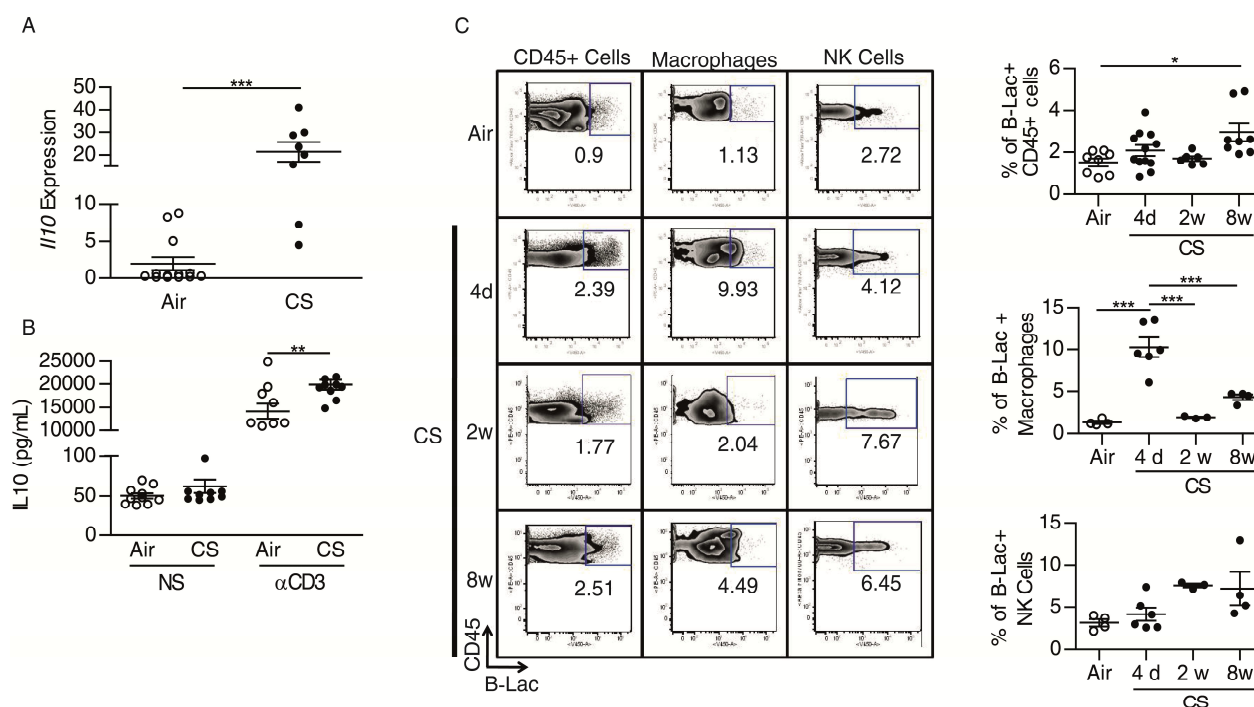


Figure 1 Cigarette Smoke (CS) Exposure induces IL-10 expression in lungs.

C57Bl/6 WT mice were exposed to 5 cigarettes per day, 5 days a week, during 12 weeks. After exposure, mice were sacrificed and IL-10 expression was determined in two different manners comparing Air – (in white) and CS- (in Black) exposed mice. (A) The lungs were collected and il-10 mRNA copy numbers were determined by quantitative RT–PCR. Data are normalized to expression of Gapdh and are expressed as fold increased over average gene expression in air-exposed mice (n=8). (B) Lung mononuclear cells from mice exposed to CS for 12 weeks cells were treated with α -CD3 (5 μ g/mL) or not (NS = non stimulated) for 48 hours. The concentration of IL-10 was assessed by ELISA in the supernatants. The values represent mean + SEM (n=5). (C) ITIB (Interleukin-Ten Ires Bla x2) mice were exposed to Air or to CS for 4 days, 2 weeks and 8 weeks. Lung mononuclear cells were treated with CCF4-AM substract. β -Lactamase producing cells were analysed using flow cytometry. On the left panel, dot-plots represented β -Lactamase production in total CD45+ cells, CD45+ CD11c+ F4/80+ macrophages and CD45+ TCR β -NK1.1+ NK cells. Gates were set based on the relative WT control. Representative dot plots for each time point are shown (n=6). On the right panel, histograms of β -Lactamase-producing CD45+ cells, macrophages and NK cells (n=3-12). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

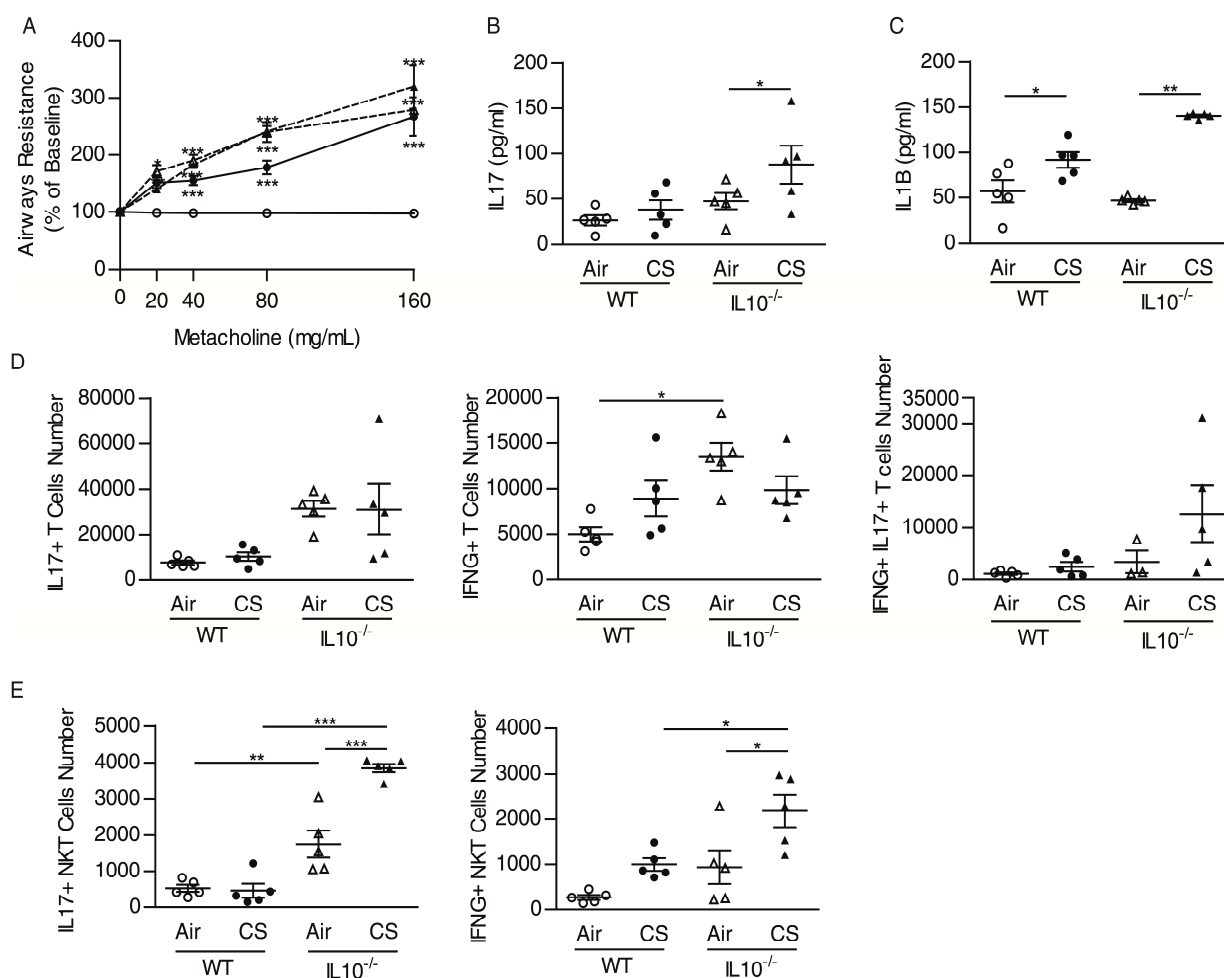


Figure 2 : IL-10 deficient mice present a spontaneous lung function decline associated to an increased inflammation and IL-17 production after CS exposure.

Wild-type (WT) and IL-10^{-/-} mice were exposed to CS, 5 days a week, over a period of 8 weeks. (A) Changes in airway resistance were measured as previously described (Pichavant et al, Muc Immunol 2014). Results are expressed as the mean \pm SEM. Results are representative of four independent experiments and compared to Air-exposed WT mice. (○WT Air, ●WT CS, △IL10^{-/-}Air, ▲IL10^{-/-} CS) (B) (C) Spontaneous production of IL-17 and IL-1β were assessed by ELISA in the supernatants of lung mononuclear cells cultivated for 48 hours. The values represent mean + SEM (n=5). (D) (E) Intracellular staining of IL-17 and IFN-g was performed on absolute numbers CD45+ TCRβ+ Nkp46- T lymphocytes (D) and CD45+ TCRβ+ Nkp46+ NKT cells (E) and were evaluated by flow cytometry. Gates were set based on the relative isotype control. The values represent mean + SEM and are representative of four independent experiments (n=5). * p < 0.05, **p < 0.01, *** p < 0.001.

In parallel, intestinal function and pathology were estimated first by measurement of weight loss and clinical signs of morbidity. While no disease signs were observed in smoking control mice, an enhanced body-weight loss (Figure 3A and Supplemental Figure 3A, B; supplemental material available online with this article) and an accelerated development of rectal prolapses were observed in cigarette smoking-exposed *Il10*^{-/-} mice (Supplemental Figure 3C). Consistently, cigarette smoking markedly reduced colon length in *Il10*^{-/-} mice when compared to that in similarly treated control animals (Supplemental Figure 3D). In line with previous findings, histological score (Figure 3B, C and Supplemental Figure 3E,F) and crypt lengths (Figure 3D) were found enhanced in *Il10*^{-/-} mice when compared to that in similarly treated animals. As reported in the lung, the cigarette smoking-induced inflammation in *Il10*^{-/-} mice was characterized by an enhanced expression of several genes involved in the Th1/Th17 immune response, such as *Il17A*, *Ifng* and *Reg3b* (Figure 3E and Supplementary Figure 3G). Altogether, these data indicated for the first time, a key protective role of Il-10 on the intestinal and respiratory response to tobacco smoking.

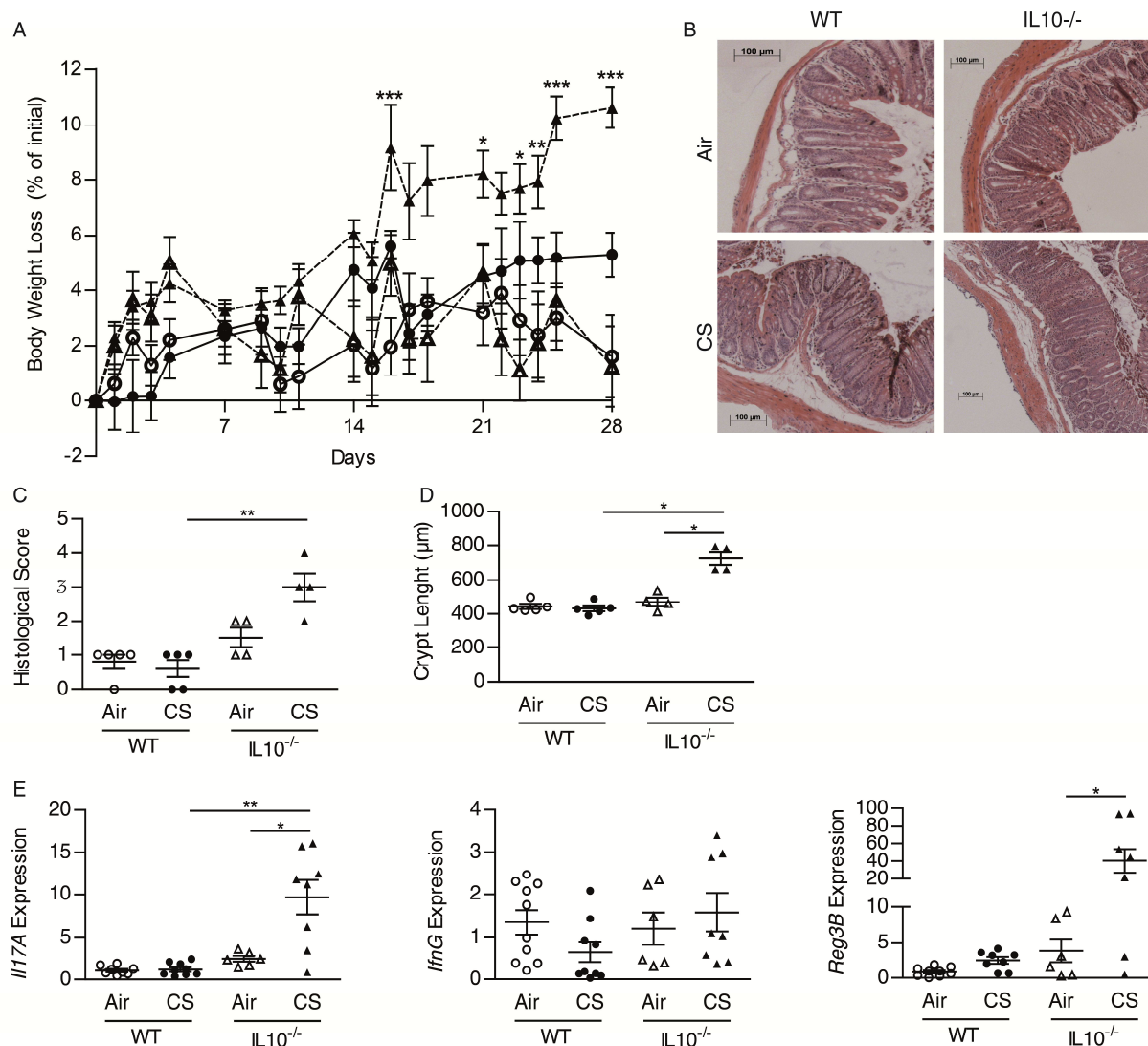


Figure 3 : CS exposure increase inflammation due to IL-10 deficiency

Wild-type (WT) and IL-10^{-/-} mice were exposed to CS, 5 days a week, over a period of 4 weeks. (A) Changes in body weight. Results are representative of two independent experiments and compared to Air-exposed WT mice. (○WT Air, ●WT CS, △IL10^{-/-}-Air, ▲IL10^{-/-} CS) (B) Representative H&E staining of paraffin-embedded longitudinal sections from colons of WT and IL10^{-/-} mice Scale bar: 100 μm. (C) Cell infiltration, epithelial hyperplasia and goblet cells destruction were assessed by two blinded observers (on a scale of 0–4) (D) Crypt length were measured on H&E staining section. (E) Colon tissues were collected and *il-17A*, *ifn-γ* and *reg-III β* mRNA copy numbers were determined by quantitative RT–PCR. Data are normalized to expression of β-Actin and are expressed as fold increased over average gene expression in air-exposed untreated mice.

Given the key role of the Th17-induced c-type lectin Reg3 β against Gram positive bacteria (16), we supposed that an overwhelming expansion of Gram negative bacteria may correlate with disease severity of IL10 $^{-/-}$ mice in response to tobacco smoking. A culture-independent qPCR analysis on specific bacterial 16S rRNA genes was performed to quantify the abundance of major components of the fecal-associated microbiota from control and mutant mice. In line with our previous findings, cigarette smoking in IL10 $^{-/-}$ and WT mice enhance the clostridiales and the firmicutes as well as the bacteroides. Furthermore, enterobacteriaceae were enhanced in Air IL10 $^{-/-}$ mice but not in CS IL-10 $^{-/-}$ mice (figure 4). In contrast Lactobacillaceae were diminished in Air IL10 $^{-/-}$ mice whereas they are similar to WT mice in CS IL-10 $^{-/-}$ mice. This agrees with previous studies reporting a reduced richness of the fecal microbiota from IL10 $^{-/-}$ mice that is characterized by a higher abundance of Proteobacteria and *Escherichia coli* (14). Conversely, a higher proportion of Proteobacteria and bacteroidetes was reported in smokers (5). Overall, our results suggest that the unrestrained Th17 inflammatory response in IL-10 deficient mice may contribute to lung function decline and to a colitogenic microbiota that is dominated by Proteobacteria.

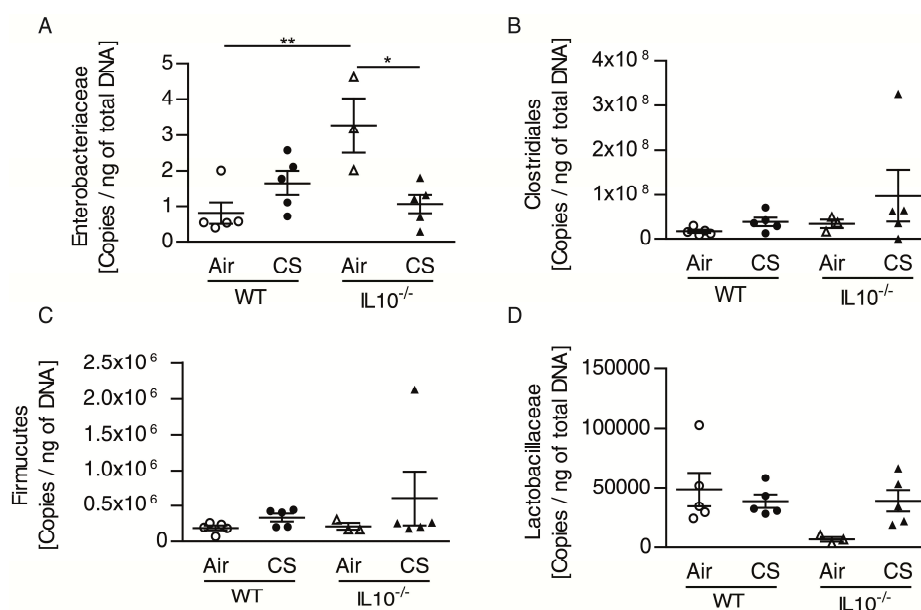


Figure 4 : qPCR analysis of the intestinal microbiota of WT and IL10^{-/-} mice

Fecal samples were collected and DNA was extracted for q-PCR analysis. Absolute numbers of *Bacteria*, *Clostridiales*, *Lactobacillaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Firmicutes*, were determined by q-PCR analysis from serial dilutions of plasmid constructs with a reference 16S rDNA sequence

High throughput 16S rRNA sequencing showed that cigarette smoke exposure did not significantly affect the composition of major phyla found in the fecal microbiota of WT and IL-10^{-/-} mice (figure 5A). When we narrow-downed the study of the microbiota to the family level, we observed that cigarette smoke exposure increased the percentage of *Gracilibacteraceae* (figure 5D) without inducing any changes in *Deferribacteraceae*, *Desulfovibrionaceae* and *Enterobacteriaceae* (figures 5B and C) in WT mice. Exposure to CS also decreased the frequency of *Lactobacillaceae*.

However, IL-10^{-/-} mice exposed to cigarette smoke showed higher percentages in *Deferribacteraceae* (figure 5B) and in *Desulfovibrionaceae* (figure 5C) but not in *Enterobacteriaceae* (figures 5B). These data confirm that the *Enterobacteriaceae* family is not implicated in the development of the intestinal pathology in IL-10^{-/-} mice.

Interestingly, the increased proportion of *Gracilibacteraceae* in response to cigarette smoke observed in WT mice (figure 5D) was not found in IL-10^{-/-} mice suggesting that this family of bacteria could have a role during the development of the intestinal pathology.

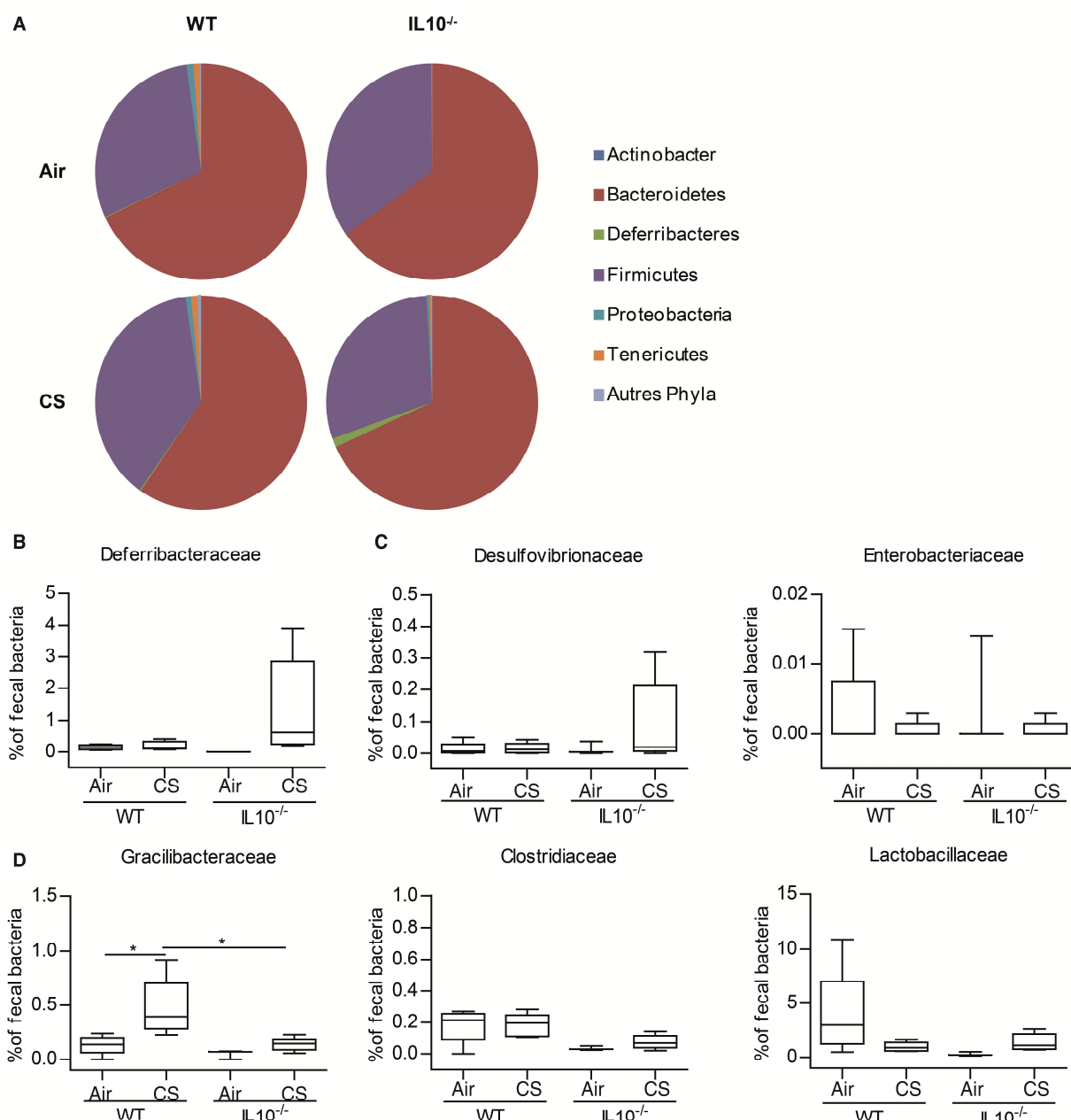


Figure 5 : High Through Put 16S rRNA sequencing analysis of the intestinal microbiota of WT and IL10^{-/-} mice
 Wild-type (WT) and IL-10^{-/-} mice were exposed to CS, 5 days a week, over a period of 8 weeks. High Throughput 16S rRNA sequencing was performed on feces collected from these mice, n=3-5. (A) Pie charts represent the major phyla detected in the different samples in percent. (B,C and D) Box plots report the percentages of the families of bacteria with major modulation in their abundance: *Deferribacteraceae* from the *Deferribacteres* phylum (B), *Desulfovibrionaceae* and *Enterobacteriaceae* from the *Proteobacteria* phylum (C), *Gracilibacteraceae*, *Clostridiaceae* and *Lactobacillaceae* from the *Firmicutes* phylum (D). * p<0.05.

To further understand the role of the microbiota on smoking-induced inflammation, mice were treated with either vancomycin or colistin. Lung function decline was found similar between mice treated or not with colistin (data not shown), suggesting that Gram negative bacteria may not influence disease outcome in the lung. In contrast, depletion of Gram positive bacteria by vancomycin improved airway resistance, dynamic compliance and elastance (Figure 6A and Supplementary Figure 5). In addition, Th17-like respiratory inflammation induced by tobacco smoking was blunted by vancomycin treatment (Figure 6B). The proportion of lung IL17- and IFN- γ -secreting NKT cells was found reduced upon vancomycin treatment (Figure 6C). In contrast, vancomycin treatment failed to modulate IL-17 and IFN- γ secretion by CD4+ T cells (Figure 6D). In the intestine, *IL-17* and *IFN- γ* expression in the ileon was reduced after treatment with vancomycin; a result associated with a lower expression of *Reg3 β* . The same trend was observed in the caecum and the colon whereas no difference was detected in the colon (Figure 6E). In addition, weight loss due to cigarette smoking was abolished after treatment with vancomycin. Likewise, a reduced Th17-like inflammatory response in mice treated with vancomycin coincided with a clearance of Clostridium- and the firmicutes-related commensals as well as the bacteroides (Figure 6F). As expected, *E. coli* and Lactobacilles were found enriched in vancomycin-treated mice when compared to that in controls (Figure 6F).

Figure 6: Depletion of Gram+ bacteria alleviates lung function decline in inflammation in CS – exposed mice

Wild-type (WT) mice were exposed to CS, 5 days a week, over a period of 8 weeks. Concomitantly mice were treated with vancomycin (0,5g/L) in the drinking water to deplete Gram+ bacteria. (A) Changes in airway resistance were measured as previously described (17). Results are expressed as the mean \pm SEM. Results are representative of two independent experiments and compared to Air-exposed WT mice. (○Air, □ Air + vanco, ● CS, ■ CS + Vanco) (B) Spontaneous production of IL-17 and IL-1 β were assessed by ELISA in the supernatants of lung mononuclear cells cultivated for 48 hours. The values represent mean + SEM (n=5). (C-D) Intracellular staining of IL-17 and IFN- γ was performed on CD45+ TCR β + NKp46+ NKT cells and CD45+ TCR β + NKp46- T lymphocytes. Gates were set based on the relative isotype control. The values represent mean + SEM and are representative of two independent experiments (n=5). (E) Caecum, ileon and colon tissues were collected and *il-17A*, *ifn- γ* and *reg-III β* mRNA copy numbers were determined by quantitative RT-PCR. Data are normalized to expression of β -Actin and are expressed as fold increase over average gene expression in ileon of air-exposed untreated mice. (F) Fecal samples were collected and DNA was extracted for q-PCR analysis. Absolute numbers of *Bacteria*, *Clostridiales*, *Lactobacillaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Firmicutes*, *Bacteroides* were determined by q-PCR analysis from serial dilutions of plasmid constructs with a reference 16S rDNA sequence. * p < 0.05, **p < 0.01, *** p < 0.001.



As expected, the high throughput sequencing revealed that vancomycin treatment depleted the Gram+ compartment of bacteria (including *Bacteroidetes*) (figure 7A). This allowed the expansion of Gram - bacteria, notably included in the *Proteobacteria* phylum (figure 7A), such as the *Desulfovibrionaceae* and *Enterobacteriaceae* families (figure 7C). However, vancomycin treatment induced the development of some resistant bacteria, in particular in the *Firmicutes* phyla (figure 7A) such as *Clostridiaceae* and *Lactobacillaceae* families (figure 7D) and this effect is potentialized by cigarette smoke exposure except for the *Clostridiaceae* family. *Gracilibacteraceae* frequency was increased after treatment with vancomycin whereas CS exposure antagonized this effect.

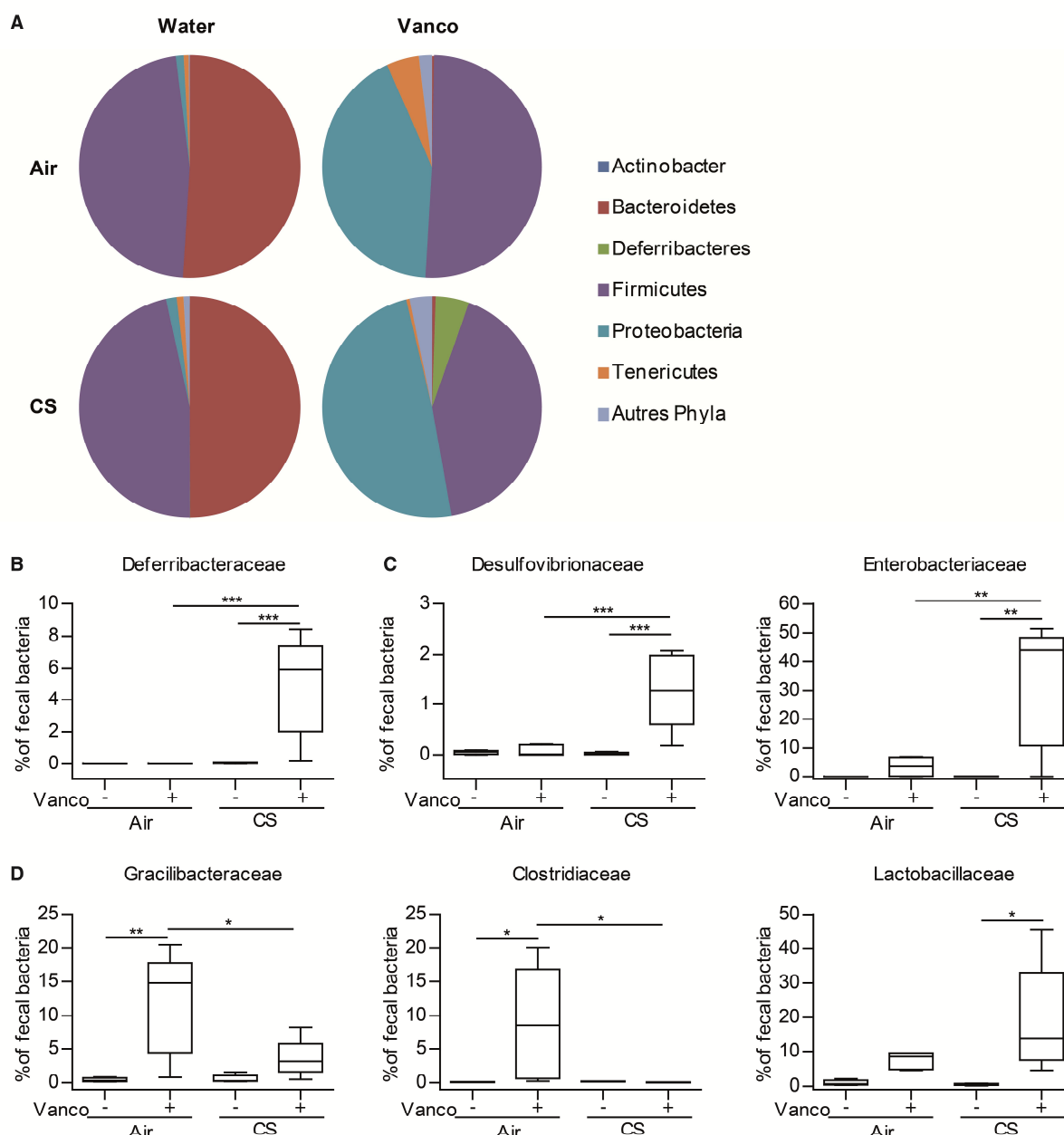


Figure 7 : Effects of vancomycin treatment on intestinal microbiota in CS-exposed mice

Wild-type (WT) mice were exposed to CS, 5 days a week, over a period of 8 weeks. Concomitantly mice were treated with vancomycin (0,5g/L) in the drinking water to deplete Gram+ bacteria. High Throughput 16S rRNA sequencing was performed on feces collected from these mice, n=3-5. (A) Pie charts represent the percentages of major phyla detected in the different samples in percent. (B,C and D) Box plots report the percentages of the bacteria families with major modulation in their abundance: *Deferribacteraceae* from the *Deferribacteres* phylum (B), *Desulfovibrionaceae* and *Enterobacteriaceae* from the *Proteobacteria* phylum (C), *Gracilibacteraceae*, *Clostridiaceae* and *Lactobacillaceae* from the *Firmicutes* phylum (D). * p<0.05.

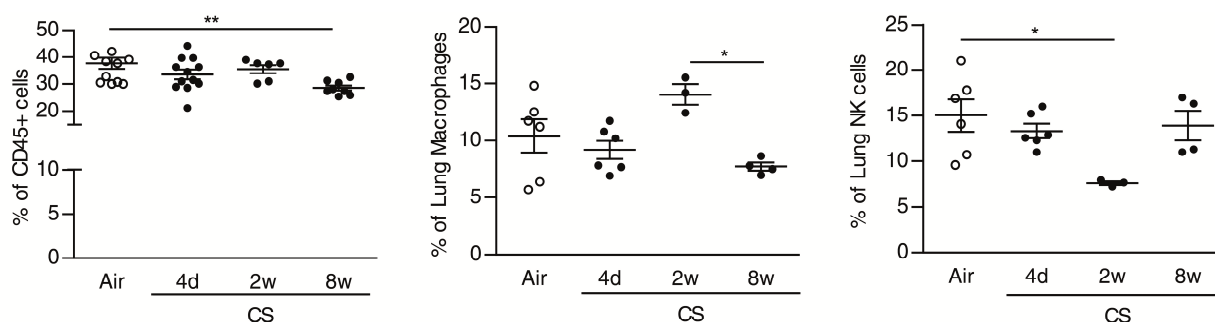
Since IL-10 is induced in the intestine by *E. coli*, we might propose that *enterobacteriaceae* and *Lactobacillaceae* inhibit the production of IL-17, particularly in the context of treatment with vancomycin. In addition, nonculturable Clostridia-related species are involved in the coordinated maturation of T cell responses and may promote a Th17 response if IL-10 production was deficient despite of the contradictory results obtained from qPCR and high throughput sequencing. In addition, the inverted profile of both *Gracilibacteraceae* and *Lactobacillaceae* after CS exposure and after vancomycin treatment strongly suggest their implication in the reported effects of the microbiota on the disease. In this context, *Gracilibacteraceae* (potentially in association with nonculturable Clostridia-related species) might favor the Th17 response whereas *Lactobacillaceae* (potentially in association with *enterobacteriaceae*) might have a regulatory property potentially through the production of IL-10. Altogether, the microbiota could be implicated in the development of the pathologies studied here, but more data need to be collected in order to support the previous results exposed.

In summary, cigarette smoking-related dysbiosis associated to a defect in IL-10 response strongly promote the development of lung and intestinal diseases including COPD and Crohn disease. Therapeutic approach aiming to restore the homeostasis between gut microbiota and mucosal immune response might be efficient to limit the consequences of cigarette smoking.

4. [References](#)

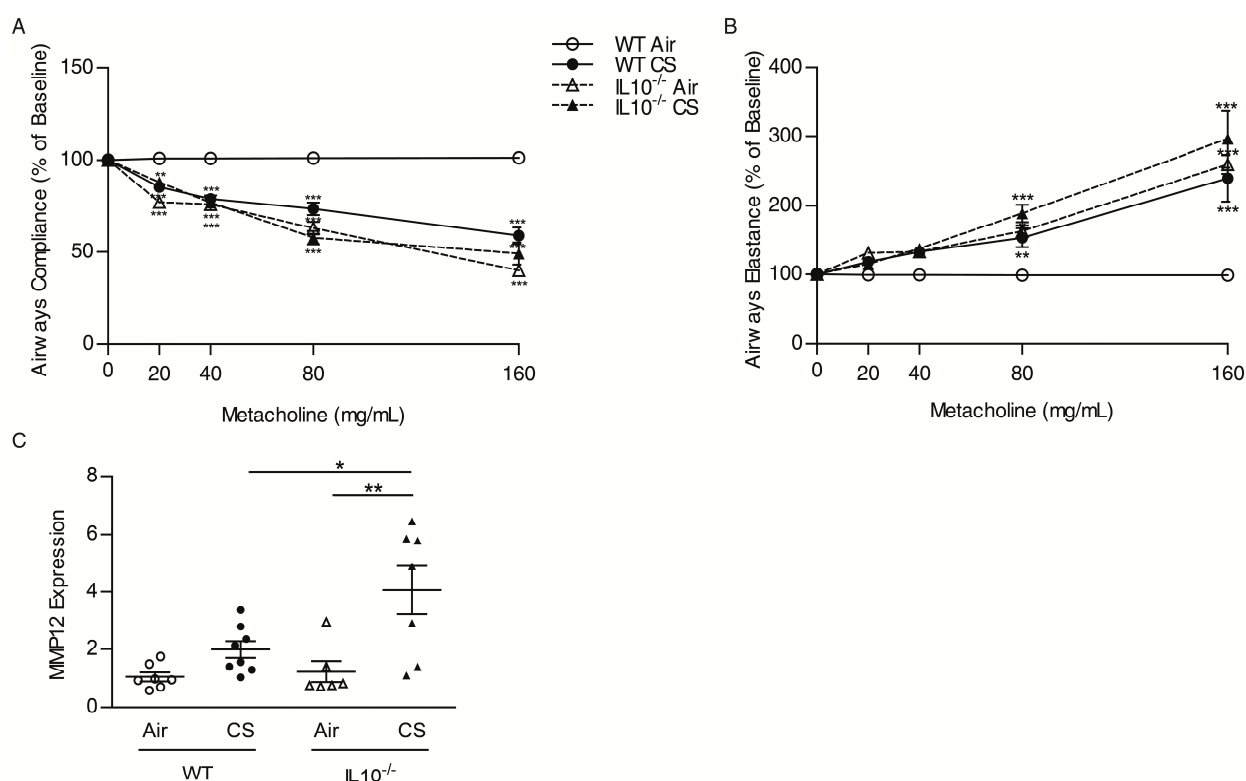
1. A. Ekblom, L. Brandt, F. Granath, C. G. Lofdahl, A. Egesten, Increased risk of both ulcerative colitis and Crohn's disease in a population suffering from COPD. *Lung* **186**, 167 (May-Jun, 2008).
2. T. Nunes *et al.*, High smoking cessation rate in Crohn's disease patients after physician advice--the TABACROHN Study. *Journal of Crohn's & colitis* **7**, 202 (Apr 1, 2013).
3. I. C. Lawrance *et al.*, Crohn's disease and smoking: is it ever too late to quit? *Journal of Crohn's & colitis* **7**, e665 (Dec 15, 2013).
4. C. Gratiou *et al.*, Smoking cessation effectiveness in smokers with COPD and asthma under real life conditions. *Respiratory medicine* **108**, 577 (Apr, 2014).
5. L. Biedermann *et al.*, Smoking cessation induces profound changes in the composition of the intestinal microbiota in humans. *PLoS one* **8**, e59260 (2013).
6. E. S. Charlson *et al.*, Disordered microbial communities in the upper respiratory tract of cigarette smokers. *PLoS one* **5**, e15216 (2010).
7. P. J. Barnes, The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *The Journal of clinical investigation* **118**, 3546 (Nov, 2008).
8. A. Chaudhry *et al.*, Interleukin-10 signaling in regulatory T cells is required for suppression of Th17 cell-mediated inflammation. *Immunity* **34**, 566 (Apr 22, 2011).
9. S. Huber *et al.*, Th17 cells express interleukin-10 receptor and are controlled by Foxp3(-) and Foxp3+ regulatory CD4+ T cells in an interleukin-10-dependent manner. *Immunity* **34**, 554 (Apr 22, 2011).
10. W. Hueber *et al.*, Secukinumab, a human anti-IL-17A monoclonal antibody, for moderate to severe Crohn's disease: unexpected results of a randomised, double-blind placebo-controlled trial. *Gut* **61**, 1693 (Dec, 2012).
11. M. Pichavant *et al.*, Oxidative stress-mediated iNKT-cell activation is involved in COPD pathogenesis. *Mucosal immunology* **7**, 568 (May, 2014).
12. D. L. Demeo *et al.*, IL10 polymorphisms are associated with airflow obstruction in severe alpha1-antitrypsin deficiency. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **38**, 114 (Jan, 2008).
13. J. O. Shim *et al.*, Interleukin-10 receptor mutations in children with neonatal-onset Crohn's disease and intractable ulcerating enterocolitis. *European journal of gastroenterology & hepatology* **25**, 1235 (Oct, 2013).
14. N. Maharshak *et al.*, Altered enteric microbiota ecology in interleukin 10-deficient mice during development and progression of intestinal inflammation. *Gut microbes* **4**, 316 (Jul-Aug, 2013).
15. R. Kuhn, J. Lohler, D. Rennick, K. Rajewsky, W. Muller, Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* **75**, 263 (Oct 22, 1993).
16. S. Vaishnava *et al.*, The antibacterial lectin RegIIIgamma promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. *Science* **334**, 255 (Oct 14, 2011).
17. T.R. Martin *et al.*, Pulmonary responses to bronchoconstrictor agonists in the mouse. *J Appl Physiol* **64**:2318-2323 (1988).
18. S. Normand *et al.* Nod-like receptor pyrin domain-containing protein 6 (NLRP6) controls epithelial self-renewal and colorectal carcinogenesis upon injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **108** (23):9601–9606 (2011).
19. M. Montbarbon *et al.*, Colonic inflammation in mice is improved by cigarette smoke through iNKT cells recruitment. *PLoS One* **8** (4):e62208 (2013)

5. Supplementary Datas



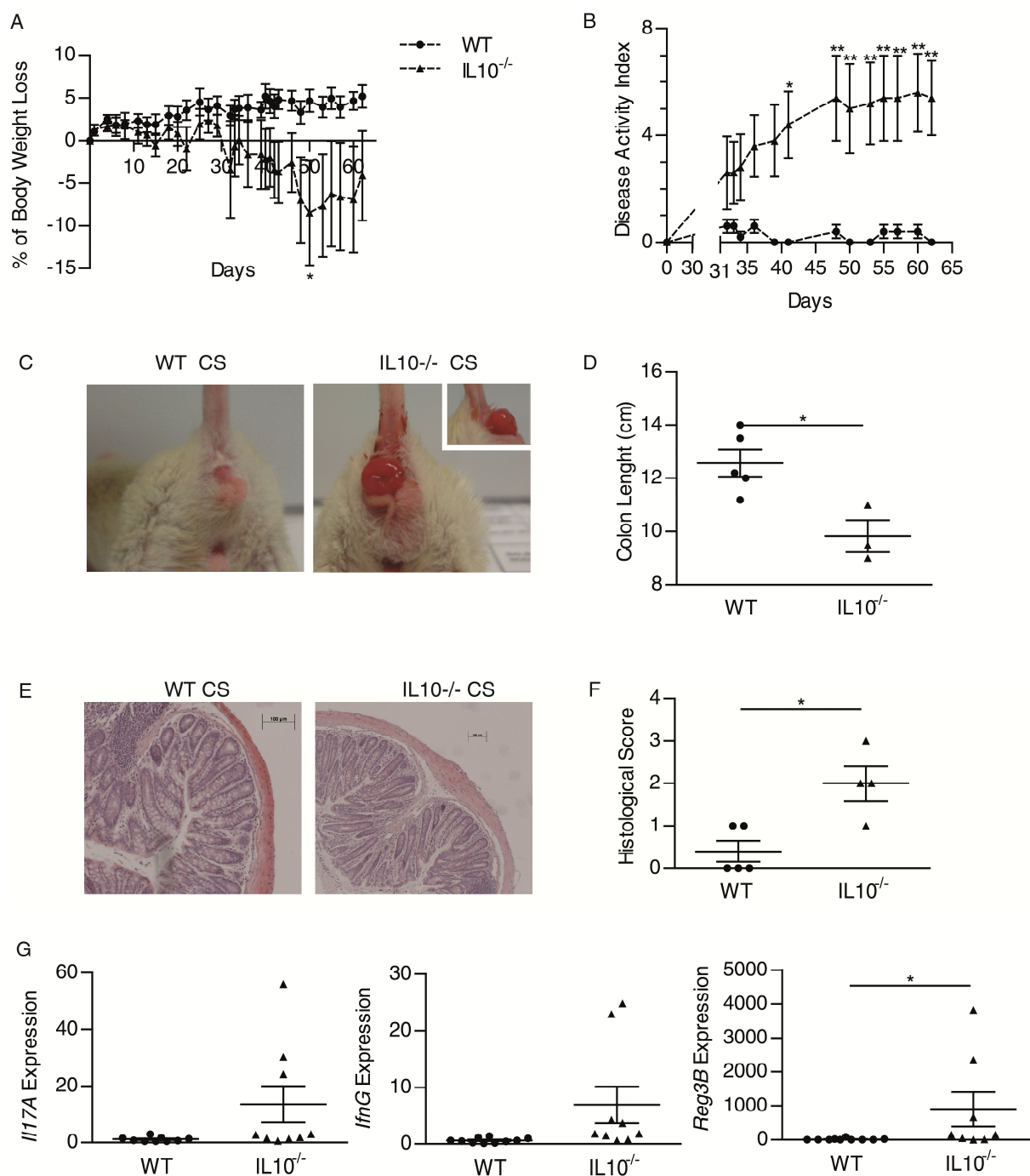
Supplementary data Figure 1

Cell Recruitment in ITIB Mice exposed to CS. ITIB mice were exposed to Air or to CS for 4 days, 2 weeks and 8 weeks. Lung mononuclear cells were treated with CCF4-AM substract. β -Lactamase producing cells were analysed using flow cytometry. Percentages of CD45+ cells, CD45+ CD11c+ F4/80+ macrophages and CD45+ TCR β - NK1.1+ NK cells recruitment were assessed (n=3-12). *p<0.05, **p<0.01.



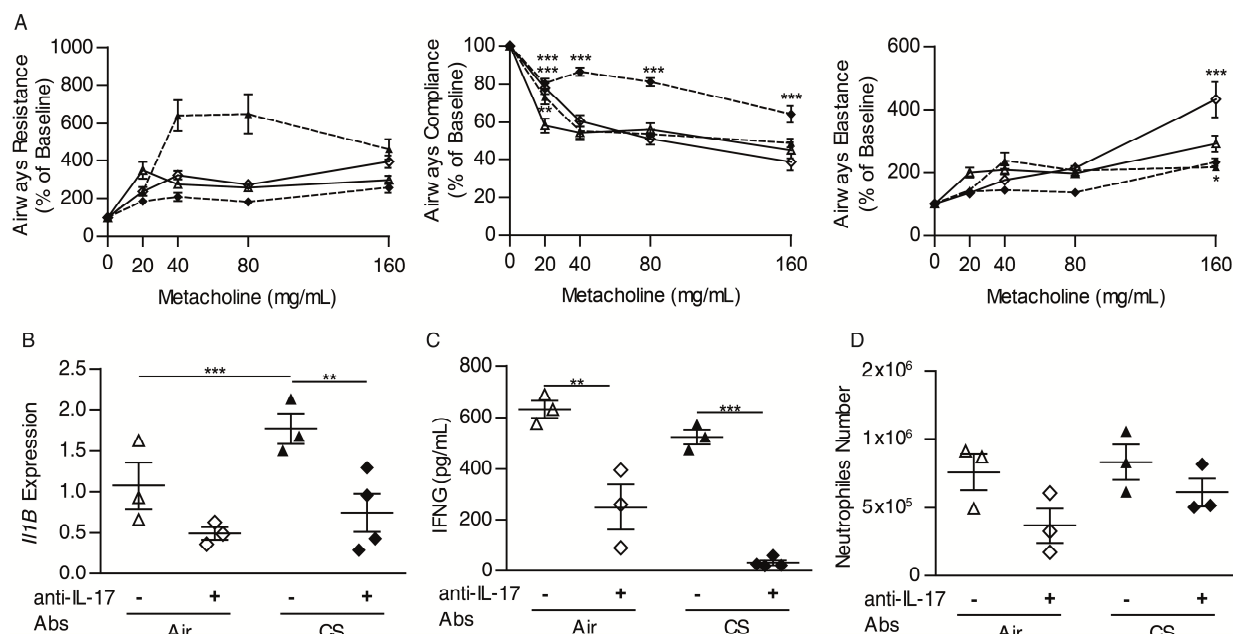
Supplementary data Figure 2

Analysis of lung function decline induced by CS in IL-10 deficient mice. WT and IL-10^{-/-} mice were exposed to CS, 5 days a week, over a period of 8 weeks. Changes in dynamic compliance (A) and airway elastance (B) were measured on mechanically ventilated mice, in response to increasing doses of metacholine. Data are expressed as mean \pm SEM. Results are representative of four independent experiments, and compared to Air-exposed WT mice. (C) Lung tissues were collected and *mmp12* mRNA copy numbers were determined by quantitative RT-PCR. Datas are normalized to the expression of *Gapdh* and are expressed as fold increased over average gene expression in air-exposed mice **p<0.01, ***p<0.001.



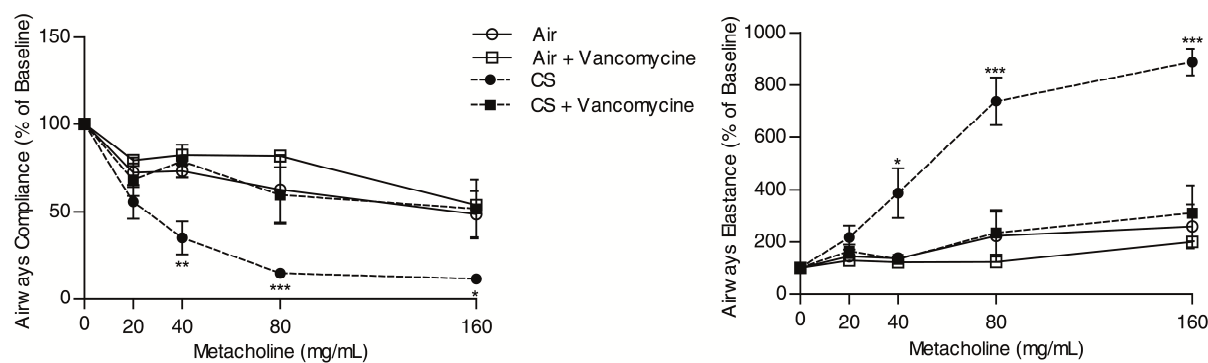
Supplementary data Figure 3 :

Impact of long term exposure to cigarette smoke. Wild-type (WT) and IL-10^{-/-} mice were exposed to CS, 5 days a week, over a period of 8 weeks. (A) Changes in body weight. Results are representative of three independent experiments. (B) Disease Activity Index (C) Prolapsus apparition under smoke exposure in IL10^{-/-} mice (D) Colon length (cm) (E) Representative H&E staining of paraffin-embedded longitudinal sections from colons of Wt and IL10^{-/-} mice Scale bar: 100 μ m. (F) Cell infiltration, epithelial hyperplasia and goblet cells destruction as assessed by two blinded observers (on a scale of 0–4) (G) Colon tissues were collected and il-17A, ifn- γ and reg-III β mRNA copy numbers were determined by quantitative RT–PCR. Data are normalized to expression of β -Actin and are expressed as fold increased over average gene expression in air-exposed untreated mice. *p<0.05, **p<0.01



Supplementary data Figure 4

Blocking anti-IL-17 Abs limit lung function decline and inflammation due to CS-exposure in IL-10 deficient mice. IL-10^{-/-} mice were exposed to CS, 5 days a week, over a period of 8 weeks. From week 4 to week 8, some mice were weekly injected with 100µg of blocking anti-IL-17 Abs intra-peritoneally. (A) Changes in airway resistance, dynamic compliance and airway elastance were evaluated as previously described (17). Results are expressed as the mean ± SEM. (△Air, ◇ Air + anti-IL-17 Abs, ▲ CS, ◆ CS + anti-IL-17 Abs) (B) Lung tissues were collected and il-1β mRNA copy numbers were determined by quantitative RT-PCR. Data are normalized to expression of Gapdh and are expressed as fold increased over average gene expression in air-exposed untreated mice. (C) The concentration of IFN-γ was assessed by ELISA in the supernatants from lung suspensions cultivated for 48 hours. The values represent mean + SEM. (D) Absolute number of CD45+ CD11c- CD11bhigh Ly6Ghigh neutrophils was determined in lung tissues by flow cytometry. Data are expressed as mean ± SEM. **p<0.01, ***p<0.001.



Supplementary data Figure 5

Wild-type (WT) mice were exposed to CS, 5 days a week, over a period of 8 weeks. Concomitantly mice were treated with vancomycin (0,5g/L) in the drinking water to deplete Gram+ bacteria. Changes in dynamic compliance and airway elastance were measured on mechanically ventilated mice, in response to increasing doses of metacholine. Data are expressed as mean ± SEM. Results are representative of two independent experiments, and compared to Air-exposed WT mice. **p<0.01, ***p<0.001.

VIII. Discussion et Perspectives

La Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO) représente, au sein des pays industrialisés et plus particulièrement dans notre région, un important problème de santé publique, à la fois d'un point de vue sociétal, médical et économique.

Il s'agit d'une maladie inflammatoire chronique du poumon se traduisant par une obstruction progressive des bronches, partiellement ou non réversible, incluant bronchite chronique, hypersécrétion de mucus et emphysème.

Le premier facteur de risque impliqué dans le développement de cette maladie est l'exposition à la fumée de cigarette qui induit un stress oxydatif au sein du poumon responsable en partie du développement de la BPCO.

La fumée de cigarette expose le poumon à des niveaux extrêmes de stress oxydatif. Dans sa phase gazeuse, la fumée de cigarette contient plus de 10^{14} molécules oxydantes réactives par bouffée. La fumée de cigarette induit une augmentation de la charge oxydante et provoque des changements irréversibles dans les systèmes antioxydants protecteurs au niveau des voies respiratoires. Ce stress oxydatif associé à la fumée de cigarette va provoquer au sein du poumon une inflammation importante et un déclin de la fonction pulmonaire. (Kirkham *et al.*, 2011 ; Kinnula 2005 ; Rahman *et al.*, 2006a ; Rahman *et al.*, 2006b). Au cours de ce travail, nous avons montré que ce stress oxydatif entraînait via son action sur les cellules présentatrices d'antigènes, l'activation des cellules *i*NKT qui jouaient alors un rôle délétère dans la physiopathologie de la BPCO.

D'autre part, nous avons également constaté que la fumée de cigarette induisait la production de l'Interleukine 10 qui présente un rôle important dans le contrôle des réponses inflammatoires induites au cours de la pathologie.

A. Rôle des cellules *i*NKT dans le développement de la BPCO

Dans notre modèle d'exposition chronique à la fumée de cigarette, nous avons pu observer que les cellules *i*NKT étaient rapidement recrutées au sein du poumon (dès la première semaine d'exposition) puis après la deuxième semaine, leur fréquence augmentait avec le temps d'exposition. Cette diminution que nous observons à deux semaines d'exposition, pourrait être expliquée par une internalisation de leur TCR invariant suite à l'activation de ces cellules comme décrit par Wilson *et al.* (Wilson *et al.*, 2003), rendant leur identification impossible. De plus, ces cellules *i*NKT activées, caractérisées par l'augmentation de l'expression du CD69, produisent de fortes concentrations d'IL-17 et d'IFN- γ après exposition à la fumée de cigarette. Ce recrutement et cette activation suggèrent que les cellules *i*NKT ont un rôle important dans le développement précoce de la BPCO

De manière à étudier le rôle de ces cellules dans la physiopathologie de la BPCO, nous avons utilisé des souris déficientes pour la molécule CD1d (notée *CD1d*^{-/-}) ou pour le segment $J\alpha 18$ du TCR (notée *J\alpha 18*^{-/-}). Les souris *CD1d*^{-/-} sont caractérisées par l'absence de cellules NKT

restreintes au CD1d (NKT variants et invariants) (Hong *et al.*, 1999) tandis que les souris $J\alpha 18^{-/-}$ quant à elles seront complètement dépourvues de cellules *i*NKT (Cui *et al.*, 1997).

Le déficit en *i*NKT diminue considérablement les signes pathologiques de la BPCO. En effet, à la fois dans les souris $CD1d^{-/-}$ et dans les souris $J\alpha 18^{-/-}$, la résistance pulmonaire en réponse à la métacholine après exposition à la fumée de cigarette est équivalente à celle observée chez les souris WT air. Cela souligne que les cellules *i*NKT sont essentielles au développement de cette pathologie chez la souris. Dans ces analyses, nous avons pu constater que comparativement aux souris WT exposées à la fumée de cigarette les souris déficientes en *i*NKT ne présentent pas d'élargissement des espaces alvéolaires ni de remodelage pulmonaire associé à des infiltrats inflammatoires. Ces observations sont à mettre en parallèle avec le fait que nous ne retrouvons pas dans les souris déficientes en *i*NKT d'augmentation du nombre de neutrophiles qui jouent un rôle clé dans l'apparition de ces lésions (Alcorn *et al.*, 2010).

Cette diminution du nombre de neutrophiles peut être associée à une réduction dans la production d'IL-17 qui est une cytokine connue pour induire le recrutement des neutrophiles via la production de chimiokines telles que le CXCL-1, -5 ou -8 par les cellules épithéliales ou les fibroblastes (Laan *et al.*, 1999). De plus, les niveaux d'ARN messagers codant la MMP-12 sont bien plus élevés dans les souris WT exposées à la fumée de cigarette que dans les souris déficientes en NKT. La MMP-12 est une métallo-protéase matricielle dont l'action a été mise en cause dans la destruction du parenchyme pulmonaire au cours de la BPCO (Hunninghake *et al.*, 2009). De manière intéressante, l'IL-17 est également capable d'induire, en plus du recrutement des neutrophiles, la production de MMP-12 par les macrophages (Shan *et al.*, 2009). La production d'IL-17 par les cellules *i*NKT semble donc jouer un rôle primordial dans le développement de la BPCO. En effet, lors d'expériences impliquant un stress oxydatif aigu en utilisant l'hydroperoxyde de cumène, les souris déficientes en NKT ne présentent pas de déclin dans leur fonction respiratoire. De plus, dans les souris $J\alpha 18^{-/-}$, le transfert adoptif de cellules *i*NKT issues de souris WT permet de restaurer la réponse observée dans les souris sauvages. Cela n'est pas le cas lorsque ces souris sont reconstituées avec des *i*NKT incapables de produire de l'IL-17 (issues de souris $il-17^{-/-}$), démontrant le rôle clé de l'IL-17 dans l'atteinte de la fonction pulmonaire. D'autres études effectuées au préalable avaient montré que les cellules *i*NKT présentaient un rôle délétère dans les dommages pulmonaires notamment causés par l'hypoxie dans un modèle utilisant l'exposition à l'ozone, un autre type d'oxydant. Dans ce contexte, les cellules *i*NKT présentaient plutôt un profil de sécrétion de cytokines de type Th2 contrairement à notre modèle de BPCO où les cytokines produites sont plutôt de type Th17 (Pichavant *et al.*, 2008). En fonction du type de stress oxydatif imposé au poumon, les cellules *i*NKT seraient donc capables de mettre en œuvre différents types de réponses. Les cellules *i*NKT présentent donc un rôle délétère dans le développement de la BPCO et ce, de par leur production d'IL-17. Cette caractéristique en fait une cible intéressante pour d'éventuelles thérapeutiques. L'utilisation d'anticorps bloquant anti-IL-17 dans le but de limiter la physiopathologie de la BPCO est une piste qui est déjà explorée (Shen *et al.*, 2011). L'utilisation d'un anticorps neutralisant anti-IL-17 dans cette étude conduit à l'observation d'une diminution du nombre de neutrophiles dans les lavages broncho-alvéolaires ainsi que d'une réduction de l'expression de MUC5AC, une mucine dont l'expression est induite dans la BPCO. Cet effet inhibiteur conduit à une diminution de

l'inflammation causée par les neutrophiles dans les poumons. Une autre piste à envisager pourrait être l'inhibition de l'activation des cellules *i*NKT. Les cellules *i*NKT sont capables d'entrer dans un état d'anergie suite à une seconde stimulation avec l' α -GalactosylCeramide, le puissant activateur spécifique de ces cellules. Cet état d'anergie est un état de « non-réponse » des cellules *i*NKT qui alors ne présentent pas d'internalisation de leur TCR, ni de production de cytokines, ni de transactivation des cellules dendritiques (Parekh *et al.*, 2005). L'utilisation de molécules, telles que des agonistes comparables à l' α -GalactosylCeramide, pouvant conduire ces cellules *i*NKT dans un état d'anergie pourrait permettre de limiter leur effet délétère dans le cadre de la BPCO. Une proposition de ce type de thérapeutique fait actuellement l'objet d'un brevet déposé par le laboratoire (Pichavant *et al.*, 2013). Par ailleurs, l'IL-10 semble également capable de limiter la production d'IL-17 en réponse à la fumée de cigarette et notamment par les cellules *i*NKT. La capacité de l'IL-10 à limiter la réponse IL-17 a également été évoquée dans l'effet de la fumée de cigarette sur le développement d'une colite expérimentale. Dans ce contexte, nous avons pu observer un afflux de cellules NKT dans le côlon mais ces cellules étaient dans l'incapacité de produire de l'IL-17 probablement du fait de la production massive d'IL-10. Cette balance permet de contrôler l'inflammation dans la muqueuse ciblée (Montbarbon *et al.*, 2013).

B. Mécanismes d'activation des cellules *i*NKT en réponse à la fumée de cigarette.

Après avoir défini le rôle délétère des cellules *i*NKT productrices d'IL-17 dans la BPCO, nous avons tenté d'identifier les mécanismes d'activation de ces cellules mis en jeu lors de l'exposition à la fumée de cigarette. Les cellules *i*NKT sont capables d'être activées et de répondre très rapidement à la stimulation. Actuellement, trois mécanismes d'activation des cellules *i*NKT ont été décrits. Les cellules *i*NKT peuvent être activées classiquement à travers la reconnaissance par leur TCR d'un antigène glycolipidique (exogène ou endogène) présenté via la molécule CD1d, une molécule atypique appartenant à la famille des CMH de classe I (Burdin *et al.*, 1998). Un autre mécanisme d'activation implique à la fois la reconnaissance par le TCR et l'action de cytokines. Ce type d'activation est notamment rencontré lors de la réponse à certaines bactéries. Ces dernières, probablement via la stimulation des récepteurs TLR, induisent la néo-synthèse d'antigènes lipidiques par les cellules présentatrices d'antigène qui seront présentés par la molécule CD1d qui concomitamment avec l'action de cytokines telles que l'IL-12, l'IL-1 β , l'IL-23 ou encore les interférons de type I vont permettre d'activer les cellules *i*NKT (Paget *et al.*, 2007 ; Kronenberg M., 2005). Enfin, dans certains contextes, les cellules *i*NKT sont capables d'être activées par des cytokines seules dont notamment l'IL-12 (Brigl *et al.*, 2011). L'activation des cellules *i*NKT nécessite donc la présence de cellules présentatrices d'antigènes. Nous nous sommes donc intéressés aux différentes populations de cellules présentatrices d'antigène présentes au sein du poumon et notamment les macrophages alvéolaires et deux sous-populations de cellules dendritiques, les cellules CD11b+CD103⁻ et les cellules CD11b-CD103⁺ qui toutes expriment le CD1d. Ces deux types cellulaires se trouvent être recrutés (bien que les macrophages alvéolaires soient déjà fortement présents en base dans le poumon) et activés, avec une augmentation de l'expression

de la molécule CD40 et du CMH de classe II, en réponse à la fumée de cigarette. Des études avaient déjà montré que les macrophages alvéolaires étaient capables d'activer les cellules *i*NKT par voie cytokinique, et notamment via la sécrétion d'IL-13 (Kim *et al.*, 2008). Cependant, en allant plus en avant dans l'analyse transcriptomique de ces cellules, nous nous sommes rendu compte que seule la sous-population de cellules dendritiques CD11b⁺ présentait une augmentation dans l'expression à la fois de l'IL-12 et de la molécule CD1d. En effet, contrairement aux cellules dendritiques CD103⁺ qui sont plutôt résidentes, les DC CD11b⁺ vont être recrutées depuis le compartiment vasculaire sur les sites d'inflammation et seraient alors spécifiquement activées et effectrices dans ce type de contexte (Condon *et al.*, 2011). Dans notre modèle, les DC CD11b⁺ expriment fortement des marqueurs en relation avec l'activation des cellules *i*NKT et notamment l'IL12p40 et le CD1d en comparaison aux autres types cellulaires analysés. Cependant, il serait intéressant de déterminer quels signaux sont vraiment nécessaires pour l'activation des cellules *i*NKT. Pour étudier ce mécanisme dans le cadre du stress oxydatif, nous pourrions essayer d'isoler chaque voie afin de déterminer si l'activation des cellules *i*NKT est dépendante de la stimulation du TCR, des cytokines ou des deux types de signaux. Le rôle des cytokines peut être analysé à l'aide d'anticorps neutralisants ou de souris déficientes. Pour étudier le rôle de la signalisation via le TCR, nous pourrions utiliser le modèle court de stress oxydatif en administrant l'hydroperoxyde de cumène à des souris WT irradiées, dont le compartiment médullaire a été reconstitué avec de la moelle osseuse issue de souris *CD1d*^{-/-} suivi d'un transfert adoptif de cellules *i*NKT WT. Ce protocole ne permettrait cependant pas de bloquer les interactions entre les cellules de structure exprimant également le CD1d et qui peuvent potentiellement intervenir dans l'activation des cellules *i*NKT par la fumée de cigarette. Un autre moyen d'étudier de manière individuelle la voie du TCR *versus* la voie des cytokines serait l'utilisation d'anticorps neutralisants anti-CD1d qui nous a permis de montrer *in vitro*, une inhibition partielle de l'activation des cellules *i*NKT par la fumée de cigarette (données non publiées). L'intérêt de la voie d'activation par le TCR est renforcé par la modulation de certaines glycosyltransférases impliquées dans le métabolisme des lipides des cellules présentatrices d'antigène et capable d'entraîner l'activation des cellules *i*NKT via la présentation de glycolipides endogènes (Paget *et al.*, 2007 ; Hercend *et al.*, 1984 ; Schumann *et al.*, 2007). Dans notre modèle, nous avons constaté que les DC CD11b⁺ exprimaient fortement les gènes codant les enzymes UGCG (Céramide GlucosylTransférases) et St3Gal5 (ST3 Beta-Galactoside Alpha-2,3-Sialyltransferase 5 ou ganglioside GM3 synthase), suggérant une implication de la voie de métabolisme des glycosphingolipides dans les DC CD11b⁺ dans l'activation des cellules *i*NKT en réponse à la fumée de cigarette. En observant la cinétique d'expression de la molécule CD1d et de l'IL-12p40 dans les DC CD11b⁺, nous pouvons constater que le pic d'expression du CD1d se trouve au début de l'exposition alors que celui de l'IL-12p40 se trouve à dix semaines d'exposition à la fumée de cigarette. L'activation primaire des cellules *i*NKT pourrait donc être induite via la reconnaissance du CD1d par leur TCR invariant puis serait entretenue dans un second temps par la sécrétion d'IL-12p40 par les DC CD11b⁺. La mise en place d'une cinétique plus détaillée pourrait peut être nous permettre de mieux caractériser le mode d'activation des cellules *i*NKT au cours de l'exposition. De plus, des résultats préliminaires obtenus *in vitro* et utilisant des techniques de culture sur inserts et des anticorps neutralisants

anti-CD1d montrent que la signalisation via le TCR est primordiale et est accompagnée d'une participation complémentaire de facteurs solubles, probablement des cytokines (données non montrées). L'utilisation de DC issues de souris déficientes pour l'IL-1b, l'IL-6 et l'IL-23p19 ainsi que la caractérisation physico-chimique du lipide généré après activation par la fumée de cigarette permettront d'élucider le rôle de ces différents éléments.

Bien que les cellules issues du compartiment myéloïde soient très importantes dans l'activation des cellules *i*NKT, il ne faut pas négliger les cellules de structure du compartiment pulmonaire dans cette possible activation. En effet, les cellules épithéliales représentent le plus grand nombre de cellules dans le poumon et leur contact étroit avec les polluants aériens leur confère une place de choix dans la surveillance. Ces cellules expriment également le CD1d et peuvent donc potentiellement activer les cellules *i*NKT. Dans notre étude, l'activation *in vitro* de cellules épithéliales à la fois humaines et murines par des extraits de fumée de cigarette nous montre que celles-ci sont capables d'activer en retour les cellules *i*NKT qui produiront alors essentiellement de l'IFN- γ alors que dans ce même modèle les DC humaines (dérivées de monocytes du sang total) et murines (issues de la moelle osseuse) induisent plutôt une sécrétion d'IFN- γ et d'IL-17. Cette différence dans l'expression des cytokines des *i*NKT en réponse à une activation des cellules présentatrices d'antigène par la fumée de cigarette pourrait être expliquée par l'environnement cytokinique. Nous avons observé une augmentation de l'expression de l'IL-12p40 dans les DC CD11b+, sous unité qui, en dimère avec l'IL-12p35, forme la cytokine pro-Th1 IL-12 (Kobayashi *et al.*, 1989). Or l'IL-12 est capable de stimuler l'activation des cellules *i*NKT sécrétant de l'IFN- γ . Cependant, l'IL-12p40 peut également former un hétérodimère avec l'IL-23p19 formant ainsi la cytokine pro-Th17 IL-23 (Oppmann *et al.*, 2000 ; Iwakura *et al.*, 2006). Bien que les DC CD11b+ ne montrent pas d'augmentation dans l'expression de l'IL-23p19, celle-ci est augmentée dans l'étude du poumon entier suggérant que d'autres types cellulaires induiraient la production d'IL-17 par les *i*NKT via la sécrétion d'IL-23.

L'axe IL-23/IL-17 représente une cible thérapeutique intéressante dans le but de limiter l'inflammation chronique, dépendante de l'IL-17, observée dans la BPCO. Actuellement, des agents biologiques bloquant l'IL-23 et l'IL-17 sont en cours de développement, notamment, le Ustekinumab, un anticorps monoclonal ciblant la sous unité IL-12p40 de l'IL-23, a montré une certaine efficacité dans la résolution de l'inflammation chez des patients atteints de psoriasis, pathologie impliquant également l'axe IL-23/IL-17 (Toussirot E., 2012) et a reçu une autorisation de mise sur le marché.

C. Implication et contrôle du stress oxydatif dans la BPCO

L'implication des cellules présentatrices d'antigène dans l'activation des *i*NKT conduit à s'interroger sur le mode d'activation de ces cellules par la fumée de cigarette. L'exposition à la fumée de cigarette expose le poumon à des niveaux extrêmes de stress oxydatif. En réponse à ce stress, le poumon met en place des systèmes de défense anti-oxydant dans le but d'équilibrer la balance oxydants/antioxydants (Rahman *et al.*, 2006a). Parmi ces défenses, nous pouvons retrouver différentes enzymes dont l'Hème-Oxygénase 1 (HO-1) et la NADPH déshydrogénase Quinone-1 (NQO-1). HO-1 est une des principales défenses anti-oxydante du

poumon, elle catalyse la dégradation de l'hème afin de produire du monoxyde de carbone (possédant des propriétés anti-inflammatoires), de la biliverdine qui sera convertie en bilirubine (un puissant anti-oxydant) et en fer libre qui se liera à la ferritine (molécule anti-oxydante) (Goven *et al.*, 2009) et NQO-1 est une réductase qui, en plus de détoxifier les quinones réactives, présente une activité anti-oxydante (Siegel *et al.*, 2004).

Dans nos modèles cellulaires, l'exposition de cellules épithéliales pulmonaires et dendritiques humaines aux extraits de fumée de cigarette induit bien *in vitro* l'expression de HO-1 et de NQO1 dans une cinétique pouvant varier d'un type cellulaire à l'autre. Afin de tester le rôle du stress oxydatif sur l'activation des cellules *i*NKT, nous avons pré-traité nos cellules présentatrices d'antigène avec un anti-oxydant, la N-Acétylcystéine (NAC). Ce traitement induit une réduction dans l'expression des enzymes anti-oxydantes citées précédemment (démontrant une inhibition du stress oxydatif dans ces cellules) mais est également capable de réduire l'activation des cellules *i*NKT qui se traduit par une sécrétion d'IFN- γ réduite. Ces résultats montrent que le stress oxydatif agit sur les cellules présentatrices d'antigènes induisant par ce biais l'activation des cellules *i*NKT. La manière dont le stress oxydatif agit sur les cellules présentatrices d'antigène afin d'induire l'activation des cellules *i*NKT n'a pas été élucidée dans ce travail mais plusieurs hypothèses pourraient être évoquées. En présence d'un stress oxydatif, le métabolisme des lipides, et notamment du cholestérol et des céramides peuvent être altérés (Cutler *et al.*, 2004) et l'augmentation dans la production de glycolipides endogènes pourrait induire l'activation des cellules *i*NKT. Dans notre modèle cellulaire, nous avons constaté notamment que l'utilisation de la NAC au préalable de l'exposition à la fumée de cigarette entraîne une diminution de l'expression des enzymes impliquées dans le métabolisme des lipides (UGCG et ST3 GAL5). De plus, le stress oxydatif induit par la fumée de cigarette est capable d'activer la voie de signalisation de NF- κ B (Morgan *et al.*, 2010) qui pourrait alors induire l'expression de cytokines ou de molécules impliquées dans l'activation des cellules *i*NKT. D'un autre côté, la présence du stress oxydatif peut également conduire à la carbonylation des lipides (Kirkham *et al.*, 2011) qui deviennent alors fortement immunogènes. Une fois internalisés par les cellules présentatrices d'antigène, ces lipides modifiés pourraient être présentés par le CD1d aux cellules *i*NKT dans le but de les activer. La peroxydation des lipides par le stress oxydatif peut conduire à une désorganisation de la membrane cellulaire et à l'apoptose (Ciencewicki *et al.*, 2008). Or, les cellules *i*NKT peuvent être activées suite à la reconnaissance par la molécule TIM-1 présente à leur surface cellulaire, de la phosphatidyl sérine exposée à la surface des cellules apoptotiques (DeKruyff *et al.*, 2010, Lee *et al.*, 2010). Bien que le stress oxydatif puisse conduire à la mort cellulaire par apoptose ou nécrose des cellules épithéliales alvéolaires par exemple (Aoshiba *et al.*, 2003), il a été montré que pour d'autres types cellulaires, tels que les neutrophiles, cette apoptose était inhibée par le stress oxydatif permettant à ces dernières de continuer à exercer leur rôle dans le processus inflammatoire de la BPCO (Brown *et al.*, 2009). L'implication de cette voie d'activation par l'apoptose est donc peu probable.

L'utilisation de manière préventive de la NAC *in vivo* inverse les symptômes de la BPCO observés chez les souris seulement exposées à la fumée de cigarette. L'effet de cet anti-oxydant conduit à une forte limitation du déclin de la fonction respiratoire et à une réduction de la

destruction du parenchyme pulmonaire. De plus, le recrutement de cellules *i*NKT activées au sein du poumon est diminué ainsi que leur production d'IL-17. Ces données permettent donc de confirmer le lien existant entre le stress oxydatif, le recrutement et l'activation des cellules *i*NKT et la BPCO.

En plus de l'activation des cellules, le stress oxydatif intervient dans l'altération de différents composants du poumon comme la contraction des cellules musculaires lisses, la stimulation de la sécrétion de mucus, l'augmentation de la perméabilité et la diminution de l'adhérence des cellules épithéliales alvéolaires, la synthèse et la fragmentation de l'élastine et du collagène ou dans l'inactivation de certaines antiprotéases (Dekhuijzen *et al.*, 2006). L'utilisation de thérapies anti-oxydantes présente donc un intérêt certain dans la BPCO indépendamment de son implication dans l'activation des cellules *i*NKT.

Différentes études rétrospectives ont montré que l'utilisation de la NAC comme traitement anti-oxydant jouait un rôle bénéfique dans la BPCO et diminuait notamment les exacerbations (Dekhuijzen *et al.*, 2006). Cependant, en plus de ses propriétés anti-oxydantes, la NAC possède une activité mucolytique néfaste notamment pour les patients présentant une hypersécrétion de mucus et ne doit pas être utilisée selon les recommandations de la SPLF (Recommandations pour la prise en charge de la BPCO : Autres traitements médicamenteux, 2003).

D'autres traitements visant les systèmes anti-oxydants pourraient être explorés. Par exemple, l'exposition au stress oxydatif va induire l'expression d'anti-oxydants sous le contrôle de la voie de Nrf2 (facteur de transcription clé dans la réponse anti-oxydante). Il a été montré une inhibition des mécanismes de protection anti-oxydant, en particulier de Nrf2, au cours de la BPCO alors que le stress oxydatif persiste (Malhotra *et al.*, 2008). Dans nos travaux (non montrés), nous avons alors supposé que la répression de Nrf2 potentialiserait l'activation des NKT alors que celle de Keap1 (le répresseur de Nrf2) devrait avoir un effet opposé. Afin d'étudier l'implication de cette voie, nous avons utilisé des ARN interférents (siRNA) pour inhiber *in vitro* l'expression de NRF2 dans des cellules épithéliales pulmonaires ou des DC. L'addition de siRNA spécifiques de Nrf2 permet de bloquer l'expression d'une enzyme anti-oxydante, HO-1 induite par la fumée de cigarette. De plus, la répression de Nrf2 va entraîner une légère augmentation de l'expression de l'UGCG et de la GM3 synthase, enzymes impliquées dans la synthèse des glycosphingolipides capables d'activer les cellules NKT *via* le CD1d.

Dans le but d'activer la voie NRF2, nous avons utilisé le sulforaphane, un composé organosulfuré présentant des propriétés anticancéreuses, antidiabétiques et antimicrobiennes dans des modèles expérimentaux (Fahey *et al.*, 1999). Nous avons alors constaté une augmentation de l'expression de HO-1 et de Nrf2 en présence de fumée de cigarette. Cependant, l'addition de ce composé ne modulait pas significativement l'effet de la fumée de cigarette sur les cellules épithéliales pulmonaires. De plus, lors de nos expériences *in vivo*, l'utilisation de sulforaphane n'a pas montré d'effets bénéfiques sur le déclin de la fonction pulmonaire et entraînait chez nos souris une hypersécrétion de mucus dans le tractus pulmonaire.

D'autres voies de recherche pourraient être explorées telles que celle de l'activation mitochondriale et des désordres métaboliques associés à la BPCO. Des traitements visant à

promouvoir la glycolyse induite par la respiration mitochondriale et à empêcher l'induction de la β -oxydation des acides gras, pourraient améliorer le statut redox des cellules exposées à la fumée de cigarette et limiter le développement de la réponse IL-17 (Agarwal *et al.*, 2014).

En conclusion de ce premier travail, nos travaux ont permis d'identifier de nouveaux mécanismes pathogéniques pouvant conduire à la BPCO.

L'exposition chronique à la fumée de cigarette conduit, chez des patients BPCO sévères selon la classification de GOLD, à la perte partielle de certains mécanismes anti-oxydants. En effet, Malhotra et ses collaborateurs, en 2008, avaient observé un défaut de production de HO-1 chez ces patients. Ce défaut était expliqué par la perte d'une molécule stabilisatrice de NRF2, le facteur de transcription clé dans la réponse au stress oxydatif (Malhotra *et al.*, 2008). Cependant, d'autres voies d'induction de HO-1 sont connues et notamment celle impliquant l'IL-10 (Ricchetti *et al.*, 2004). Des travaux effectués au laboratoire ont montré que l'expression de l'IL-10 était induite au niveau de l'intestin en réponse à la fumée de cigarette (Montbarbon *et al.*, 2013). Nous nous sommes donc interrogés sur le rôle que pouvait exercer l'IL-10 dans le cadre d'une exposition chronique à la fumée de cigarette au niveau pulmonaire.

D. Rôle de l'IL-10 dans la BPCO induite par la fumée de cigarette.

Dans notre modèle d'exposition chronique à la fumée de cigarette, tout comme dans les travaux de Lim *et al.* (Lim *et al.*, 2000), nous avons pu observer une augmentation de l'expression de l'IL-10 dans le poumon à la fois au niveau transcriptomique et protéique en réponse à la fumée de cigarette. De plus, la production d'IL-10 est dépendante du stress oxydatif puisque les souris recevant un traitement préventif à la NAC et exposées à la fumée de cigarette montrent une réduction de cette expression en comparaison aux souris non traitées (données non publiées). Cela pourrait indiquer le lien entre la production d'IL-10 et la réaction inflammatoire elle-même (liée à l'exposition à la fumée) puisque cette cytokine intervient pour limiter la durée de l'inflammation et empêcher sa pérennisation. L'IL-10 est une cytokine présentant une activité pléiotropique qui peut être sécrétée par différents types cellulaires (Saraiva *et al.*, 2010). De manière à identifier les cellules impliquées dans la sécrétion d'IL-10 en réponse à la fumée de cigarette, nous avons utilisé des souris ITIB qui possèdent deux gènes rapporteurs insérés dans le gène codant l'IL-10. Ces souris ont été exposées à la fumée de cigarette et l'expression de l'IL-10 a été analysée à différents temps. Notre première constatation fut que les cellules du compartiment leucocytaire (CD45+) produisaient de l'IL-10 dès quatre jours d'exposition. La caractérisation phénotypique des cellules productrices a permis d'établir une cinétique d'expression dans certains types cellulaires. En réponse à la fumée de cigarette, les macrophages alvéolaires sont les premières cellules à produire cette cytokine. Cette production précoce peut s'expliquer par le fait que les macrophages soient en nombre important dans la lumière du poumon et qu'elles représentent la première ligne de défense de cet organe. La production d'IL-10 par les macrophages n'est pas maintenue et le relais est ensuite pris par les cellules NK jusqu'au terme des huit semaines d'exposition. De manière surprenante, les cellules T reg (source importante d'IL-10) ne sont pas activées ni recrutées dans ce contexte, ce résultat étant confirmé par l'analyse de l'expression de FoxP3.

Cela suggère que ces cellules ne jouent pas un rôle essentiel dans le contrôle de cette pathologie. Cependant, l'utilisation de souris ITIB ne nous permet pas d'établir une quantité précise de production d'IL-10 mais nous apporte plutôt une information qualitative nous permettant d'identifier la source cellulaire. En effet, l'induction de l'expression de cette cytokine par différents stimuli conduit à l'expression en parallèle d'une ou de deux molécules de β -Lactamase, et c'est cette activité β -Lactamase qui est détectée par cytométrie en flux (Bouabe *et al.*, 2011). Cette technique permet surtout de gagner en sensibilité par rapport aux techniques classiques de détection des cytokines (marquage intra-cellulaire).

L'IL-10 joue un rôle primordial dans le contrôle des réponses immunitaires et de l'inflammation. Dans le but d'étudier le rôle de cette cytokine dans le développement de la BPCO, nous avons utilisé des souris déficientes pour IL-10, notée IL-10^{-/-}. En effet, des études de Takanashi et ses collaborateurs (Takanashi *et al.*, 1999) ou de Zhang et ses collaborateurs (Zhang *et al.*, 2013) rapportent une diminution de l'IL-10 dans les crachats et le sérum de patients BPCO, ce qui suggère la présence d'un défaut de réponse de cette cytokine chez les patients développant une pathologie pulmonaire. Chez les souris IL-10^{-/-} exposées à la fumée de cigarette, l'expression non seulement de l'IL-17, mais également de l'IFN- γ est augmentée. La production de ces cytokines a pu être observée dans des lymphocytes T, où la production est augmentée chez les souris IL-10^{-/-} indépendamment de l'exposition à la fumée de cigarette. De plus, nous avons pu identifier une sous population de lymphocytes T exprimant à la fois de l'IL-17 et de l'IFN- γ en réponse à la fumée de cigarette chez les souris IL-10^{-/-}. De manière intéressante, la production d'IL-17 et d'IFN- γ a également été observée dans les cellules NKT. Dans ces cellules, la production d'IL-17 est plus importante chez les souris IL-10^{-/-} contrôle et est augmentée par la fumée de cigarette.

L'utilisation d'un anticorps neutralisant anti-IL-17 permet de restaurer la fonction pulmonaire et de réduire l'inflammation liée à l'absence d'IL-10 chez les souris fumeuses (diminution d'IL-1 β , d'IFN- γ et du recrutement des neutrophiles). Ces résultats suggèrent que la pathologie est principalement due à la présence de l'IL-17 et non directement liée au déficit en IL-10. Or l'exposition à la fumée de cigarette en absence de l'IL-10 conduit à une exacerbation de la réponse IL-17. Les mécanismes conduisant à cette production restent à déterminer dans le cadre du déficit en IL-10 mais font vraisemblablement intervenir la production d'IL-1 β et l'activation des cellules présentatrices d'antigène et de lymphocytes.

L'IL-1 β qui est augmentée chez les souris IL-10^{-/-} et après exposition à la fumée de cigarette, est une cytokine impliquée dans la différenciation de la lignée Th17 pathogénique responsable du développement de certaines maladies auto-immunes (Lee *et al.*, 2012). L'augmentation de l'expression de l'IL-1 β pourrait être expliquée par un défaut de contrôle de la signalisation de cytokines. En effet, une des molécules effectrices de l'action inhibitrice de l'IL-10 est SOCS3 dont le rôle est d'inhiber l'expression de cytokines (notamment les cytokines pro-inflammatoires) et leur action (Ding *et al.*, 2003). Cependant, l'expression de SOCS3 n'est pas modulée (données non montrées). La cytokine IL-10 exerce également son rôle immunorégulateur au travers de son action sur les cellules présentatrices d'antigène (de Waal Malefyt *et al.*, 1991b). Cependant, dans notre modèle, nous n'avons pas vu de variation de l'expression du CMH de classe II ou des molécules de costimulation sur les cellules dendritiques

ou sur les macrophages spécifiquement du au déficit en IL-10, par contre les macrophages étaient fortement recrutés au niveau du poumon chez les souris IL-10^{-/-} même en absence d'exposition à la fumée de cigarette (données non montrées). Des analyses supplémentaires sont nécessaires afin de déterminer la signature transcriptionnelle de ces cellules mais aussi des cellules productrices d'IL-17 dans notre modèle afin de définir si elles représentent effectivement une population de type Th17 pathogénique. A côté de ces cellules T conventionnelles, la présence des cellules NKT productrices d'IL-17 (NKT17) suggère à nouveau le rôle très important de cette sous-population dans l'apparition de la pathologie pulmonaire (Pichavant *et al.*, 2014) qui pourrait également être impliquée au niveau intestinal.

Dans notre modèle, nous avons pu constater que les souris IL-10^{-/-} présentaient un déclin spontané de la fonction pulmonaire. Cependant une augmentation de la résistance des voies aériennes a été observée après exposition à la fumée de cigarette des souris IL-10^{-/-} ainsi qu'une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires telle que l'IL-1 β . Le déclin de la fonction respiratoire est associé à une augmentation de l'expression de la métalloprotéase matricielle MMP-12 qui peut être produite par les macrophages en réponse à l'IL-17 (Shan *et al.*, 2009). De plus, l'IL-10 est capable de réduire *in vivo* l'expression de MMP-9, une autre métalloprotéase matricielle, et d'induire celle de TIMP-1, une molécule présentant une action anti-protéasique (Lim *et al.*, 2000). En effet, des études par zymographie sur des surnageants de cellules épithéliales pulmonaires montrent, *in vitro*, une réduction de l'expression de métalloprotéases matricielles en réponse à la fumée de cigarette lorsque l'on réalise un pré-traitement de ces cellules avec de l'IL-10 recombinant (données non montrées). Le déficit en IL-10 induirait donc un déséquilibre combiné entre protéases et anti-protéases qui serait responsable de l'altération de la fonction pulmonaire.

Au niveau intestinal, les souris déficientes en IL-10 sont caractérisées par le développement spontané d'entérocrites chroniques assimilables à la maladie de Crohn humaine comme nous pouvons le constater dans nos souris contrôles. Cet état pathologique est notamment expliqué par une perte de contrôle des réponses immunitaires et de l'état de tolérance envers les bactéries commensales colonisant le côlon (Kühn *et al.*, 1993). L'exposition à la fumée de cigarette accélère le processus pathologique induisant prolapsus, perte de poids importante, réduction de la taille du côlon et aggravation du remodelage intestinal. De plus, en relation avec les observations faites dans le poumon, l'inflammation intestinale résultant de l'exposition à la fumée de cigarette entraîne l'induction de gènes impliqués dans la réponse Th1/Th17 tels que l'IFN- γ et l'IL-17.

Ces données confortent l'hypothèse de la balance IL-10/ IL-17 dans le développement de la pathologie associée à l'exposition à la cigarette mais suggère également un lien entre pathologies pulmonaires et intestinales.

E. Interaction entre compartiments pulmonaire et intestinal

La BPCO et les MICI sont des pathologies chroniques caractérisées par des cycles réguliers d'inflammation, de destruction et de remodelage tissulaire qui vont progressivement aggraver les symptômes. Le parallélisme observé entre ces deux types de pathologies peut s'expliquer par des structures et des physiologies proches entre les compartiments tissulaires

correspondants. En effet, le poumon et l'intestin sont des organes ayant une interaction directe avec l'environnement. Cela implique la présence d'une lumière délimitée par une barrière épithéliale. Cette barrière épithéliale est constituée d'un épithélium recouvert d'une couche de mucus, limitant ainsi les interactions directes entre les micro-organismes (commensaux ou pathogènes) situés dans la lumière et les cellules constituant la muqueuse. Dans la muqueuse, un réseau complexe de cellules de l'immunité innée et adaptative permet de réguler la réponse immunitaire.

En plus de ces similarités, d'autres communautés ont pu être observées entre ces deux types de pathologies, en particulier, concernant les manifestations dans des organes secondaires.

Dans le cadre de la BPCO, il a notamment été montré que chez certains patients, la pathologie est associée à une augmentation de la perméabilité intestinale qui pourrait être à l'origine des manifestations intestinales observées chez les patients BPCO (Rutten *et al.*, 2014). D'un autre côté, une inflammation pulmonaire est souvent observée chez les patients atteints de MICI (Black *et al.*, 2007). De manière intéressante, Ekbohm et ses collaborateurs (Ekbohm *et al.*, 2008) ont montré que le risque de développer une maladie de Crohn chez des patients BPCO était 2,72 fois supérieur à ce même risque chez des sujets sains soulignant une possible interaction entre les deux pathologies et donc entre les deux compartiments où elles se développent.

Plusieurs paramètres pourraient suggérer cette interaction. Tout d'abord, le développement de la BPCO et des MICI vont présenter des facteurs de risque communs tels que l'exposition à la fumée de cigarette ou certains polymorphismes génétiques. De plus, ces pathologies sont caractérisées par un dysfonctionnement de la barrière épithéliale exposant ainsi le système immunitaire mucosal aux antigènes et aux micro-organismes présents dans la lumière de la muqueuse. Cette exposition entraîne une inflammation chronique caractéristique des pathologies étudiées. Des atteintes systémiques ont été associées à ces pathologies suggérant également une circulation de médiateurs et/ou de cellules immunitaires entre ces différents compartiments.

Il a également été observé une modification des microbiotes au cours de ces pathologies. Bien que le rôle de la modification du microbiote pulmonaire au cours de la BPCO (Huang *et al.*, 2010) n'ait pas encore été bien établi, la modification du microbiote intestinal quant à elle, a été associée au développement des MICI (Sartor RB., 2006).

Malgré ces différents liens entre les deux pathologies, aucune interaction n'a été démontrée entre ces deux organes dans ce cadre physiopathologique. Cependant, l'aspect multifactoriel de ces différentes maladies laisse à penser que l'interaction entre les deux organes implique différents mécanismes.

Un des mécanismes impliqués pourrait être l'excès de production de protéases au cours de ces pathologies. En effet, une augmentation de l'expression de métallo-protéases matricielles a pu être associée à la fois à la BPCO (Vlahos *et al.*, 2006) et aux MICI (Pender *et al.*, 2006) pouvant conduire à un processus de remodelage complètement incontrôlé.

D'autre part, la BPCO et les MICI sont des pathologies qui impliquent, à terme, une inflammation systémique (Barnes *et al.*, 2009 ; Levine *et al.*, 1995). Certains médiateurs pro-inflammatoires communs, comme l'IL-6, ont été retrouvés au niveau systémique dans la BPCO et dans les MICI (Ruwanpura *et al.*, 2011 ; Eastaff-Leung *et al.*, 2010). L'IL-6, conjointement au

TGF- β , participe à la polarisation Th17 (Bettelli *et al.*, 2006) et l'augmentation systémique de l'IL-6 pourrait conduire au développement de réponses de type Th17 dans des organes non affectés au départ. Au cours de l'inflammation, le tissu lymphoïde associé aux bronches régule le trafic des cellules lymphocytaires du poumon à la circulation systémique (Holt PG., 1993) et cette même caractéristique est observée au niveau intestinal. Une fois éduqués, les lymphocytes pulmonaires et intestinaux migrent dans d'autres muqueuses comme appartenant à un seul et même système immunitaire mucosal (Rothfuss *et al.*, 2006). De manière intéressante, une augmentation de ces cellules Th17 circulantes a été observée dans le sang des patients souffrant de BPCO ou de MICI (Vargas-Rojas *et al.*, 2011 ; Eastaff-Leung *et al.*, 2010). Ce trafic de cellules productrices de l'IL-17 pourrait secondairement être responsable des manifestations observées à distance des organes touchés par les différentes pathologies. Cette capacité pourrait notamment être liée à un défaut dans les signaux permettant aux lymphocytes de rester / retourner dans leur organe d'origine (« homing »), ce qui est normalement la règle dans le système immunitaire. D'autres cellules, telles que les cellules dendritiques, semblent également être affectées par un défaut dans le signal de « homing ». Ce défaut conduirait notamment à l'accumulation de ces cellules incapables de migrer alors dans les organes lymphatiques secondaires à la fois dans la BPCO et dans les MICI (Lommatzsch *et al.*, 2010 ; Verschuere *et al.*, 2011), ce qui favoriserait une (ré-) activation des lymphocytes au sein des muqueuses.

Enfin, du fait de son importance dans le développement et le maintien de l'homéostasie du système immunitaire, le microbiome pourrait constituer un lien intéressant entre la BPCO et les MICI. En effet, les personnes souffrant de BPCO présentent une dysbiose pulmonaire pouvant notamment être expliquée par une exposition chronique à la fumée de cigarette (Erb-Downward *et al.*, 2011). Il a notamment été montré que l'exposition à la fumée de cigarette entraînait une diminution de la capacité des macrophages à phagocyter et à détruire les pathogènes pouvant donc conduire à un déséquilibre du microbiote pulmonaire (King *et al.*, 1988). Certains composants du microbiote intestinal ont la capacité de faire partie du microbiote pulmonaire parmi lesquelles se trouvent des bactéries Gram- (telles que *Klebsiella*, *Enterobacter*, and *Pseudomonas*) qui ne sont pas ou faiblement affectées par la fumée de cigarette (Soler *et al.*, 1998 ; Ertel *et al.*, 1991). Cette résistance pourrait donc conduire à un déséquilibre du microbiome en réponse à la fumée de cigarette dont les conséquences pourraient être observées à la fois au niveau pulmonaire et intestinal. Cependant, le rôle du microbiote pulmonaire est encore totalement ignoré contrairement à celui du microbiote digestif. Il est important de noter que les traitements utilisés pour modifier ce microbiote digestif peuvent également affecter le compartiment pulmonaire (antibiothérapie ou transfert de microbiote).

F. Contrôle de la réponse IL-17 et implication du microbiome dans le développement de la BPCO et des MICI.

Dans notre modèle, nous observons une réponse IL-17 dans les cellules NKT et dans les cellules T CD4⁺, exacerbée chez les souris IL-10^{-/-} exposées à la fumée de cigarette. Cependant, les

mécanismes entraînant cette réponse IL-17 ne sont pas bien identifiés même si cette production est souvent dépendante d'une stimulation microbienne. L'IL-17, mais aussi l'IL-22, produits par les lymphocytes intestinaux (Cash *et al.*, 2006) ont la propriété d'induire la production de peptides anti-microbiens par les cellules épithéliales et les cellules de Paneth. Ainsi, la production d'IL-17, dans l'intestin peut être associée à la présence de certaines bactéries comme les bactéries filamenteuses segmentées (SFB) (Ivanov *et al.*, 2009). De manière intéressante, l'exposition à la fumée de cigarette chez les souris induit l'expression de RegIII β . Ce peptide antimicrobien exerce son rôle contre les bactéries Gram+ (Cash *et al.*, 2006). La production à l'homéostasie de ces peptides antimicrobiens par les cellules épithéliales intestinales est une conséquence, plus particulièrement, du contact étroit de ces cellules avec une communauté microbienne dense et hautement diversifiée. Parmi ces peptides, nous pouvons retrouver des β -défensines, des lectines de type C (telles RegIII β et RegIII γ), des ribonucléases (telle que l'angiopoïétine 4) ou encore des protéines de la famille S100 (MacPherson *et al.*, 2004). Bien que certaines de ces molécules s'expriment à l'homéostasie, d'autres, telle que le RegIII γ , sont induites suite à une stimulation bactérienne infectieuse (Cash *et al.*, 2006) via les TLRs ou NLRs (Nod-Like Receptor) ou de manière indépendante de ces récepteurs en utilisant, par exemple, des molécules d'acides gras à chaîne courte (Franchi *et al.*, 2012 ; Schaubert *et al.*, 2003). La production de peptides antimicrobiens par les cellules épithéliales est un mécanisme de défense important dans la maintenance de la barrière épithéliale et va notamment permettre de protéger les cellules souches présentes au fond des cryptes intestinales.

Étant donné, le rôle clé que joue le peptide antimicrobien RegIII β induit par l'IL-17 dans la neutralisation des bactéries Gram+, nous avons supposé que la sévérité de la maladie observée chez les souris IL-10^{-/-} exposées à la fumée de cigarette pourrait être corrélée avec une augmentation du nombre de bactéries Gram- au niveau intestinal.

L'analyse en PCR des ARN 16S a révélé que les souris IL-10^{-/-} présentaient en base une plus forte abondance d'*E. Coli* et une diminution des bactéries de la famille des *Lactobacillaceae* en comparaison des souris WT, ce résultat concorde avec les données de la littérature (Maharshak *et al.*, 2013) indiquant que le déficit en IL-10 induit une dysbiose intestinale. L'exposition à la fumée de cigarette entraîne une diminution du nombre de *E. Coli* (*Enterobacteriaceae*). Cette donnée est à mettre en parallèle avec le fait que dans notre modèle, le déficit en IL-10 aggravait les symptômes à la fois pulmonaires et intestinaux associés à l'exposition à la fumée de cigarette. Dans la littérature, les données imputent le développement de colites à la présence de ces *Enterobacteriaceae* (Garrett *et al.*, 2010). Ces résultats nous indiquent donc que l'aggravation des signes pathologiques observée en réponse à la fumée de cigarette chez des souris IL-10^{-/-} ferait intervenir un autre mécanisme. Chez ces mêmes souris, nous avons pu observer une augmentation du nombre de bactéries appartenant à la famille des *Clostridiales*. L'implication de certaines souches de bactéries appartenant à cette famille, telles que les SFB, dans la différenciation Th17 (Ivanov *et al.*, 2009) pourrait alors expliquer l'exacerbation de la réponse Th17 chez les souris IL-10^{-/-} exposées à la fumée de cigarette. De même certains lactobacilles (*L. Johnsooni*) sont également capables de promouvoir cette réponse Th17 (Viaud *et al.*, 2013).

Cependant, des analyses effectuées par séquençage haut débit ne montrent pas de modulation de la famille des *Enterobacteriaceae* et, en terme de phyla, les *Proteobacteria* sont en pourcentage plus faible chez les souris IL10^{-/-} que chez les souris WT. De plus, l'exposition à la fumée de cigarette montre une légère augmentation de ce phyla mais la différence reste néanmoins non significative. Ce qui appuie l'hypothèse que les *Enterobacteriaceae* ne sont pas impliquées dans les signes pathologiques que nous avons pu observer chez les souris IL10^{-/-}.

D'un autre côté, nous avons pu observer une augmentation de la famille des *Gracilibacteraceae* (appartenant au phylum des *Firmicutes*) en réponse à la fumée de cigarette chez les souris WT. Cette tendance semble se reproduire chez les souris IL10^{-/-} mais dans une moindre proportion. De même, l'exposition à la fumée de cigarette induit également une augmentation dans la famille des *Deferribacteraceae* qui est plus fortement marquée chez les souris IL10^{-/-}. Sur le même schéma, nous observons une légère augmentation, chez les souris IL10^{-/-} exposées à la fumée de cigarette, des bactéries de la famille des *Desulfovibrionaceae* (appartenant au phylum des *Firmicutes*).

Cependant, il n'existe aucune information dans la littérature concernant le rôle de ces trois types de bactéries.

Les résultats obtenus en qPCR et en séquençage haut débit ne sont pas concordants et nécessitent une validation afin de contrôler la qualité des résultats obtenus, ce que nous n'avons pas pu réaliser pour le moment. De plus, d'autres échantillons sont actuellement en cours d'analyse et les résultats nous permettront alors de conforter l'analyse statistique et ainsi de valider ou non les résultats obtenus dans la première analyse.

Sur la base des résultats actuellement en notre possession, nous pouvons cependant émettre des hypothèses quant aux mécanismes possiblement mis en jeu dans la pathologie observée.

Dans un premier temps, nous pourrions évoquer le fait que le microbiote intestinal n'ait qu'une influence mineure sur les signes pathologiques observés dans notre modèle. De manière à répondre à cette hypothèse, nous expérimentons actuellement un modèle de transfert de flore impliquant des souris WT et IL10^{-/-} exposées à la fumée de cigarette ou non en tant que donneuses et des souris WT « Germ Free » en tant que receveuses. Dans le cas où le développement de la pathologie implique effectivement le microbiote intestinal, nous devrions être capables d'observer une inflammation et les signes pathologiques chez les souris recevant le microbiote des souris exposées à la fumée de cigarette avec une exacerbation des symptômes chez celles recevant le microbiote des souris IL10^{-/-}.

Nous avons souligné le rôle des bactéries filamenteuses segmentées (SFB) dans l'induction de la polarisation Th17. Or, les analyses en séquençage haut débit n'ont pas permis de détecter de modulation dans ce groupe de bactéries tout comme l'avaient montré Wang et ses collaborateurs (Wang *et al.*, 2012). Cependant, l'augmentation d'autres familles telles que les *Deferribacteraceae*, les *Gracilibacteraceae* et les *Desulfovibrionaceae* pourrait nous pousser à envisager une action d'autres types de bactéries dans la polarisation Th17. Le transfert spécifique de ces bactéries (sous réserve de la faisabilité de ce type d'expériences) dans des souris « Germ Free » pourrait nous permettre de vérifier cette hypothèse.

De plus, il ne faut pas négliger la possibilité d'une translocation spécifique de certaines bactéries, en réponse à la fumée de cigarette, vers les ganglions comme a pu le montrer Viaud

et ses collaborateurs (Viaud *et al.*, 2013). Les analyses actuellement en cours en séquençage haut débit incluent des échantillons de ganglions lymphatiques mésentériques et les résultats nous permettront d'explorer cette piste. Des expériences de transfert de ces bactéries à des souris « Germ Free » pourront être envisagées en fonction de ces dernières données.

De manière à mieux comprendre le rôle du microbiote dans l'inflammation induite par la fumée de cigarette, nous avons mis en place un protocole utilisant de la vancomycine ou de la colimycine afin de dépléter le microbiome en bactéries Gram+ ou Gram- respectivement. L'utilisation de la colimycine chez les souris fumeuses ne montre aucun effet dans la modulation de la fonction pulmonaire en comparaison aux souris non traitées et exposées à la fumée de cigarette. Ces résultats suggèrent que les bactéries Gram- n'ont pas de rôle dans le développement de la pathologie pulmonaire. De manière intéressante, le traitement à la vancomycine va, quant à lui, empêcher le déclin de la fonction pulmonaire en réponse à la fumée de cigarette suggérant ainsi un rôle des bactéries Gram+ dans le développement de la pathologie. Cette déplétion en bactéries Gram+ entraîne une diminution de la réponse IL-17 et IFN- γ . Cette diminution est associée à une réduction de la production d'IL-1 β chez les souris exposées à la fumée de cigarette et traitées avec la vancomycine. De plus, ce traitement antibiotique va réduire la production d'IFN- γ et d'IL-17 par les cellules NKT pulmonaires alors que cette production n'est pas modulée dans les lymphocytes T. Cette observation suggère que l'IL-17 et l'IFN- γ produits par les cellules NKT, sont majoritairement responsables de l'altération de la fonction pulmonaire comme nous l'avons défini dans notre premier modèle de BPCO (Pichavant *et al.*, 2014). Après traitement à la vancomycine, la réduction de l'expression de l'IL-17, de l'IFN- γ et de RegIII- β au niveau du tractus gastro-intestinal est associée à une diminution de la perte de poids chez les souris fumeuses en comparaison avec les souris non traitées. Il est vraisemblable que ce résultat soit associé à une diminution de l'inflammation dans la muqueuse intestinale, ce qui devrait cependant être vérifié dans l'avenir. La diminution des réponses inflammatoires associées à l'IL-17 coïncide avec une réduction des bactéries Gram+ appartenant au genre des *Clostridiales* observé en qPCR. Parmi ces bactéries, nous pouvons retrouver les bactéries SFB qui sont impliquées dans l'initiation de la réponse Th17 (Ivanov *et al.*, 2009). Sous l'effet de la vancomycine, toujours en qPCR, les bactéries Gram- et notamment celles de la famille des entérobactéries (telles que *E. Coli*) se trouvent donc augmentées. Cependant, contrairement aux données trouvées la littérature (Garrett *et al.*, 2010), ces entérobactéries ne semblent pas induire d'inflammation ni de signes pathologiques dans notre modèle. Elles pourraient à l'opposé participer à l'induction de l'IL-10 (Jefford *et al.*, 2003) et ainsi contrôler la réponse IL-17. Les données obtenues en séquençage haut débit montrent que le traitement à la vancomycine, qui déplète spécifiquement les bactéries Gram+, entraîne une déplétion des bactéries du phylum *Bacteroidetes* comme escompté, par contre, l'effet sur les bactéries du phylum *Firmicutes* reste mitigé. En effet, bien que les *Firmicutes* non identifiés présentent une sensibilité à la vancomycine, d'autres familles appartenant à ce phylum ne semblent pas touchées par le traitement. Parmi celles-ci, les *Gracilibacteraceae* sont augmentées par le traitement à la vancomycine avec un effet plus faible chez les souris exposées à la fumée de cigarette et ce même schéma est observé chez les *Clostridiaceae*.

De manière intéressante, la famille des *Lactobacillaceae*, qui regroupe des bactéries Gram+, ne semble pas être diminuée par le traitement à la vancomycine. Cette observation peut notamment être expliquée par le fait qu'un grand nombre de souches de *Lactobacillus* soient résistantes à la vancomycine (Hamilton-Miller *et al.*, 1998). Les données de séquençage haut débit montrent également que la vancomycine induit une augmentation des *Lactobacillaceae* et cette augmentation est plus importante chez les souris exposées à la fumée de cigarette. Ces résultats peuvent s'expliquer, comme nous l'avons précisé précédemment, par une résistance de cette famille à la vancomycine (Hamilton-Miller *et al.*, 1998). L'augmentation de cette famille de bactéries dans ce contexte est intéressante de par le fait que certaines souches de *Lactobacillus* ont été identifiées comme pouvant induire la production d'IL-10 (Macho Fernandez *et al.*, 2011). La prolifération des *Lactobacillaceae* pourrait participer à la résolution de l'inflammation associée à une augmentation de la sécrétion d'IL-10 observée notamment dans le tissu pulmonaire et dans le sérum des souris (données non montrées).

En parallèle avec la diminution des bactéries Gram+, nous avons pu observer une augmentation de bactéries appartenant au phylum des *Proteobacteria* et plus particulièrement de la famille des *Desulfovibrionaceae*, ce qui invalide l'hypothèse que nous avons émise concernant son rôle délétère dans le développement de la pathologie. De plus, le traitement à la vancomycine induit une augmentation des bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae* qui est fortement amplifiée lorsque les souris sont exposées à la fumée de cigarette. Ces données suggèrent donc que, contrairement à la littérature (Garrett *et al.*, 2010), *E. Coli* ne serait pas directement impliquée dans le développement de la pathologie dans notre modèle, sous entendant que cette bactérie n'intervient pas dans la réponse IL-17 liée à la fumée de cigarette.

Nous allons également vérifier si le traitement à la vancomycine permet une translocation bactérienne spécifique (de type régulateur) vers les ganglions lymphatiques mésentériques limitant ainsi la réponse IL-17 au niveau intestinal. Les analyses prévues en séquençage haut débit sur ces tissus permettront d'éclaircir cette hypothèse.

Les données actuellement en notre possession sont parcellaire et en partie contradictoire. De ce fait, elles ne nous permettent pas d'énoncer une hypothèse formelle sur l'implication du microbiote dans la pathogénèse de la BPCO et du Crohn dans notre modèle d'exposition à la cigarette. Les analyses en cours de nouveaux échantillons de fécès ainsi que de ganglions lymphatiques mésentériques nous permettront de valider ou d'invalider certaines hypothèses énoncées précédemment. De plus, des expériences de transfert de microbiote chez des souris axéniques permettront de valider (ou non) l'impact de ce microbiote à la fois sur le compartiment digestif et respiratoire.

Les données en notre possession à ce jour nous permette toujours de supposer que la dysbiose, due à l'exposition à la fumée de cigarette associée à un défaut de la réponse IL-10, pourrait participer fortement au développement de pathologies pulmonaires (BPCO) et intestinales (maladie de Crohn). Ce nouveau concept permet de proposer des approches thérapeutiques afin de limiter les conséquences de l'exposition à la fumée de cigarette et de restaurer l'homéostasie entre le microbiote intestinal et la réponse immunitaire de la muqueuse.

G. Perspectives Thérapeutiques

L'ensemble de nos résultats soulignent bien le rôle clé de l'IL-10 dans le contrôle de la réponse immunitaire au cours de pathologies telles que la BPCO ou la maladie de Crohn. L'IL-10 représente donc une cible d'intérêt pour le développement de nouvelles thérapeutiques dans ce contexte.

La supplémentation en IL-10 pourrait être une thérapeutique envisagée à la fois dans le contrôle de la BPCO et dans celui de la maladie de Crohn. L'intérêt de l'utilisation de l'IL-10 recombinant tient au fait que celle-ci présente des effets immunorégulateurs mais également une capacité à inhiber les protéases et à induire l'expression d'inhibiteurs de protéases (Lim *et al.*, 2000). Cependant, bien que relativement bien toléré, ce traitement présente quand même des effets secondaires de type hématologique et ne fonctionnerait pas chez tous les patients atteints de Crohn chez qui les études sont principalement réalisées (Marlow *et al.*, 2013). D'autres voies pourraient être envisagées en stimulant la production locale de cette cytokine au travers d'inducteurs de cette cytokine ou de vecteur permettant de la délivrer au niveau des muqueuses.

Une première piste serait l'utilisation de souches probiotiques, et notamment celles capables d'induire ou de produire directement de l'IL-10. Les probiotiques sont caractérisés comme « tout micro-organisme vivant qui, lorsqu'il est administré en quantité adéquate, exerce un effet bénéfique sur la santé de l'hôte ».

Deux souches ont particulièrement retenu notre attention. La première, *Lactobacillus Salivarius*, a montré un potentiel anti-inflammatoire au travers de l'induction de l'IL-10 via l'interaction avec le récepteur NOD2 (Macho Fernandez *et al.*, 2011). La seconde, *Bifidobacterium breve*, a été identifiée au cours d'expériences préliminaires comme capable de produire directement de l'IL-10.

L'utilisation de telles souches pourrait permettre de limiter le développement des pathologies et notamment de la BPCO. De plus, l'utilisation de souches capables de produire une action anti-inflammatoire de manière indépendante de l'IL-10 serait intéressante, notamment chez des patients présentant un défaut d'expression pour cette cytokine. Il existe également des bactéries commensales ayant été génétiquement modifiées pour exprimer cette cytokine. Ces souches pourraient être testées dans un premier temps dans notre modèle murin.

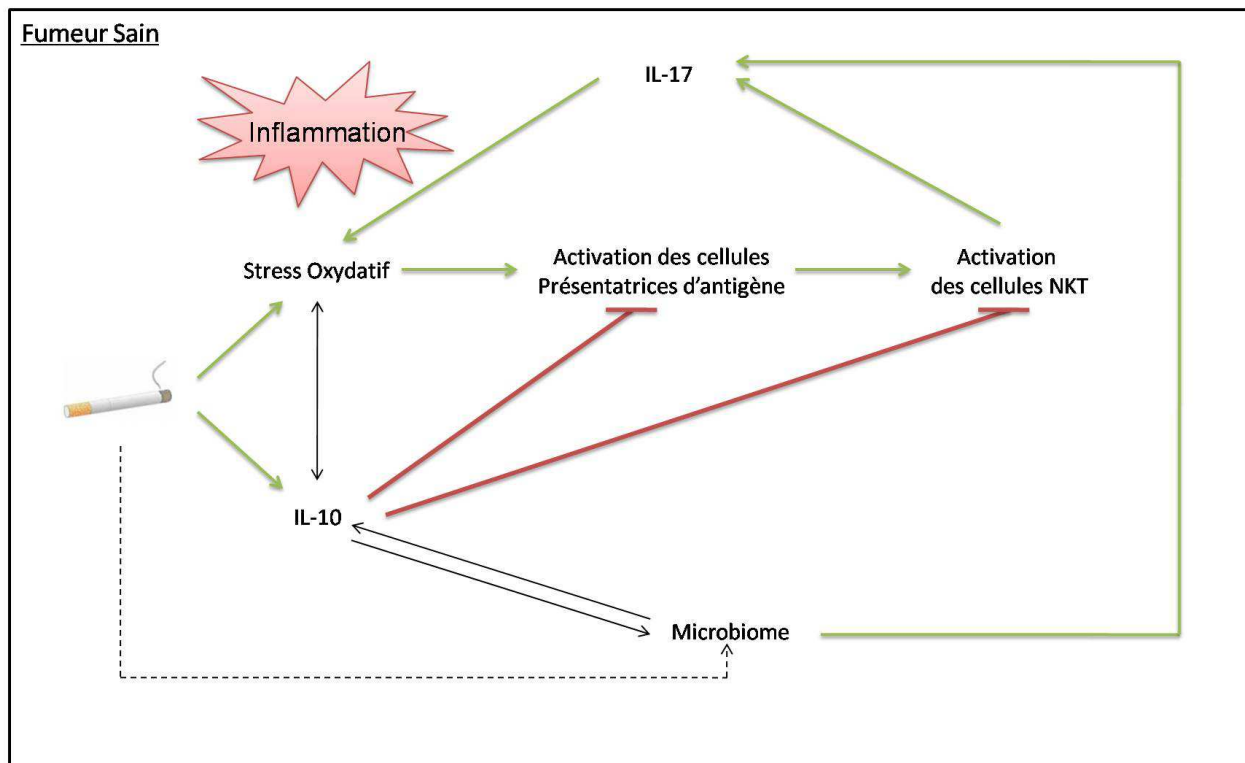
L'utilisation de prébiotiques (aliment favorisant le développement des probiotiques chez le receveur) est également envisageable, puisqu'il a été démontré que ce type de traitement permet de limiter l'inflammation dans différentes pathologies dont les MICI.

A l'opposé, les expériences de transfert de microbiote chez des souris axéniques permettront d'identifier les bactéries promouvant l'inflammation et les lésions à la fois sur le compartiment digestif et respiratoire. Cela sera envisagé après analyse des résultats du séquençage de haut débit, en sachant qu'il faut pour cela que ces bactéries d'intérêt soient cultivables.

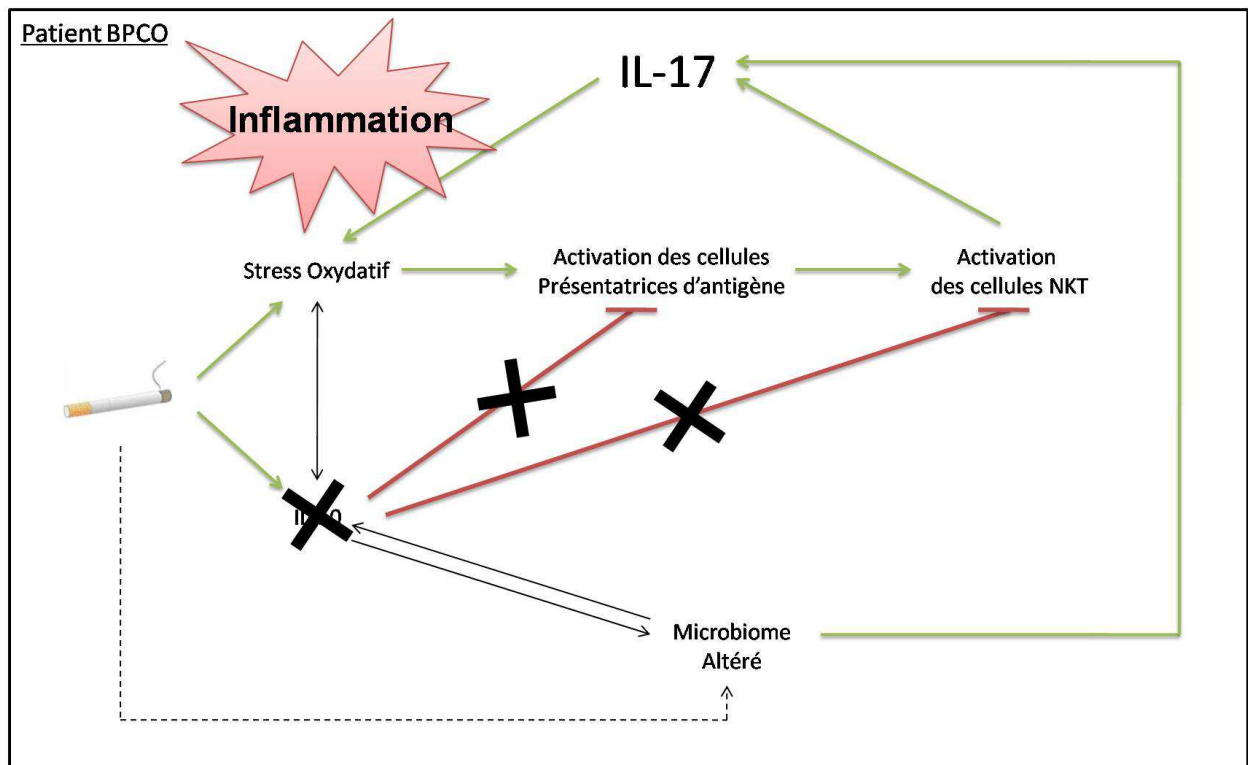
L'identification de bactéries protectrices tout comme celle de bactéries délétères permettront de cibler le plus efficacement possible les pathologies associées au tabagisme

H. Conclusion

En conclusion, l'exposition à la fumée de cigarette va, d'une part, induire un stress oxydatif entraînant alors une activation des cellules présentatrices d'antigène. Ces cellules vont ensuite activer les NKT par des mécanismes directs et indirects (incluant la reconnaissance directe de motifs glycolipidiques et l'action à distance de cytokines). Une fois activées, les NKT vont produire des quantités importantes d'IL-17 qui, *via* son action pléiotropique, va conduire au recrutement et à l'activation de nombreux types cellulaires ainsi qu'à la sécrétion de nombreuses molécules qui conduiront à l'entretien du stress oxydatif. D'autre part, l'exposition à la fumée de cigarette induit également l'expression d'IL-10 qui, de par son rôle immunorégulateur, va limiter l'activation cellulaire et créer un équilibre dans les mécanismes immunitaires. Cet IL-10 interagit également avec le microbiome afin de maintenir une certaine homéostasie immunitaire au niveau des muqueuses. Ainsi, cet équilibre entre l'IL-10, l'IL-17 et le microbiome permet vraisemblablement de limiter l'inflammation et de bloquer le développement de la pathologie tant au niveau respiratoire que digestif



Chez les patients BPCO, le développement de la pathologie a pu être corrélé avec un déficit dans l'expression de l'IL-10 et, dans certains cas, associé au développement de maladies intestinales telles que le Crohn. En effet, en réponse à la fumée de cigarette, un défaut d'expression de l'IL-10 va induire de plus fortes activations cellulaires et des productions d'IL-17 importantes conduisant à des signes pathologiques plus conséquents à la fois au niveau pulmonaire mais également au niveau intestinal. Ces altérations dans l'équilibre immunitaire sont associées à une altération du microbiome qui, n'étant plus sous le contrôle de l'IL-10, va participer activement à la production d'IL-17 et donc au développement des pathologies.



Les résultats obtenus au cours de ces travaux permettent d'envisager plusieurs pistes thérapeutiques, en particulier ciblant l'IL-10, l'IL-17 et le microbiome afin de résoudre l'inflammation chronique observée à la fois dans la BPCO et dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

A

- Aaron SD., Angel JB., Lunau M., Wright K., Fex C., Le Saux N., Dales RE. (2001) Granulocyte inflammatory markers and airway infection during acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 163:349–355.
- Abbas AK., Lichtman AH., Pober JS. (2000) Activation of T lymphocytes. Cellular and molecular immunology, Philadelphia PA, USA: Saunders : 161-180.
- Abreu MT. (2010) Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. Nat Rev Immunol. 10(2):131-44.
- Agarwal AR., Yin F., Cadenas E. (2014) Short-term cigarette smoke exposure leads to metabolic alterations in lung alveolar cells. Am J Respir Cell Mol Biol. DOI: 10.1165/rcmb.2013-0523OC.
- Aggarwal NR., King LS., D'Alessio FR. (2014) Diverse macrophage populations mediate acute lung inflammation and resolution. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 306(8):L709-25.
- Aggarwal S., Xie MH., Maruoka M., Foster J., Gurney AL. (2001) Acinar cells of the pancreas are a target of interleukin-22. J Interferon Cytokine Res. 21(12):1047-53.
- Agrawal S., Agrawal A., Doughty B., Gerwitz A., Blenis J., Van Dyke T., Pulendran B. (2003) Cutting edge: different Toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos. J Immunol. 171(10):4984-9.
- Agusti A., Morla M., Sauleda J., Saus C., Busquets X. (2004) NF-kappaB activation and iNOS upregulation in skeletal muscle of patients with COPD and low body weight. Thorax 59 : 483-487.
- Akbari O., Stock P., Meyer E., Kronenberg M., Sidobre S., Nakayama T., Taniguchi M., Grusby MJ., DeKruyff RH., Umetsu DT. (2003) Essential role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. Nat Med. 9(5):582-8.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2002) Molecular Biology of the Cell, 4th edition.
- Alcorn JF., Crowe CR., Kolls JK. (2010) TH17 cells in asthma and COPD. Annu Rev Physiol. 72:495-516.
- Anekboon K., Lursinsap C., Phimoltares S., Fucharoen S., Tongsimma S. (2014) Extracting predictive SNPs in Crohn's disease using a vacillating genetic algorithm and a neural classifier in case-control association studies. Comput Biol Med. 44:57-65.
- Annunziato F., Cosmi L., Santarlasci V., Maggi L., Liotta F., Mazzinghi B., Parente E., Fili L., Ferri S., Frosali F., Giudici F., Romagnani P., Parronchi P., Tonelli F., Maggi E., Romagnani S. (2007) Phenotypic and functional features of human Th17 cells. J Exp Med. 204:1849–61.
- Antunes MB., Cohen NA. (2007) Mucociliary clearance : a critical upper airway host defense mechanism and methods of assessment. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 7(1):5-10.
- Aoshiba K., Nagai A. (2003) Oxidative Stress, Cell Death, and Other Damage to Alveolar Epithelial Cells Induced by Cigarette Smoke. Tob. Induc. Dis. 1(3) : 219-226.
- Apetoh L., Quintana FJ., Pot C., Joller N., Xiao S., Kumar D., Burns EJ., Sherr DH., Weiner HL., Kuchroo VK. (2010) The aryl hydrocarbon receptor interacts with c-Maf to promote the differentiation of type 1 regulatory T cells induced by IL-27. Nat Immunol. 11(9):854-61.
- Arbex MA., de Souza Conceição GM., Cendon SP., Arbex FF., Lopes AC., Moysés EP., Santiago SL., Saldiva PH., Pereira LA., Braga AL. (2009) Urban air pollution and chronic obstructive pulmonary disease-related emergency department visits. J Epidemiol Community Health. 63(10):777-83.
- Arpaia N., Campbell C., Fan X., Dikly S., van der Veeken J., deRoos P., Liu H., Cross JR., Pfeffer K., Coffey PJ., Rudensky AY. (2013) Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. Nature 504 pp. 451–455.
- Asadullah K., Sterry W., Stephanek K., Jasulaitis D., Leupold M., Audring H., Volk HD., Döcke WD. (1998) IL-10 is a key cytokine in psoriasis. Proof of principle by IL-10 therapy: a new therapeutic approach. J Clin Invest. 101 pp. 783–794.

Atarashi K., Tanoue T., Shima T., Imaoka A., Kuwahara T., Momose Y., Cheng G., Yamasaki S., Saito T., Ohba Y., Taniguchi T., Takeda K., Hori S., Ivanov II., Umesaki Y., Itoh K., Honda K. (2011) Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. Science 331 pp. 337–341.

Awane M., Andres PG., Li DJ., Reinecker HC. (1999) NF-kappa B-inducing kinase is a common mediator of IL-17-, TNF-alpha-, and IL-1 beta-induced chemokine promoter activation in intestinal epithelial cells. J Immunol. 162(9):5337-44.

B

Bals R., Weiner DJ., Wilson JM. (1999) The innate immune system in cystic fibrosis lung disease. J Clin Invest. 103 : 303-7.

Balmes J., Becklake M., Blanc P., Environmental and Occupational Health Assembly, American Thoracic Society (2003) American Thoracic Society statement: occupational contribution to the burden of airway disease. Am J Respir Crit Care Med. 167 pp. 787–797.

Banchereau J., Briere F., Caux C., Davoust J., Lebecque S., Liu YJ., Pulendran B., Palucka K. (2000) Immunobiology of Dendritic Cells. Annual Review of Immunology Vol. 18: 767-811.

Banchereau J., Steinman RM. (1998) Dendritic cells and the control of immunity. Nature 392:245–52.

Barnes PJ. (2000) Mechanisms in COPD: differences from asthma. Chest 117:10S-4S.

Barnes PJ., Cosio MG. (2006) Cells and mediators of chronic obstructive pulmonary disease. Eur Respir Monogr. 38:130-158.

Barnes PJ., Celli BR. (2009) Systemic manifestations and comorbidities of COPD. Eur. Respir. J. 33, 1165–1185

Barnes PJ. (2009) The Cytokine network in chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Cell Mol Biol. 41 : 631-638.

Barthlott T., Moncrieffe H., Veldhoen M., Atkins CJ., Christensen J., O'Garra A., Stockinger B. (2005) CD25+ CD4+ T cells compete with naive CD4+ T cells for IL-2 and exploit it for the induction of IL-10 production. Int Immunol. 17(3):279-88.

Beck F., Guignard R., Richard JB., Wilquin JL., Peretti-Watel P. (2010) Premiers résultats du baromètre santé 2010 Evolutions récentes du tabagisme en France, INPES.

Becker C., Wirtz S., Blessing M., Pirhonen J., Strand D., Bechthold O., Frick J., Galle PR., Autenrieth I., Neurath MF. (2003) Constitutive p40 promoter activation and IL-23 production in the terminal ileum mediated by dendritic cells. J Clin Invest. 112: 693–706.

Belkaid Y., Hand TW. (2014) Role of the microbiota in immunity and inflammation. Cell. 157(1):121-41.

Benson AK., Kelly SA., Legge R., Ma F., Low SJ., Kim J., Zhang M., Oh PL., Nehrenberg D., Hua K., Kachman SD., Moriyama EN., Walter J., Peterson DA., Pomp D. (2010) Individuality in gut microbiome composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107, 18933–18938.

Berg DJ., Zhang J., Weinstock JV., Ismail HF., Earle KA., Alila H., Pamukcu R., Moore S., Lynch RG. (2002) Rapid development of colitis in NSAID-treated IL-10-deficient mice. Gastroenterology 123: 1527–1542.

Bergofsky EH. (1991) The lung mucosa: a critical environmental battleground. Am J Med. 91(4A):4S-10S.

Bettelli E., Carrier Y., Gao W., Korn T., Strom TB., Oukka M., Weiner HL., Kuchroo VK. (2006) Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. Nature 441:235–8.

Bhowmik A., Seemungal TA., Sapsford RJ., Wedzicha JA. (2000) Relation of sputum inflammatory markers to symptoms and lung function changes in COPD exacerbations. Thorax 55:114–120.

Bi Y., Yang R. (2012) Direct and Indirect Regulatory Mechanisms in TH17 cell Differentiation and Functions Scandinavian Journal of Immunology Vol. 75, Issue 6, p543–552.

Bishop C., Hudson VM., Hilton SC., Wild C. (2005) A pilot study of the effect of inhaled buffered glutathione on the clinical status of patients with cystic fibrosis. Chest 127:308–317.

- Black H., Mendoza M., Murin S. (2007) Thoracic manifestations of inflammatory bowel disease. Chest 131, 524–532.
- Bonfield TL., Konstan MW., Burfeind P., Panuska JR., Hilliard JB., Berger M. (1995) Normal bronchial epithelial cells constitutively produce the anti-inflammatory cytokine interleukin-10, which is downregulated in cystic fibrosis. Am J Respir Cell Mol Biol. 13(3):257-61.
- Boonstra A., Rajsbaum R., Holman M., Marques R., Asselin-Paturel C., Pereira JP., Bates EE., Akira S., Vieira P., Liu YJ., Trinchieri G., O'Garra A. (2006) Macrophages and myeloid dendritic cells, but not plasmacytoid dendritic cells, produce IL-10 in response to MyD88- and TRIF-dependent TLR signals, and TLR-independent signals. J Immunol. 177(11):7551-8.
- Bouabe H., Liu Y., Moser M., Bösl MR., Heesemann J. (2011) Novel highly sensitive IL-10-beta-lactamase reporter mouse reveals cells of the innate immune system as a substantial source of IL-10 in vivo. J Immunol. 187(6):3165-76.
- Bowler RP., Nicks M., Tran K., Tanner G., Chang LY., Young SK., Worthen GS. (2004) Extracellular superoxide dismutase attenuates lipopolysaccharide-induced neutrophilic inflammation. Am J Respir Cell Mol Biol. 31(4):432-9.
- Bozinovski S., Hutchinson A., Thompson M., Macgregor L., Black J., Giannakis E., Karlsson AS., Silvestrini R., Smallwood D., Vlahos R., Irving LB., Anderson GP. (2008) Serum amyloid is a biomarker of acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med. 177 : 269-278.
- Brant SR., Panhuysen CIM., Nicolae D., Reddy DM., Bonen DK., Karaliukas R., Zhang L., Swanson E., Datta LW., Moran T., Ravenhill G., Duerr RH., Achkar JP., Karban AS., Cho JH. (2003) MDR1 Ala893 polymorphism is associated with inflammatory bowel disease. Am J Hum Genet. 73: 1282–1292.
- Braat H., Peppelenbosch MP., Hommes DW. (2003) Interleukin-10-based therapy for inflammatory bowel disease. Expert. Opin. Biol. Ther. 3:725–31.
- Brigl M., Tatituri RV., Watts GF., Bhowruth V., Leadbetter EA., Barton N., Cohen NR., Hsu FF., Besra GS., Brenner MB. (2011) Innate and cytokine-driven signals, rather than microbial antigens, dominate in natural killer T cell activation during microbial infection. J Exp Med. 208(6):1163-77.
- Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S., Weinrauch Y., Zychlinsky A. (2004) Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. Science (AAAS) 303 (5663): 1532–1535.
- Bronietzki M., Kasmapour B., Gutierrez MG. (2014) Study of phagolysosome biogenesis in live macrophages. J Vis Exp. (85).
- Brooks DG., Trifilo MJ., Edelman KH., Teyton L., McGavern DB., Oldstone MB. (2006) Interleukin-10 determines viral clearance or persistence *in vivo*. Nature Med. 12, 1301–1309.
- Brown V., Elborn JS., Bradley J., Ennis M. (2009) Dysregulated apoptosis and NFkappaB expression in COPD subjects. Respir Res. 10:24.
- Brusselle GG., Demoor T., Bracke KR., Brandsma CA., Timens W. (2009) Lymphoid follicles in (very) severe COPD: beneficial or harmful? Eur Respir J. 34 : 219-230.
- Brusselle GG., Joos GF., Bracke KR. (2011) New insights into the immunology of COPD. The Lancet 378(9795):1015-26.
- Buchwald UK., Geerdes-Fenge HF., Vöckler J., Ziege S., Lode H. (1999) Interleukin-10: effects on phagocytosis and adhesion molecule expression of granulocytes and monocytes in a comparison with prednisolone. Eur J Med Res. 4 pp. 85–94.
- Burdin N., Brossay L., Koezuka Y., Smiley ST., Grusby MJ., Gui M., Taniguchi M., Hayakawa K., Kronenberg M. (1998) Selective ability of mouse CD1 to present glycolipids: alpha-galactosylceramide specifically stimulates V alpha 14+ NK T lymphocytes. J Immunol. 161(7):3271-81.
- Burdin N., Rousset F., Banchereau J. (1997) B-cell-derived IL-10: production and function. Methods, 11 pp. 98–111.

C

- Calabrese F., Giacometti C., Beghe B., Rea F., Loy M., Zuin R., Marulli G., Baraldo S., Saetta M., Valente M. (2005) Marked alveolar apoptosis/proliferation imbalance in end-stage emphysema. Respir Res 6:14-14.

- Cargill M., Schrodi SJ., Chang M., Garcia VE., Brandon R., Callis KP., Matsunami N., Ardlie KG., Civello D., Catanese JJ., Leong DU., Panko JM., McAllister LB., Hansen CB., Papenfuss J., Prescott SM., White TJ., Leppert MF., Krueger GG., Begovich AB. (2007) A large-scale genetic association study confirms IL12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes. Am J Hum Genet 80:273–90.
- Cario E. (2005) Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa : Toll-like receptors and NOD2. Gut. 54:1182-1193.
- Carow B., Rottenberg ME. (2014) SOCS3, a Major Regulator of Infection and Inflammation. Front Immunol. 5:58.
- Carson WE., Lindemann MJ., Baiocchi R., Linett M., Tan JC., Chou CC., Narula S., Caligiuri MA. (1995) The functional characterization of interleukin-10 receptor expression on human natural killer cells. Blood, 85 pp. 3577–3585.
- Cash HL., Whitham CV., Behrendt CL., Hooper LV. (2006) Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. Science 313:1126–1130.
- Caux C., Vanbervliet B., Massacrier C., Ait-Yahia S., Vaure C., Chemin K., Dieu-Nosjean MC., Vicari A. (2002) Regulation of dendritic cell recruitment by chemokines. Transplantation Vol. 73(1) Supplement, pp S7-S11.
- CEP : Collège des enseignants en pneumologie (2013) Item 73 (ex item 45) : Addiction au tabac
- Chang EY., Guo B., Doyle SE., Cheng G. (2007) Cutting edge: involvement of the type I IFN production and signaling pathway in lipopolysaccharide-induced IL-10 production. J. Immunol. 178, 6705–6709.
- Chang HD., Helbig C., Tykocinski L., Kreher S., Koeck J., Niesner U., Radbruch A. (2007) Expression of IL-10 in Th memory lymphocytes is conditional on IL-12 or IL-4, unless the IL-10 gene is imprinted by GATA-3. Eur J Immunol. 37(3):807-17.
- Chaouat A., Naeije R., Weitzenblum E. (2008) Pulmonary hypertension in COPD. Eur Respir J 32 : 1371-1385.
- Cheng SL., Yu CJ., Chen CJ., Yang PC. (2004) Genetic polymorphism of epoxide hydrolase and Glutathione S-Transferase. Eur. Respir. J. 23 (6) : 818 – 824.
- Cho I., Blaser MJ., (2012) The human microbiome: at the interface of health and disease. Nature Reviews Genetics 13, 260-270.
- Chung EY., Liu J., Homma Y., Zhang Y., Brendolan A., Saggese M., Han J., Silverstein R., Sella L., Ma X. (2007) Interleukin-10 expression in macrophages during phagocytosis of apoptotic cells is mediated by homeodomain proteins Pbx1 and Prep-1. Immunity. 27(6):952-64.
- Church DF., Pryor WA. (1985) Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. Environ Health Perspect. 64:111-26.
- Ciencewicz J., Trivedi S., Kleeberger SR. (2008) Oxidants and the pathogenesis of lung diseases. J. Allergy Clin. Immunol. 122(3) : 456-470.
- Clark R., Griffiths GM. (2003) Lytic granules, secretory lysosomes and disease. Current Opinion in Immunology. 15, 516–521.
- Cohen S., Burns RC. (2002) Pathways of the Pulp, 8th Edition. St. Louis: Mosby, Inc. page 465.
- Coomes JL., Siddiqui KR., Arancibia-Carcamo CV., Hall J., Sun CM., Belkaid Y., Powrie F. (2007) A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. J. Exp. Med. 204 pp. 1757–1764.
- Condon TV., Sawyer RT., Fenton MJ., Riches DWH. (2011) Lung dendritic cells at the innate-adaptive immune interface. Journal of Leukocyte Biology vol. 90 no. 5 883-895.
- Coquet JM., Chakravarti S., Smyth MJ., Godfrey DI. (2008) Cutting edge: IL-21 is not essential for Th17 differentiation or experimental autoimmune encephalomyelitis. J Immunol 180:7097–101.
- Cornes JS. (1965) Number, size, and distribution of Peyer's patches in the human small intestine: Part I The development of Peyer's patches. Gut 6(3):225–229.
- Cosio MG., Satta M., Agusti A. (2009) Immunologic Aspects of COPD. The New England Journal of Medicine 360(23):2445-54.
- Cox G. (1996) IL-10 enhances resolution of pulmonary inflammation in vivo by promoting apoptosis of neutrophils. Am J Physiol. 271(4 Pt 1):L566-71.

- Crawley JB., Williams LM., Mander T., Brennan FM., Foxwell BM. (1996) Interleukin-10 stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase and p70 S6 kinase is required for the proliferative but not the antiinflammatory effects of the cytokine. J Biol Chem. 271(27):16357-62.
- Cua DJ., Tato CM. (2010) Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. Nat. Rev. Immunol. 10: 479–489.
- Cui J., Shin T., Kawano T., Sato H., Kondo E., Toura I., Kaneko Y., Koseki H., Kanno M., Taniguchi M. (1997) Requirement for Valpha14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. Science 278(5343) :1623-6.
- Culpitt SV., Rogers DF., Shah P., De Matos C., Russell RE., Donnelly LE., Barnes PJ. (2003) Impaired inhibition by dexamethasone of cytokine release by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 167:24–31.
- Cunningham AC., Zhang JG., Moy JV., Ali S., Kirby JA. (1997) A comparison of the antigen-presenting capabilities of class II MHC-expressing human lung epithelial and endothelial cells. Immunology. 91(3):458-63.
- Cutler RG., Kelly J., Storie K., Pedersen WA., Tammara A., Hatanpaa K., Troncoso JC., Mattson MP. (2004) Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. Proc.Natl. Acad. Sci. 101: 2070-2075.

D

- D'Andrea A., Aste-Amezaga M., Valiante NM., Ma X., Kubin M., Trinchieri G. (1993) Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. J Exp Med. 178 pp. 1041–1048.
- D'Hulst AI., Maes T., Bracke KR., Demedts IK., Tournoy KG., Joos GG., Brusselle GG. (2005) Cigarette smoke-induced pulmonary emphysema in scid-mice. Is the acquired immune system required. Respir Res. 6, p. 147.
- Dalle-Donne I., Aldini G., Carini M., Colombo R., Rossi R., Milzani A. (2006) Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. J Cell Mol Med 10:389–406.
- Damsker JM., Hansen AM., Caspi RR. (2010) Th1 and Th17 cells: adversaries and collaborators. Ann N Y Acad Sci 1183:211–21.
- Dang EV., Barbi J., Yang HY., Jinasena D., Yu H., Zheng Y., Bordman Z., Fu J., Kim Y., Yen HR., Luo W., Zeller K., Shimoda L., Topalian SL., Semenza GL., Dang CV., Pardoll DM., Pan F. (2011) Control of T(H)17/T(reg) balance by hypoxia-inducible factor 1. Cell. 146(5):772-84.
- Darfeuille-Michaud A., Neut C., Barnich N., Lederman E., Di Martino P., Desreumaux P., Gambiez L., Joly B., Cortot A., Colombel JF. (1998) Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. Gastroenterology. 115(6):1405-13.
- David LA., Maurice CF., Carmody RN., Gootenberg DB., Button JE., Wolfe BE., Ling AV., Devlin AS., Varma Y., Fischbach MA., Biddinger SB, Dutton RJ., Turnbaugh PJ. (2013) Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. Nature. 505, 559–563.
- DeBruyne LA., Li K., Chan SY., Qin L., Bishop DK., Bromberg JS. (1998) Lipid-mediated gene transfer of viral IL-10 prolongs vascularized cardiac allograft survival by inhibiting donor-specific cellular and humoral immune responses. Gene Ther. 5 pp. 1079–1087.
- DeFranco A., Robertson M., Locksley R. (2009) Immunité - La réponse immunitaire dans les maladies infectieuses et inflammatoires. P70-73.
- De Heer HJ., Hammad H., Kool M., Lambrecht BN. (2005) Dendritic cell subsets and immune regulation in the lung. Semin Immunol. 17:295–303.
- Dekhuijzen PNR., van Beurden WJC. (2006) The role for N-acetylcysteine in the management of COPD. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis. 1(2): 99–106.
- DeKruyff RH., Bu X., Ballesteros A., Santiago C., Chim YLE., Lee HH., Karisola P., Pichavant M., Kaplan GG, Umetsu DT., Freeman GJ., Casanovas JM. (2010) T Cell/Transmembrane, Ig, and Mucin-3 Allelic Variants Differentially Recognize Phosphatidylserine and Mediate Phagocytosis of Apoptotic Cells. J Immunol. 184(4): 1918–1930.

- Del Prete G., De Carli M., Almerigogna F., Giudizi MG., Biagiotti R., Romagnani S. (1993) Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J Immunol*. 150 pp. 353–360.
- Demeo DL., Campbell EJ., Barker AF., Brantly ML., Eden E., McElvaney NG., Rennard SI., Sandhaus RA., Stocks JM., Stoller JK., Strange C., Turino G., Silverman EK. (2008) IL10 polymorphisms are associated with airflow obstruction in severe alpha1-antitrypsin deficiency. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 38(1):114-20.
- de Waal Malefyt R., Haanen J., Spits H., Roncarolo MG., te Velde A., Figdor C., Johnson K., Kastelein R., Yssel H., de Vries JE. (1991a) Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med*. 174 pp. 915–924.
- de Waal Malefyt R., Abrams J., Bennett B., Figdor CG., de Vries JE. (1991b) Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med*. 174(5):1209-20.
- Diamond G., Beckloff N., Weinberg A., Kisich KO. (2009) The roles of antimicrobial peptides in innate host defense. *Curr Pharm Des*. 15(21):2377-92.
- Dieu MC., Vanbervliet B., Vicari A., Bridon JM., Oldham E., Aït-Yahia S., Brière F., Zlotnik A., Lebecque S., Caux C. (1998) Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med*. 188(2):373-86.
- Ding Y., Chen D., Tarcsfalvi A., Su R., Qin L., Bromberg JS. (2003) Suppressor of Cytokine Signaling 1 Inhibits IL-10-Mediated Immune Responses. *The Journal of Immunology* vol. 170 no. 3 1383-1391.
- Donaldson GC., Seemungal TA., Patel IS., Bhowmik A., Wilkinson TM., Hurst JR., MacCallum PK., Wedzicha JA. (2005) Airway and systemic inflammation and decline in lung function in patients with COPD. *Chest* 128 : 1995-2004.
- Dong C. (2006) Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL-17-producing cells. *Nature Rev Immunol*. 6, 329 – 334.
- Donnelly RP., Dickensheets H., Finbloom DS. (1999) The interleukin-10 signal transduction pathway and regulation of gene expression in mononuclear phagocytes. *J Interferon Cytokine Res*. 19(6):563-73.
- Doreau A., Belot A., Bastid J., Riche B., Trescol-Biemont MC., Ranchin B., Fabien N., Cochat P., Pouteil-Noble C., Trolliet P., Durieu I., Tebib J., Kassai B., Ansieau S., Puisieux A., Eliaou JF., Bonnefoy-Bérard N. (2009) Interleukin 17 acts in synergy with B cell-activating factor to influence B cell biology and the pathophysiology of systemic lupus erythematosus. *Nat Immunol*. 10(7):778-85.
- Dougan SK., Kaser A., Blumberg RS. (2007) CD1 expression on antigen-presenting cells. *Curr Top Microbiol Immunol*. 314:113-41.
- Doz E., Noulin N., Boichot E., Guenon I., Fick L., Le Bert M., Lagente V., Ryffel B., Schnyder B., Quesniaux VF., Couillin I. (2008) Cigarette smoke-induced pulmonary inflammation is TLR4/MYD88 and IL-1R1/MYD88 signaling dependent. *J Immunol*. 180:1169–1178.
- Drost EM., Skwarski KM., Saulea J., Soler N., Roca J., Agusti A., MacNee W. (2005) Oxidative stress and airway inflammation in severe exacerbations of COPD. *Thorax* 60:293–300.
- Du C., Liu C., Kang J., Zhao G., Ye Z., Huang S., Li Z., Wu Z., Pei G. (2009) MicroRNA miR-326 regulates TH-17 differentiation and is associated with the pathogenesis of multiple sclerosis. *Nat Immunol*. 10(12):1252-9.
- Duan MC., Zhong XN., Huang Y., He ZY., Tang HJ. (2011) The expression and mechanisms of interleukin-17 in CD(8)(+) T cells of mice with cigarette smoke-induced emphysema. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*. 50(9):776-80.
- Duchmann R., Kaiser I., Hermann E., Mayet W., Ewe K., Meyer zum Büschenfelde KH. (1995) Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 102: 448–455.
- Duerkop BA, Vaishnava S, Hooper LV. (2009) Immune responses to the microbiota at the intestinal mucosal surface. *Immunity*. 31:368-376.
- Duerr RH., Taylor KD., Brant SR., Rioux JD., Silverberg MS., Daly MJ., Steinhart AH., Abraham C., Regueiro M., Griffiths A., Dassopoulos T., Bitton A., Yang H., Targan S., Datta LW., Kistner EO., Schumm LP., Lee AT.,

Gregersen PK., Barmada MM., Rotter JI., Nicolae DL., Cho JH. (2006) A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. Science, 314(5804):1461-3.

E

- Eastaff-Leung N., Mabarrack N., Barbour A., Cummins A., Barry S. (2010) Foxp3+ regulatory T cells, Th17 effector cells, and cytokine environment in inflammatory bowel disease. J. Clin. Immunol. 30, 80–89
- Edwards AD., Manickasingham SP., Spörri R., Diebold SS., Schulz O., Sher A., Kaisho T., Akira S., Reis e Sousa C (2002) Microbial recognition via Toll-like receptor-dependent and -independent pathways determines the cytokine response of murine dendritic cell subsets to CD40 triggering. J Immunol. 169(7):3652-60.
- Eisner MD., Balmes J., Katz PP., Trupin L., Yelin EH., Blanc PD. (2005) Lifetime environmental tobacco smoke exposure and the risk of chronic obstructive pulmonary disease. Environmental Health 4: 1-8.
- Ekbom A., Brandt L., Granath F., Lofdahl CG., Egesten A. (2008) Increased risk of both ulcerative colitis and Crohn's disease in a population suffering from COPD. Lung 186 : 167 – 172.
- Ennis FA., Meager A., Beare AS., Qi YH., Riley D., Schwarz G., Schild GC., Rook AH. (1981) Interferon induction and increased natural killer-cell activity in influenza infections in man. Lancet 2: 891–893.
- Erb-Downward JR., Thompson DL., Han MK., Freeman CM., McCloskey L., Schmidt LA., Young VB., Toews GB., Curtis JL., Sundaram B., Martinez FJ., Huffnagle GB. (2011) Analysis of the lung microbiome in the "healthy" smoker and in COPD. PLoS One 6(2):e16384.
- Eriksson S. (1965) Studies in α 1 antitrypsin deficiency. Acta Med Scand 177(suppl): 432.
- Ertel A., Eng R., Smith SM. (1991) The differential effect of cigarette smoke on the growth of bacteria found in humans. Chest 100, 628–630
- Esser C., Rannug A., Stockinger B. (2009) The aryl hydrocarbon receptor in immunity. Trends Immunol 30:447–54.
- Evans HG., Suddason T., Jackson I., Taams LS., Lord GM. (2007) Optimal induction of T helper 17 cells in humans requires T cell receptor ligation in the context of Toll-like receptor-activated monocytes. Proc Natl Acad Sci USA 104:17034–9.

F

- Fahey JW., Talalay P. (1999) Antioxidant functions of sulforaphane: a potent inducer of Phase II detoxication enzymes. Food Chem Toxicol. 1999;37:973–9.
- Feldman C., Anderson R., Kanthakumar K., Vargas A., Cole PJ., Wilson R. (1994) Oxidant-mediated ciliary dysfunction in human respiratory epithelium. Free Radic Biol Med. 17(1):1-10.
- Fillatreau S., Sweeney CH., McGeachy MJ., Gray D., Anderton SM. (2002) B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. Nature Immunol. 3, 944–950
- Finbloom DS., Winestock KD. (1995) IL-10 induces the tyrosine phosphorylation of tyk2 and Jak1 and the differential assembly of STAT1 alpha and STAT3 complexes in human T cells and monocytes. J Immunol. 155, pp. 1079–1090.
- Fiorentino DF., Zlotnik A., Mosmann TR., Howard M., O'Garra A. (1991) IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. J Immunol. 147 pp. 3815–3822.
- Fiorentino DF., Bond MW., Mosmann TR. (1989) Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. J Exp Med. 170(6):2081-95.
- Flo TH., Smith KD., Sato S., Rodriguez DJ., Holmes MA., Strong RK., Akira S., Aderem A. (2004) Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. Nature 432(7019):917-21.
- Foronjy R., Alison W., D'Aarmiento J. (2008) The pharmacokinetic limitations of antioxidant treatment of COPD. Pulm Pharmacol Ther 21(2):370–379.
- Fournier M., Tonnel AB., Housset B., Huchon G., Godart P., Vervloet D., Huas D., Durand-Zaleski I., Chanal I., Pribil C. (2005) Economic Burden of COPD : the SCOPE Study. Revue des maladies respiratoires 22 : 247 – 256.

- Fox BA., Sheppard PO., O'Hara PJ. (2009) The role of genomic data in the discovery, annotation and evolutionary interpretation of the interferon-lambda family. PLoS ONE 4:e4933.
- Franchi L., Kamada N., Nakamura Y., Burberry A., Kuffa P., Suzuki S., Shaw MH., Kim YG., Núñez G. (2012) NLR4-driven production of IL-1 β discriminates between pathogenic and commensal bacteria and promotes host intestinal defense. Nat Immunol. 13(5):449-56.
- Frank DN., St. Amand AL., Feldman RA., Boedeker EC., Harpaz N., Pace NR. (2007) Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. Proc Natl Acad Sci USA, 104, pp. 13780–13785.
- Franke A., Balschun T., Karlsen TH., Sventoraityte J., Nikolaus S., Mayr G., Domingues FS., Albrecht M., Nothnagel M., Ellinghaus D., Sina C., Onnie CM., Weersma RK., Stokkers PC., Wijmenga C., Gazouli M., Strachan D., Mc Ardle WL., Vermeire S., Rutgeerts P., Rosenstiel P., Krawczak M., Vatn MH.; IBSEN study group, Mathew CG., Schreiber S. (2008) Sequence variants in *IL10*, *ARPC2* and multiple other loci contribute to ulcerative colitis susceptibility. Nat Genet. 40:1319–23.
- Fregonese L., Stolk J. (2008) Hereditary alpha-1-antitrypsin deficiency and its clinical consequences. Orphanet Journal of Rare Diseases 3:16.
- Fujino S., Andoh A., Bamba S., Ogawa A., Hata K., Araki Y., Bamba T., Fujiyama Y. (2003) Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. Gut 52: 65–70.
- Fujisawa T., Velichko S., Thai P., Hung LY., Huang F., Wu R. (2009) Regulation of airway MUC5AC expression by IL-1beta and IL-17A; the NF-kappaB paradigm. J Immunol. 183(10):6236-43.
- Fuhrman C., Delmas MC. (2010) Epidemiology of Chronic Obstructive Pulmonary Disease in France. Revue des maladies respiratoires 27, 160 – 168.

G

- Gadek JE., Fells GA., Zimmerman RL., Rennard SI., Crystal RG. (1981) Antielastases of the human alveolar structures. Implications for the protease-antiprotease theory of emphysema. J Clin Invest. 68(4):889–898.
- Gaffen SL. (2009) Structure and signalling in the IL-17 receptor family. Nat Rev Immunol. (8):556-67.
- Gandhi R., Kumar D., Burns EJ., Nadeau M., Dake B., Laroni A., Kozoriz D., Weiner HL., Quintana FJ. (2010) Activation of the aryl hydrocarbon receptor induces human type 1 regulatory T cell-like and Foxp3(+) regulatory T cells. Nat Immunol. 11(9):846-53.
- Ganz T. (2002) Antimicrobial polypeptides in host defense of the respiratory tract. J. Clin. Invest. 109 (6): 693–7.
- Garrett WS., Gallini CA., Yatsunenkov T., Michaud M., DuBois A., Delaney ML., Punit S., Karlsson M., Bry L., Glickman JN., Gordon JI., Onderdonk AB., Glimcher LH. (2010) Enterobacteriaceae act in concert with the gut microbiota to induce spontaneous and maternally transmitted colitis. Cell Host Microbe 8(3):292-300
- Geijtenbeek TB., Van Vliet SJ., Koppel EA., Sanchez-Hernandez M., Vandenbroucke-Grauls CM., Appelmelk B., Van Kooyk Y. (2003) Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. J Exp Med. 197(1):7-17.
- Geremia A., Arancibia-Cárcamo CV., Fleming MP., Rust N., Singh B., Mortensen NJ., Travis SP., Powrie F. (2011) IL-23-responsive innate lymphoid cells are increased in inflammatory bowel disease. J Exp Med. 208(6):1127-33.
- Gershon RK. (1975) A disquisition on suppressor T cells. Transplant Rev 26 pp. 170–185.
- Ghoreschi K., Laurence A., Yang XP., Tato CM., McGeachy MJ., Konkel JE., Ramos HL., Wei L., Davidson TS., Bouladoux N., Grainger JR., Chen Q., Kanno Y., Watford WT., Sun HW., Eberl G., Shevach EM., Belkaid Y., Cua DJ., Chen W., O'Shea JJ. (2010) Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling. Nature 467:967–71.
- Gill SR., Pop M., Deboy RT., Eckburg PB., Turnbaugh PJ., Samuel BS., Gordon JI., Relman DA., Fraser-Liggett CM., Nelson KE. (2006) "Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome". Science 312 (5778): 1355–1359.
- Gilliet M., Liu YJ. (2002) Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. J. Exp. Med. 195, 695–704.

- Gillissen A., Jaworska M., Orth M., Coffiner M., Maes P., App EM., Cantin AM., Schultze-Werninghaus G. (1997) Nacystelyn, a novel lysine salt of *N*-acetylcysteine, to augment cellular antioxidant defence in vitro. Respir Med. 91:159–168.
- Gladiator A., Wangler N., Trautwein-Weidner K., LeibundGut-Landmann S. (2013) Cutting edge: IL-17-secreting innate lymphoid cells are essential for host defense against fungal infection. J Immunol. 190(2):521-5.
- Godfrey DI., Stankovic S., Baxter AG. (2010) Raising the NKT cell family. Nat Immunol. 11(3):197-206.
- Godfrey DI., MacDonald HR., Kronenberg M., Smyth MJ., Van Kaer L. (2004) NKT cells: what's in a name? Nat Rev Immunol. 4(3):231-7.
- Gordon S. (2003) Alternative activation of macrophages. Nature Rev. Immunol. 3, 23–35.
- Goulding J., Godlee A., Vekaria S., Hilty M., Snelgrove R., Hussell T. (2011) Lowering the threshold of lung innate immune cell activation alters susceptibility to secondary bacterial superinfection. J. Infect. Dis. 204, 1086–1094.
- Goven D., Boutten A., Leçon-Malas V., Boczkowski J., Bonay M. (2009) Prolonged cigarette smoke exposure decreases heme oxygenase-1 and alters Nrf2 and Bach1 expression in human macrophages: Roles of the MAP kinases ERK_{1/2} and JNK. FEBS Letters Volume 583, Issue 21, p3508–3518.
- Grainger JR., Wohlfert EA., Fuss IJ., Bouladoux N., Askenase MH., Legrand F., Koo LY., Brenchley JM., Fraser ID., Belkaid Y. (2013) Inflammatory monocytes regulate pathologic responses to commensals during acute gastrointestinal infection. Nat. Med. 19 pp. 713–721.
- Greer JP., Arber DA., Glader B., List AF., Means Jr RT., Paraskevas F., Rodgers GM., Foerster J. (2013) Subcellular Structure of Neutrophils. Wintrobe's Clinical Hematology 13th edition.
- Gröndal G., Kristjansdottir H., Gunnlaugsdottir B., Arnason A., Lundberg I., Klareskog L., Steinsson K. (1999) Increased number of interleukin-10-producing cells in systemic lupus erythematosus patients and their first-degree relatives and spouses in Icelandic multicase families. Arthritis Rheum 42 pp. 1649–1654.
- Groux H., O'Garra A., Bigler M., Rouleau M., Antonenko S., de Vries JE., Roncarolo MG (1997) A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. Nature. 389(6652):737-42.
- Grumelli S., Corry DB., Song LZ., Song L., Green L., Huh J., Hacken J., Espada R., Bag R., Lewis DE., Kheradmand F. (2004) An immune basis for lung parenchymal destruction in chronic obstructive pulmonary disease and emphysema. PLoS Med. 1:e8.

H

- Halliwell B., Poulsen B., Henrik E. (2006) Cigarette smoke and oxidative stress. Berlin: Springer.
- Hamilton-Miller JM., Shah S. (1998) Vancomycin susceptibility as an aid to the identification of lactobacilli. Lett Appl Microbiol. 26(2):153-4.
- Hammer M., Mages J., Dietrich H., Schmitz F., Striebel F., Murray PJ., Wagner H., Lang R. (2005) Control of dual-specificity phosphatase-1 expression in activated macrophages by IL-10. Eur J Immunol. 35(10):2991-3001.
- Harju T., Kaarteenaho-Wiik R., Soini Y., Sormunen R., Kinnula VL. (2002) Diminished immunoreactivity of gamma-glutamylcysteine synthetase in the airways of smoker's lung. Am J Crit Care Med. 166(5) :754 -759.
- Harries AD., Baird A., Rhodes J. (1982) Non-smoking: a feature of ulcerative colitis. Br Med J (Clin Res Ed) 284(6317):706.
- Hart PH., Hunt EK., Bonder CS., Watson CJ., Finlay-Jones JJ. (1996) Regulation of surface and soluble TNF receptor expression on human monocytes and synovial fluid macrophages by IL-4 and IL-10. J Immunol. 157 pp. 3672–3680.
- Haslett C. (1999) Granulocyte apoptosis and its role in the resolution and control of lung inflammation. Am J Respir Crit Care Med. 160:S5–S11.
- Heine G., Niesner U., Chang HD., Steinmeyer A., Zügel U., Zuberbier T., Radbruch A., Worm M. (2008) 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ promotes IL-10 production in human B cells. Eur. J. Immunol. 38, 2210–2218.

- Herbst T., Sichelstiel A., Schär C., Yadava K., Bürki K., Cahenzli J., McCoy K., Marsland BJ., Harris NL. (2011) Dysregulation of allergic airway inflammation in the absence of microbial colonization. Am J Respir Crit Care Med. 184(2):198-205.
- Hercend T., Meuer S., Brennan A., Edson MA., Acuto O., Reinherz EL., Schlossman SF., Ritz J. (1984) Natural killer-like function of activated T lymphocytes: differential blocking effects of monoclonal antibodies specific for a 90-kDa clonotypic structure. Cell Immunol. 86:381-392.
- Higgins SC., Lavelle EC., McCann C., Keogh B., McNeela E., Byrne P., O’Gorman B., Jarnicki A., McGuirk P., Mills KH. (2003) Toll-like receptor 4-mediated innate IL-10 activates antigen-specific regulatory T cells and confers resistance to *Bordetella pertussis* by inhibiting inflammatory pathology. J Immunol. 171(6):3119-27.
- Hill C. (2004) Conséquences du tabagisme sur la santé, Le tabagisme, Yves Martinet, A. Bohadana et alii, Masson, p 62.
- Hill DA., Artis D. (2010) Intestinal bacteria and the regulation of immune cell homeostasis. Annu Rev Immunol. 28:623–667.
- Hilty M., Burke C., Pedro H., Cardenas P., Bush A., Bossley C., Davies J., Ervine A., Poulter L., Pachter L., Moffatt MF., Cookson WO. (2010) Disordered microbial communities in asthmatic airways. PLoS One 5(1):e8578.
- Hirota K., Yoshitomi H., Hashimoto M., Maeda S., Teradaira S., Sugimoto N., Yamaguchi T., Nomura T., Ito H., Nakamura T., Sakaguchi N., Sakaguchi S. (2007) Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model. J Exp. Med. Vol. 204, No. 12, 2803-2812.
- Hisamatsu T., Suzuki M., Reinecker HC., Nadeau WJ., McCormick BA., Podolsky DK. (2003) CARD15/NOD2 functions as an anti-bacterial factor in human intestinal epithelial cells. Gastroenterology 124: 993–1000.
- Hirayama F., Lee AH., Binns CW., Zhao Y., Hiramatsu T., Tanikawa Y., Nishimura K., Taniguchi H. (2009) Do vegetables and fruits reduce the risk of chronic obstructive pulmonary disease? A case–control study in Japan. Prev Med. 49(2–3):184–189.
- Hizawa N., Kawaguchi M., Huang SK., Nishimura M. (2006) Role of interleukin-17F in chronic inflammatory and allergic lung disease. Clin Exp Allergy 36(9):1109-14.
- Ho AS., Liu Y., Khan TA., Hsu DH., Bazan JF., Moore KW. (1993) A receptor for interleukin 10 is related to interferon receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:11267–71.
- Hoenderdos K., Condliffe A. (2013) The Neutrophil in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Too Little, Too Late or Too Much, Too Soon?. Am. J of Respir Cell and Mol. Biol. Vol. 48, No. 5 pp. 531-539.
- Holt PG. (1993) Development of bronchus associated lymphoid tissue (BALT) in human lung disease: a normal host defence mechanism awaiting therapeutic exploitation? Thorax 48, 1097–1098
- Hong S., Scherer DC., Singh N., Mendiratta SK., Serizawa I., Koezuka Y., Van Kaer L. (1999) Lipid antigen presentation in the immune system : lessons learned from CD1d knockout mice. Immunol Rev. 169 :31-44.
- Hooper LV., Littman DR., Macpherson AJ. (2012) Interactions between the microbiota and the immune system. Science 336(6086):1268-73.
- Huang YJ., Kim E., Cox MJ., Brodie EL., Brown R., Wiener-Kronish JP., Lynch SV. (2010) A persistent and diverse airway microbiota present during chronic obstructive pulmonary disease exacerbations. OMICS 14(1):9-59.
- Huber S., Gagliani N., Esplugues E., O’Connor W. Jr., Huber FJ., Chaudhry A., Kamanaka M., Kobayashi Y., Booth CJ., Rudensky AY., Roncarolo MG., Battaglia M., Flavell RA. (2011). Th17 cells express interleukin-10 receptor and are controlled by Foxp3(-) and Foxp3+ regulatory CD4+ T cells in an interleukin-10-dependent manner. Immunity 34, 554–56510.
- Hunninghake GM., Cho MH., Tesfaigzi MH., Soto-Quiros ME., Avila L., Lasky-Su J., Stidley C., Melen E., Soderhall C., Hallberg J., Kull I., Kere J., Svartengren M., Pershagen G., Wickman M., Lange C., Demeo DL., Hersh CP., Klanderman BJ., Raby BA., Sparrow D., Shapiro SD., Silverman EK., Litonjua AA., Weiss ST., Celedon JC. (2009) MMP12, lung function, and COPD in high-risk populations. N Engl J Med 361:2599-2608.
- Hsu H., Yang P., Wang J., Wu Q., Myers R., Chen J., Yi J., Guentert T., Tousson A., Stanus AL., Le TV., Lorenz RG., Xu H., Kolls JK., Carter RH., Chaplin DD., Williams RW., Mountz JD. (2008) Interleukin 17-producing T helper cells and interleukin 17 orchestrate autoreactive germinal center development in autoimmune BXD2 mice. Nat Immunol. 9:166–75.

I

- IARC, 2004, Tobacco Smoking and Tobacco Smoke, Summary of Data Reported and Evaluation. Volume 83 - Chapter 5.4: Other relevant data.
- Icaza-Chávez ME. (2013) Gut microbiota in health and disease. Rev Gastroenterol Mex. 78(4):240-8.
- Ichinohe T., Pang IK., Kumamoto Y., Peaper DR., Ho JH., Murray TS., Iwasaki A. (2011) Microbiota regulates immune defense against respiratory tract influenza A virus infection. Proc Natl Acad Sci USA. 108:5354–5359.
- Imaoka H., Hoshino T., Takei S., Kinoshita T., Okamoto M., Kawayama T., Kato S., Iwasaki H., Watanabe K., Aizawa H. (2008) Interleukin-18 production and pulmonary function in COPD. Eur Respir J. 287–297.
- Ito S., Ansari P., Sakatsume M., Dickensheets H., Vazquez N., Donnelly RP., Larner AC., Finbloom DS. (1999) Interleukin-10 inhibits expression of both interferon alpha- and interferon gamma- induced genes by suppressing tyrosine phosphorylation of STAT1. Blood 93(5):1456-63.
- Ivanov II., Atarashi K., Manel N., Brodie EL., Shima T., Karaoz U., Wei D., Goldfarb KC., Santee CA., Lynch SV., Tanoue T., Imaoka A., Itoh K., Takeda K., Umesaki Y., Honda K., Littman DR. (2009) Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. Cell 139(3):485-98.
- Iwakura Y., Nakae S., Saijo S., Ishigame H. (2008) The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. Immunol Rev. 226, pp. 57–79.
- Iwakura Y., Ishigame H. (2006) The IL-23/IL-17 axis in inflammation. J Clin Invest. 116(5):1218-22.
- Iwasaki A., Medzhitov R. (2004) Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. Nat Immunol. 5: 987–995.

J

- Janke M., Poth J., Wimmenauer V., Giese T., Coch C., Barchet W., Schlee M., Hartmann G. (2009) Selective and direct activation of human neutrophils but not eosinophils by Toll-like receptor 8. J. Allergy Clin. Immunol. 123 pp. 1026–1033.
- Jankovic D., Kugler DG., Sher A. (2010) IL-10 production by CD4+ effector T cells : a mechanism for self-regulation. Mucosal Immunol. 3(3):239-46.
- Janoff A. (1985) Elastases and emphysema: current assessment of the protease-antiprotease hypothesis. Am Rev Respir Dis. 132:417–433.
- Jefford M., Schnurr M., Toy T., Masterman KA., Shin A., Beecroft T., Tai TY., Shortman K., Shackleton M., Davis ID., Parente P., Luft T., Chen W., Cebon J., Maraskovsky E. (2003) Functional comparison of DCs generated in vivo with Flt3 ligand or in vitro from blood monocytes: differential regulation of function by specific classes of physiologic stimuli. Blood. 102(5):1753-63.
- Jenkins JK., Malyak M., Arend WP. (1994) The effects of interleukin-10 on interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 beta production in human monocytes and neutrophils. Lymphokine Cytokine Res. 13 pp. 47–54.
- Jorgensen NR., Schwarz P. (2008) Osteoporosis in chronic obstructive pulmonary disease patients. Curr Opin Pulm Med. 14 : 122-127.
- Jurlander J., Lai CF., Tan J., Chou CC., Geisler CH., Schriber J., Blumenson LE., Narula SK., Baumann H., Caligiuri MA. (1997) Characterization of interleukin-10 receptor expression on B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. Blood, 89 pp. 4146–4152.

K

- Kasama T., Strieter RM., Lukacs NW., Burdick MD., Kunkel SL. (1994) Regulation of neutrophil-derived chemokine expression by IL-10. J Immunol. 152 pp. 3559–3569.

- Katsikis PD., Chu CQ., Brennan FM., Maini RN., Feldmann M. (1994) Immunoregulatory role of interleukin 10 in rheumatoid arthritis. J Exp Med. 179 pp. 1517–1527.
- Kebir H., Kreyborg K., Ifergan I., Dodelet-Devillers A., Cayrol R., Bernard M., Giuliani F., Arbour N., Becher B., Prat A. (2007) Human TH17 lymphocytes promote blood–brain barrier disruption and central nervous system inflammation. Nat Med. 13:1173–5.
- Kelly D, Conway S, Aminov R. (2005) Commensal gut bacteria: mechanisms of immune modulation. Trends Immunol. 26:326-333.
- Kelsall B. (2008) Recent progress in understanding the phenotype and function of intestinal dendritic cells and macrophages. Mucosal Immunol. 1 pp. 460–469.
- Kim EY., Battaile JT., Patel AC., You Y., Agapov E., Grayson MH., Benoit LA., Byers DE., Alevy Y., Tucker J., Swanson S., Tidwell R., Tyner JW., Morton JD., Castro M., Polineni D., Patterson GA., Schwendener RA., Allard JD., Peltz G., Holtzman MJ. (2008) Persistent activation of an innate immune response translates respiratory viral infection into chronic lung disease. Nat Med. 14(6):633-40.
- Kim YS., Ho SB. (2010) Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. Curr. Gastroenterol. Rep. 12, 319–330.
- Kindt TJ., Goldsby RA., Osborne BA. (2008) Immunologie, le cours de Janis Kuby avec question de révision, 6^{ème} édition, DUNOD, p 37.
- King TE. Jr, Savici D., Campbell PA. (1988) Phagocytosis and killing of *Listeria monocytogenes* by alveolar macrophages: smokers versus nonsmokers. J. Infect. Dis. 158, 1309–1316
- Kinnula VL. (2005) Focus on antioxidant enzymes and antioxidant strategies in smoking related airway diseases. Thorax 60:693-700.
- Kirkham PA., Caramori G., Casolari P., Papi AA., Edwards M., Shamji B., Triantaphyllopoulos K., Hussain F., Pinart M., Khan Y., Heinemann L., Stevens L., Yeadon M., Barnes PJ., Chung KF., Adcock IM. (2011) Oxidative stress-induced antibodies to carbonyl-modified protein correlate with the severity of chronic obstructive pulmonary disease. Am. J. Crit. Care Med. 184(7) : 796-802.
- Klotz L., Knolle P. (2011) Nuclear receptors: TH17 cell control from within. FEBS Lett. 585(23):3764-9.
- Kobayashi KS., Chamaillard M., Ogura Y., Henegariu O., Inohara N., Nuñez G., Flavell RA. (2005) Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. Science 307: 731–734.
- Kobayashi M., Fitz L., Ryan M., Hewick RM., Clark SC., Chan S., Loudon R., Sherman F., Perussia B., Trinchieri G. (1989) Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. J. Exp. Med. 170 pp. 827–845.
- Korn T., Bettelli E., Oukka M., Kuchroo VK. (2009) IL-17 and Th17 Cells. Annu Rev Immunol. 27:485-517.
- Kotenko SV., Izotova LS., Mirochnitchenko OV., Esterova E., Dickensheets H., Donnelly RP., Pestka S. (2001) Identification of the functional interleukin-22 (IL-22) receptor complex: the IL-10R2 chain (IL-10Rbeta) is a common chain of both the IL-10 and IL-22 (IL-10-related T cell-derived inducible factor, IL-TIF) receptor complexes. J Biol Chem. 276(4):2725-32.
- Kraehenbuhl JP., Neutra MR. (2000) Epithelial M cells: differentiation and function. Annu Rev Cell Dev Biol. 16:301-32.
- Kriegel MA., Rathinam C., Flavell RA. (2009) E3 Ubiquitin ligase GRAIL controls primary T Cell Activation and oral tolerance. Proc Natl Acad Sci USA 106 :16770-5.
- Kronenberg M. (2005) Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes. Annu Rev Immunol 23:877-900.
- Kronenberg M., Gajin L. (2002) The unconventional lifestyle of NKT cells. Nat Rev Immunol. 2(8):557-68.
- Kudo M., Melton AC., Chen C., Engler MB., Huang KE., Ren X., Wang Y., Bernstein X., Li JT., Atabai K., Huang X., Sheppard D. (2012) IL-17A produced by $\alpha\beta$ T cells drives airway hyper-responsiveness in mice and enhances mouse and human airway smooth muscle contraction. Nat Med. 18(4):547-54.
- Kühn R., Löhler J., Rennick D., Rajewsky K., Müller W. (1993) Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. Cell. 75(2):263-74.

Kunz S., Wolk K., Witte E., Witte K., Doecke WD., Volk HD., Sterry W., Asadullah K., Sabat R. (2006) Interleukin (IL)-19, IL-20 and IL-24 are produced by and act on keratinocytes and are distinct from classical ILs. Exp Dermatol. 15 pp. 991–1004.

L

Laan M., Cui ZH., Hoshino H., Lötvall J., Sjöstrand M., Gruenert DC., Skoogh BE., Lindén AE. (1999) Neutrophil Recruitment by Human IL-17 Via C-X-C Chemokine Release in the Airways. The Journal of Immunology 162: 2347–2352.

La Cava A., Van Kaer L., Fu Dong S. (2006) CD4+CD25+ Tregs and NKT cells: regulators regulating regulators. Trends Immunol. 27:322–327

Lam KB., Jordan RE., Jiang CQ., Thomas GN., Miller MR., Zhang WS., Lam TH., Cheng KK., Adab P. (2010) Airflow obstruction and metabolic syndrome: the Guangzhou Biobank Cohort Study. Eur Respir J. 35(2):317-23.

Lamblin G., Aubert JP., Perini JM., Klein A., Porchet N., Degand P., Roussel P. (1992) Human respiratory mucins. Eur Respir J (5) : 247-56.

Laniado-Laborin R. (2009) Smoking and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) parallel epidemics of the 21th century. Int. J Environ Res Public Health 6:209-24.

Lanier LL. (2005) NK cell recognition. Annual Review of Immunology Vol. 23: 225-274.

Lécuyer E. (2012) Impact du microbiote sur la maturation du système immunitaire de l'hôte : analyse des fortes propriétés immunostimulantes de la bactérie segmentée filamenteuse en souris gnotobiotiques. Thèse de doctorat, Université Pierre et Marie Curie.

Lederberg J., McCray AT. (2001) 'Ome Sweet 'Omics—a genealogical treasury of words. Scientist 15:8.

Lee HH., Meyer EH., Goya S., Pichavant M., Kim HY., Bu X., Umetsu SE., Jones JC., Savage PB., Iwakura Y., Casanovas JM., Kaplan G., Freeman GJ., DeKruyff RH., Umetsu DT. (2010) Apoptotic cells activate NKT cells through T cell Ig-like mucin-like-1 resulting in airway hyperreactivity. J Immunol. 185(9):5225-35.

Lee Y., Awasthi A., Yosef N., Quintana FJ., Xiao S., Peters A., Wu C., Kleinewietfeld M., Kunder S., Hafler DA., Sobel RA., Regev A., Kuchroo VK. (2012) Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. Nat Immunol. 13(10):991-9.

Lee J., Mo JH., Katakura K., Alkalay I., Rucker AN., Liu YT., Lee HK., Shen C., Cojocar G., Shenouda S., Kagnoff M., Eckmann L., Ben-Neriah Y., Raz E. (2006) Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells. Nat. Cell Biol. 8 :1327–1336.

LeGrand A., Fermor B., Fink C., Pisetsky DS., Weinberg JB., Vail TP., Guilak F. (2001) Interleukin-1, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-17 synergistically up-regulate nitric oxide and prostaglandin E2 production in explants of human osteoarthritic knee menisci. Arthritis Rheum. 44(9):2078-83.

Lelouard H., Fallet M., de Bovis B., Méresse S., Gorvel JP. (2011) Peyer's Patch Dendritic Cells Sample Antigens by Extending Dendrites Through M Cell-Specific Transcellular Pores. Gastroenterology 142(3):592-601.

Levine JB., Lukowski-Trubish D. (1995) Extraintestinal considerations in inflammatory bowel disease. Gastroenterol. Clin. North Am. 24, 633–646

Levy Y., Brouet JC. (1994) Interleukin-10 prevents spontaneous death of germinal center B cells by induction of the bcl-2 protein. J Clin Invest. 93 pp. 424–428.

Li C., Corraliza I., Langhorne J. (1999) A defect in interleukin-10 leads to enhanced malarial disease in *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection in mice. Infect. Immun. 67, 4435–4442.

Liang SC., Tan XY., Luxenberg DP., Karim R., Danussi Joannopoulos K., Collins M. Fouser LA. (2006) Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. J. Exp. Med. 203 : 2271-2279.

Lieberman J. (2003) The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. Nat Rev Immunol. 3:361-370.

- Lim S., Roche N., Oliver BG., Mattos W., Barnes PJ., Chung KF. (2000) Balance of matrix metalloprotease-9 and tissue inhibitor of metalloprotease-1 from alveolar macrophages in cigarette smokers. Regulation by interleukin-10. *Am J Respir Crit Care Med.* 162(4 Pt 1):1355-60.
- Littman DR., Rudensky AY. (2010) Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell.* 140 pp. 845–858.
- Liu Y., Van Kruiningen HJ., West AB., Cartun RW., Cortot A., Colombel JF. (1995) Immunocytochemical evidence of *Listeria*, *Escherichia coli*, and *Streptococcus* antigens in Crohn's disease. *Gastroenterology* 108, pp. 1396–1404.
- Liu Y., Wei SH., Ho AS., de Waal Malefyt R., Moore KW. (1994) Expression cloning and characterization of a human IL-10 receptor. *J. Immunol.* 152:1821–29.
- Loerbroks A., Jiang CQ., Thomas GN., Adab P., Zhang WS., Lam KB., Bosch JA., Cheng KK., Lam TH. (2012) COPD and depressive symptoms: findings from the Guangzhou Biobank Cohort Study. *Ann Behav Med.* 44(3):408-15.
- Løkke A., Lange P., Scharling H., Fabricus P., Vestbo J. (2005) Developing COPD: a 25 year follow up study of the general population. *Thorax* 61:935-39.
- Lommatzsch M., Bratke K., Knappe T., Bier A., Dreschler K., Kuepper M., Stoll P., Julius P., Virchow JC. (2010) Acute effects of tobacco smoke on human airway dendritic cells in vivo. *Eur Respir J.* 35(5):1130-6.
- Lopez AD., Mathers CD., Ezzati M., Jamison DT., Murray CJL. (2006) Measuring the Global Burden of Disease and Risk Factors, 1990–2001. Washington (DC): World Bank; 2006. Chapter 1.
- Lubberts E., van den Bersselaar L., Oppers-Walgreen B., Schwarzenberger P., Coenen-de Roo CJ., Kolls JK., Joosten LA., van den Berg WB. (2003) IL-17 promotes bone erosion in murine collagen-induced arthritis through loss of the receptor activator of NF-kappa B ligand/osteoprotegerin balance. *J Immunol.* 170(5):2655-62.
- Lusuardi M., Capelli A., Di Stefano A., Donner CF. (2002) Lung mucosal immunity: immunoglobulin-A revisited. *Eur Respir J.* 18(4):571-588.

M

- Macho Fernandez E., Valenti V., Rockel C., Hermann C., Pot B., Boneca IG., Grangette C. (2011) Anti-inflammatory capacity of selected lactobacilli in experimental colitis is driven by NOD2-mediated recognition of a specific peptidoglycan-derived muropeptide. *Gut* 60(8):1050-9
- MacNee W. (2005) Treatment of stable COPD: antioxidants. *Eur Respir Rev* 14:12–22.
- Macpherson AJ., Slack E., Geuking MB., McCoy KD. (2009) The mucosal firewalls against commensal intestinal microbes. *Semin. Immunopathol.* 31, 145–149.
- Macpherson AJ., Uhr T. (2004) Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science* 303 pp. 1662–1665.
- Maharshak N., Packey CD., Ellermann M., Manick S., Siddle JP., Huh EY., Plevy S., Sartor RB., Carroll IM. (2013) Altered enteric microbiota ecology in interleukin 10-deficient mice during development and progression of intestinal inflammation. *Gut Microbes* 4(4):316-24.
- Malhotra D., Thimmulappa R., Navas-Acien A., Sandford A., Elliott M., Singh A., Chen L., Zhuang X., Hogg J., Pare P., Tuder RM., Biswal S. (2008) Decline in NRF2-regulated antioxidants in chronic obstructive pulmonary disease lungs due to loss of its positive regulator, DJ-1. *Am J Respir Crit Care Med.* 178(6):592-604.
- Mallewaey T., Selvanantham T. (2012) Strategy of lipid recognition by invariant natural killer T cells: 'one for all and all for one'. *Immunology* 136(3):273-82.
- Maloy KJ., Powrie F. (2011) Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature* 474: 298-306.
- Manichanh C., Rigottier-Gois L., Bonnaud E., Gloux K., Pelletier E., Frangeul L., Nalin R., Jarrin C., Chardon P., Marteau P., Roca J., Dore J. (2006) Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut.* 55(2):205-11
- Marlow GJ., van Gent D., Ferguson LR. (2013) Why interleukin-10 supplementation does not work in Crohn's disease patients. *World J Gastroenterol.* 19(25):3931-41.

- Marquis K., Debigaré R., Lacasse Y., LeBlanc P., Jobin J., Carrier G., Maltais F. (2002) Midthigh muscle cross-sectional area is a better predictor of mortality than body mass index in patients with chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med. 166 : 809-813.
- Matsuda JL., Mallevaey T., Scott-Browne J., Gapin L. (2008) CD1d-restricted iNKT cells, the 'Swiss-Army knife' of the immune system. Curr Opin Immunol. 20(3):358-68.
- Maynard CL., Hatton RD., Helms WS., Oliver JR., Stephensen CB., Weaver CT. (2009) Contrasting roles for all-trans retinoic acid in TGF-beta-mediated induction of Foxp3 and Il10 genes in developing regulatory T cells J Exp Med. 206 pp. 343–357.
- Mazmanian SK., Round JL., Kasper DL. (2008) A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. Nature 453 pp. 620–625.
- McGuckin MA., Lindén SK., Sutton P., Florin TH. (2011) Mucin dynamics and enteric pathogens. Nat. Rev. Microbiol. 9 pp. 265–278.
- McDermott AJ., Huffnagle GB. (2014) The microbiome and regulation of mucosal immunity. Immunology. 142(1):24-31.
- McGeachy MJ., Bak-Jensen KS., Chen Y., Tato CM., Blumenschein W., McClanahan T., Cua DJ. (2007) TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. Nat Immunol. 8:1390–7.
- Meisel C., Vogt K., Platzer C., Radow F., Liebenthal C., Volk HD. (1996) Differential regulation of monocytic tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 expression. Eur. J. Immunol. 26(7):1580-6.
- Michaeloudes C., Suukar MB., Khorosani NM., Bhavsar PK., Chung KF. (2011) TGF-β regulates Nox4, MnSOD and catalase expression, and IL-6 release in airway smooth muscle cells. Am. J. Physiol. Lung Cell Mol Physiol. 300(2):L295-L304.
- Mills KHG. (2008) Induction, function and regulation of IL-17-producing T cells. Eur. J. Immunol. 38: 2636–2649.
- Mio T., Romberger DJ., Thompson AB., Robbins RA., Heires A., Rennard SI. (1997) Cigarette smoke induces interleukin-8 release from human bronchial epithelial cells. Am J Respir Crit Care Med. 155:1770-1776.
- Miossec P., Korn T., Kuchroo VK. (2009) Interleukin-17 and type 17 helper T cells. N Engl J Med 361, pp. 888–898.
- Molodecky NA., Soon IS., Rabi DM., Ghali WA., Ferris M., Chernoff G., Benchimol EI., Panaccione R., Ghosh S., Barkema HW., Kaplan GG. (2012) Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. Gastroenterology 142(1):46-54.e42; quiz e30.
- Montbarbon M., Pichavant M., Langlois A., Erdual E., Maggiotto F., Neut C., Mallevaey T., Dharancy S., Dubuquoy L., Trottein F., Cortot A., Desreumaux P., Gosset P., Bertin B. (2013) Colonic inflammation in mice is improved by cigarette smoke through iNKT cells recruitment. PLoS One 8(4):e62208.
- Montes de Oca M., Rassulo J., Celli BR. (1996) Respiratory muscle and cardiovascular function during exercise in very severe COPD. Am J Respir Crit Care Med. 154 : 1284-1289.
- Moore K., de Waal Malefyt R., Coffman R., O'Garra A. (2001) Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. Annu. Rev. Immunol. 19:683–765.
- Moore KW., Vieira P., Fiorentino DF., Trounstein ML., Khan TA., Mosmann TR. (1990) Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. Science 248:1230–34.
- Morgan MJ., Liu Z. (2010) Crosstalk of reactive oxygen species and NF-κB signaling. Cell Res. 21(1): 103–115.
- Mosmann TR., Coffman RL. (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annu Rev Immunol. 7:145-73.
- Murai M., Turovskaya O., Kim G., Madan R., Karp CL., Cheroutre H., Kronenberg M. (2009) Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. Nat Immunol. 10(11):1178-84.
- Muranski P., Borman ZA., Kerkar SP., Klebanoff CA., Ji Y., Sanchez-Perez L., Sukumar M., Reger RN., Yu Z., Kern SJ., Roychoudhuri R., Ferreyra GA., Shen W., Durum SK., Feigenbaum L., Palmer DC., Antony PA., Chan CC., Laurence A., Danner RL., Gattinoni L., Restifo NP. (2011) Th17 cells are long lived and retain a stem cell-like molecular signature. Immunity. 35(6):972-85.

- Muranski P., Restifo NP. (2013) Essentials of Th17 cell commitment and plasticity. Blood 121(13):2402-14.
- Murray CJ., Lopez AD. (1997) Alternative projection of mortality by cause 1990-2020 : global burden of disease study. Lancet 349:1498-1504.
- Murugaiyan G., Mittal A., Lopez-Diego R., Maier LM., Anderson DE., Weiner HL. (2009) IL-27 is a key regulator of IL-10 and IL-17 production by human CD4⁺ T cells. J. Immunol. 183:2435–43.
- Murugananthan P., Bernardo-Ordiz D., Hart AL., Knight SC., Whelan K., Al-Hassi AO. (2012) Dysbiosis in mucosally adherent microbiota at surgery and in postendoscopic recurrence at 6 and 12 months — a longitudinal prospective evaluation in Crohn's disease. Gastroenterology 142 p. S-677.

N

- Nakamatsu M., Yamamoto N., Hatta M., Nakasone C., Kinjo T., Miyagi K., Uezu K., Nakamura K., Nakayama T., Taniguchi M., Iwakura Y., Kaku M., Fujita J., Kawakami K. (2007) Role of interferon-gamma in V α 14⁺ natural killer T cell-mediated host defense against *Streptococcus pneumoniae* infection in murine lungs. Microbes Infect. 9:364–374.
- Neutra MR., Mantis NJ., Kraehenbuhl JP. (2001) Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. Nat Immunol. 2(11):1004-9.
- Newman B., Siminovitch KA. (2005) Recent advances in the genetics of inflammatory bowel disease. Curr Opin Gastroenterol. 21: 401–407.
- Ng TH., Britton GJ., Hill EV., Verhagen J., Burton BR., Wraith DC. (2013) Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin-10. Front Immunol. 4:129.
- Noack M., Miossec P. (2014) Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases. Autoimmun Rev. (6):668-77.
- Noverr MC., Noggle RM., Toews GB., Huffnagle GB. (2004) Role of antibiotics and fungal microbiota in driving pulmonary allergic responses. Infect Immun. 72(9):4996-5003.
- Nyunoya T., Mebratu Y., Contreras A., Delgado M., Chand HS., Tesfaigzi Y. (2014) Molecular processes that drive cigarette smoke-induced epithelial cell fate of the lung. Am J Respir Cell Mol Biol. 50(3):471-82.

O

- Oberdörster G., Oberdörster E., Oberdörster J. (2005) Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. Environ Health Perspect. 113(7): 823–839.
- Ogura H., Murakami M., Okuyama Y., Tsuruoka M., Kitabayashi C., Kanamoto M., Nishihara M., Iwakura Y., Hirano T. (2008) Interleukin-17 promotes autoimmunity by triggering a positive-feedback loop via interleukin-6 induction. Immunity 29(4):628-36.
- Onishi RM., Gaffen SL. (2010) Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. Immunology 129(3):311-21.
- Oppmann B., Lesley R., Blom B., Timans JC., Xu Y., Hunte B., Vega F., Yu N., Wang J., Singh K., Zonin F., Vaisberg E., Churakova T., Liu M., Gorman D., Wagner J., Zurawski S., Liu Y., Abrams JS., Moore KW., Rennick D., de Waal-Malefyt R., Hannum C., Bazan JF., Kastelein RA. (2000) Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. Immunity 13(5):715-25.
- Ouyang W., Rutz S., Crellin NK., Valdez PA., Hymowitz SG. (2008) Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. Annu Rev Immunol. 29:71-109.

P

- Paget C., Mallewaey T., Speck AO., Torres D., Fontaine J., Sheehan KC., Capron M., Ryffel B., Faveeuw C., Leite de Moraes M., Platt F., Trottein F. (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.
- Paredi P., Kharitonov SA., Leak D., Ward S., Cramer D., Barnes PJ. (2000) Exhaled ethane, a marker of lipid peroxidation, is elevated in chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med. 162:369–373.

- Parekh VV., Wilson MT., Olivares-Villagómez D., Singh AK., Wu L., Wang CR., Joyce S., Van Kaer L. (2005) Glycolipid antigen induces long-term natural killer T cell anergy in mice. *J Clin Invest.* 115(9):2572-83.
- Parkes GC., Whelan K., Lindsay JO. (2014) Smoking in inflammatory bowel disease: Impact on disease course and insights into the aetiology of its effect. *J Crohns Colitis pii: S1873-9946(14)00050-6.*
- Paul-Clark MJ., McMaster SK., Sorrentino R., Sriskandan S., Bailey LK., Moreno L., Ryffel B., Quesniaux VF., Mitchell JA. (2009) Toll-like receptor 2 is essential for the sensing of oxidants during inflammation. *Am J Respir Crit Care Med.* 179:299–306.
- Peltekova VD., Wintle RF., Rubin LA., Amos CI., Huang Q., Gu X., Newman B., Van Oene M., Cescon D., Greenberg G., Griffiths AM., St George-Hyslop PH., Siminovitch KA. (2004) Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. *Nat Genet.* 36: 471–475.
- Pender SL., Li CK., Di Sabatino A., MacDonald TT., Buckley MG. (2006) Role of macrophage metalloelastase in gut inflammation. *Ann. NY Acad. Sci.* 1072,386–388.
- Pepper M., Linehan JL., Pagan AJ., Zell T., Dileepan T., Cleary PP., Jenkins MK. (2010) Different routes of bacterial infection induce long-lived TH1 memory cells and short-lived TH17 cells. *Nature Immunol.* 11:83–89.
- Perl DP., Fogarty U., Harpaz N., Sachar DB. (2004) Bacterial–metal interactions: the potential role of aluminum and other trace elements in the etiology of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 10: 881–883.
- Pichavant M., Rémy G., Bekaert S., Le Rouzic O., Kervoaze G., Vilain E., Just N., Tillie-Leblond I., Trottein F., Cataldo D., Gosset P. (2014) Oxidative stress-mediated iNKT-cell activation is involved in COPD pathogenesis. *Mucosal Immunol.* 7(3):568-78.
- Pichavant M., Gosset P., Rémy G., Methods and pharmaceutical compositions for the treatment of acute exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease, 2013, EP14305201.7.
- Pichavant M., Goya S., Meyer EH., Johnston RA., Kim HY., Matangkasombut P., Zhu M., Iwakura Y., Savage PB., DeKruyff RH., Shore SA., Umetsu DT. (2008) Ozone exposure in a mouse model induces airway hyperreactivity that requires the presence of natural killer T cells and IL-17. *J Exp Med.* 205(2):385-93.
- Piessevaux J., Lavens D., Peelman F., Tavernier J. (2008) The many faces of the SOCS box. *Cytokine Growth Factor Rev.* 19 pp. 371–381.
- Pot C., Jin H., Awasthi A., Liu SM., Lai CY., Madan R., Sharpe AH., Karp CL., Miaw SC., Ho IC., Kuchroo VK (2009) Cutting edge: IL-27 induces the transcription factor c-Maf, cytokine IL-21, and the costimulatory receptor ICOS that coordinately act together to promote differentiation of IL-10-producing Tr1 cells. *J Immunol.* 183(2):797-801.
- Pragman AA., Kim HB., Reilly CS., Wendt C., Isaacson RE. (2012) The lung microbiome in moderate and severe chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One* 7(10):e47305.
- Prause O., Bozinovski S., Anderson GP., Lindén A. (2004) Increased matrix metalloproteinase-9 concentration and activity after stimulation with interleukin-17 in mouse airways. *Thorax* 59(4):313-7.
- Proctor LM. (2011) The Human Microbiome Project in 2011 and beyond. *Cell Host Microbe* 10(4):287-91.

Q

- Qin J., Li Y., Cai Z., Li S., Zhu J., Zhang F., Liang S., Zhang W., Guan Y., Shen D., Peng Y., Zhang D., Jie Z., Wu W., Qin Y., Xue W., Li J., Han L., Lu D., Wu P., Dai Y., Sun X., Li Z., Tang A., Zhong S., Li X., Chen W., Xu R., Wang M., Feng Q., Gong M., Yu J., Zhang Y., Zhang M., Hansen T., Sanchez G., Raes J., Falony G., Okuda S., Almeida M., LeChatelier E., Renault P., Pons N., Batto JM., Zhang Z., Chen H., Yang R., Zheng W., Li S., Yang H., Wang J., Ehrlich SD., Nielsen R., Pedersen O., Kristiansen K., Wang J. (2012) A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* 490(7418):55-60.

R

- Rahman I., Adcock IM. (2006a) Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. *Eur Respir J* 28:219-242.
- Rahman I., Kilty I. (2006b) Antioxidant therapeutic targets in COPD. *Curr Drug Targets* 7 :707-720.

- Ramiro-Puig E., Pérez-Cano FJ., Castellote C., Franch A., Castell M. (2008) The bowel: a key component of the immune system. Rev Esp Enferm Dig. 100(1):29-34.
- Randall S. (2005) Children and secondhand smoke: not just a community issue. Paediatric Nursing 18, 29-31.
- Recommandations pour la prise en charge de la BPCO : Autres traitements médicamenteux. Rev Mal Respir 2003 ; 20 : S40-5.
- Reineke U., Schneider-Mergener J., Glaser RW., Stigler RD., Seifert M., Volk HD., Sabat R. (1999) Evidence for conformationally different states of interleukin-10: binding of a neutralizing antibody enhances accessibility of a hidden epitope. J Mol Recognit. 12(4):242-8.
- Rescigno M., Urbano M., Valzasina B., Francolini M., Rotta G., Bonasio R., Granucci F., Kraehenbuhl JP., Ricciardi-Castagnoli P. (2001) Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. Nat Immunol. 2(4):361-7.
- Ricchetti GA., Williams LM., Foxwell BM. (2004) Heme oxygenase 1 expression induced by IL-10 requires STAT-3 and phosphoinositol-3 kinase and is inhibited by lipopolysaccharide. J Leukoc Biol. 76(3):719-26.
- Robays LJ., Maes T., Lebecque S., Lira SA., Kuziel WA., Brusselle GG., Joos GF., Vermaelen KV. (2007) Chemokine receptor CCR2 but not CCR5 or CCR6 mediates the increase in pulmonary dendritic cells during allergic airway inflammation. J Immunol. 178 :5305–5311.
- Rogers NC., Slack EC., Edwards AD., Nolte MA., Schulz O., Schweighoffer E., Williams DL., Gordon S., Tybulewicz VL., Brown GD., Reis e Sousa C. (2005) Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. Immunity 22(4):507-17.
- Roilides E., Anastasiou-Katsiardani A., Dimitriadou-Georgiadou A., Kaditsoglou I., Tsaparidou S., Panteliadis C., Walsh TJ. (1998) Suppressive effects of interleukin-10 on human mononuclear phagocyte function against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*. J Infect Dis. 178 pp. 1734–1742.
- Romieu I., Trenga C. (2001) Diet and obstructive lung diseases. Epidemiol Rev. 23(2):268-87.
- Rothfuss KS., Stange EF., Herrlinger KR. (2006) Extraintestinal manifestations and complications in inflammatory bowel diseases. World J. Gastroenterol. 12, 4819–4831.
- Rousset F., Peyrol S., Garcia E., Vezzio N., Andujar M., Grimaud JA., Banchereau J. (1995) Long-term cultured CD40-activated B lymphocytes differentiate into plasma cells in response to IL-10 but not IL-4. Int Immunol. 7 pp. 1243–1253.
- Rouvier E., Luciani MF., Mattéi MG., Denizot F., Golstein P. (1993) CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. J Immunol. 150(12):5445-56.
- Rouvière H., Delmas A. (2002) L'anatomie humaine, Tome 3 Descriptive, topographique et fonctionnelle. Masson.
- Rubtsov YP., Rasmussen JP., Chi EY., Fontenot J., Castelli L., Ye X., Treuting P., Siewe L., Roers A., Henderson WR. Jr, Muller W., Rudensky AY. (2008) Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. Immunity 28 pp. 546–558.
- Rutten EPA., Lenaerts K., Buurman WA., Wouters EFM. (2014) Disturbed intestinal integrity in patients with COPD: effects of activities of daily living. Chest 145(2):245-252.
- Rutz S., Janke M., Kassner N., Hohnstein T., Krueger M., Scheffold A. (2008) Notch regulates IL-10 production by T helper 1 cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105:3497–502.
- Ruwanpura SM., McLeod L., Miller A., Jones J., Bozinovski S., Vlahos R., Ernst M., Armes J., Bardin PG., Anderson GP., Jenkins BJ. (2011) Interleukin-6 promotes pulmonary emphysema associated with apoptosis in mice. Am J Respir Cell Mol Biol. 45(4):720-30.

S

- Sa SM., Valdez PA., Wu J., Jung K., Zhong F., Hall L., Kasman I., Winer J., Modrusan Z., Danilenko DM., Ouyang W. (2007) The effects of IL-20 subfamily cytokines on reconstituted human epidermis suggest potential roles in cutaneous innate defense and pathogenic adaptive immunity in psoriasis. J. Immunol. 178:2229–40.
- Sadik CD., Kim ND., Luster AD. (2011) Neutrophils cascading their way to inflammation. Trends Immunol. 32(10):452-60.

- Saetta M., Di Stefano A., Turato G., Facchini FM., Corbino L., Mapp CE., Maestrelli P., Ciaccia A., Fabbri LM. (1998) CD8+ T-Lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease, Am J Respir Crit Care Med. 157 : 822-6.
- Sakaguchi S., Ono M., Setoguchi R., Yagi H., Hori S., Fehervari Z., Shimizu J., Takahashi T., Nomura T. (2006) Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. Immunol Rev. 212 pp. 8–27.
- Sakaguchi S. (2004) Naturally arising CD4 + regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. Annu Rev Immunol. 22 pp. 531–562.
- Salhi A., Rodrigues V. Jr, Santoro F., Dessein H., Romano A., Castellano LR., Sertorio M., Rafati S., Chevillard C., Prata A., Alcaïs A., Argiro L., Dessein A. (2008) Immunological and genetic evidence for a crucial role of IL-10 in cutaneous lesions in humans infected with *Leishmania braziliensis*. J Immunol. 180 pp. 6139–6148.
- Saraiva M., O'Garra A. (2010) The regulation of IL-10 production by immune cells. Nat Rev Immunol. 10(3):170-81.
- Saraiva M., Christensen JR., Veldhoen M., Murphy TL., Murphy KM., O'Garra A. (2009) Interleukin-10 production by Th1 cells requires interleukin-12-induced STAT4 transcription factor and ERK MAP kinase activation by high antigen dose. Immunity 31(2):209-19.
- Sartor RB. (2004a) Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics and prebiotics. Gastroenterology 126, pp. 1620–1633.
- Sartor RB. (2004b) Animal models of intestinal inflammation. In Kirsner's Inflammatory Bowel Diseases 120–137.
- Sartor RB., Hoentjen F. (2005) Proinflammatory cytokines and signaling pathways in intestinal innate immune cells. In Mucosal Immunol. 681–701.
- Sartor RB. (2006) Mechanisms of disease : pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology 3, 390-407.
- Schaberg T., Klein U., Rau M., Eller J., Lode H. (1995) Subpopulations of alveolar macrophages in smokers and non-smokers : relation to the expression of CD11/CD18 molecules and superoxide anion production. Am. J. Crit. Care Med. 151(5) : 1551-1558.
- Schauber J., Svanholm C., Termén S., Iffland K., Menzel T., Scheppach W., Melcher R., Agerberth B., Lührs H., Gudmundsson GH. (2003) Expression of the cathelicidin LL-37 is modulated by short chain fatty acids in colonocytes: relevance of signaling pathways. Gut 52(5):735-41.
- Schuetze N., Schoeneberger S., Mueller U., Freudenberg MA., Alber G., Straubinger RK. (2005) IL-12 family members: differential kinetics of their TLR4-mediated induction by Salmonella enteritidis and the impact of IL-10 in bone marrow-derived macrophages. Int Immunol. 17 pp. 649–659.
- Schumann J., Facciotti F., Panza L., Michieletti M., Compostella F., Collmann A., Mori L., De Libero G. (2007) Differential alteration of lipid antigen presentation to NKT cells due to imbalances in lipid metabolism. Eur J Immunol. 37:1431-1441.
- Shan M., Cheng HF., Song LZ., Roberts L., Green L., Hacken-Bitar J., Huh J., Bakaeen F., Coxson HO., Storness-Bliss C., Ramchandani M., Lee SH., Corry DB., Kheradmand F. (2009) Lung myeloid dendritic cells coordinately induce TH1 and TH17 responses in human emphysema. Science Translational Medicine 2009;1:4ra10.
- Sheikh F., Baurin VV., Lewis-Antes A., Shah NK., Smirnov SV., Anantha S., Dickensheets H., Dumoutier L., Renaud JC., Zdanov A., Donnelly RP., Kotenko SV (2004) Cutting edge: IL-26 signals through a novel receptor complex composed of IL-20 receptor 1 and IL-10 receptor 2. J Immunol. 172(4):2006-10.
- Shen N., Wang J., Zhao M., Pei F., He B. (2011) Anti-interleukin-17 antibodies attenuate airway inflammation in tobacco-smoke-exposed mice. Inhal Toxicol. 23(4):212-8.
- Shen F., Gaffen S. (2008) Structure–function relationships in the IL-17 receptor: implications for signal transduction and therapy. Cytokine 41:92–104.
- Sheppard P., Kindsvogel W., Xu W., Henderson K., Schlutsmeyer S., Whitmore TE., Kuestner R., Garrigues U., Birks C., Roraback J., Ostrander C., Dong D., Shin J., Presnell S., Fox B., Haldeman B., Cooper E., Taft D., Gilbert T., Grant FJ., Tackett M., Krivan W., McKnight G., Clegg C., Foster D., Klucher KM. (2003) IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. Nat Immunol. 4(1):63-8.

- Shoemaker J., Saraiva M., O'Garra A. (2006) GATA-3 directly remodels the *IL-10* locus independently of IL-4 in CD4⁺ T cells. J Immunol. 176, 3470–3479.
- Sibille Y, Reynolds HY. Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. Am Rev Respir Dis 1990;141:471–501.
- Siddiqi A., Berim I., Nabi H., Berenson CS., Sethi S. (2009) Association of impaired mucociliary clearance with occurrence of exacerbations in COPD Am J Respir Crit Care Med 179 : A5350.
- Siegel D., Gustafson DL., Dehn DL., Han JY., Boonchoong P., Berliner LJ., Ross, D. (2004) NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1: role as a superoxide scavenger. Mol. Pharmacol. 65 pp. 1238–1247
- Silva WA. Jr, Covas DT., Panepucci RA., Proto-Siqueira R., Siufi JL., Zanette DL., Santos AR., Zago MA. (2003) The profile of gene expression of human marrow mesenchymal stem cells. Stem Cells. 21(6):661-9.
- Sin DD., Leung R., Gan WQ., Man SP. (2007) Circulating surfactant protein D as a potential lung-specific biomarker of health outcomes in COPD: a pilot study. BMC Pulm Med. 7 : 13.
- Smith KR. (2002) Indoor air pollution in developing countries: recommendations for research. Indoor Air 12 pp. 198–207.
- Smythies LE., Sellers M., Clements RH., Mosteller-Barnum M., Meng G., Benjamin WH., Orenstein JM., Smith PD. (2005) Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. J Clin Invest. 115, 66–75.
- Snelgrove RJ., Goulding J., Didierlaurent AM., Lyonga D., Vekaria S., Edwards L., Gwyer E., Sedgwick JD., Barclay AN., Hussell T. (2008) A critical function for CD200 in lung immune homeostasis and the severity of influenza infection. Nature Immunol. 9, 1074–1083.
- Sokol H., Pigneur B., Watterlot L., Lakhdari O., Bermúdez-Humarán LG., Gratadoux JJ., Blugeon S., Bridonneau C., Furet JP., Corthier G., Grangette C., Vasquez N., Pochart P., Trugnan G., Thomas G., Blottière HM., Doré J., Marteau P., Seksik P., Langella P. (2008) Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. Proc Natl Acad Sci U S A. 105(43):16731-6.
- Soler N., Torres A., Ewig S., Gonzalez J., Celis R., El-Ebiary M., Hernandez C., Rodriguez-Roisin R. (1998) Bronchial microbial patterns in severe exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) requiring mechanical ventilation. Am. J. Respir Crit. Care Med. 157 (5 Part 1), 1498–1505
- Somerville KW., Logan RF., Edmond M., Langman MJ. (1984) Smoking and Crohn's disease. Br Med J (Clin Res Ed) 289(6450):954-6.
- Sommer F., Bäckhed F. (2013) The gut microbiota--masters of host development and physiology. Nat Rev Microbiol. 11(4):227-38.
- Sonnenberg GF., Nair MG., Kirn TJ., Zaph C., Fouser LA., Artis D. (2010) Pathological versus protective functions of IL-22 in airway inflammation are regulated by IL-17A. J Exp Med. 207(6):1293-305.
- Stav D., Raz M. (2009) Effect of *N*-acetylcysteine on airtrapping in COPD: a randomized placebo-controlled study. Chest 136(2):381–386.
- Steinhauser ML., Hogaboam CM., Kunkel SL., Lukacs NW., Strieter RM., Standiford TJ. (1999) IL-10 is a major mediator of sepsis-induced impairment in lung antibacterial host defense. J Immunol. 162 pp. 392–399.
- Steinman RM., Hawiger D., Nussenzweig MC. (2003) Tolerogenic dendritic cells. Annu Rev Immunol. 21:685-711.
- Stewart JP., Behm FG., Arrand JR., Rooney CM. (1994) Differential expression of viral and human interleukin-10 (IL-10) by primary B cell tumors and B cell lines. Virology 200 pp. 724–732.
- Stockinger B., Veldhoen M. (2007) Differentiation and function of Th17 T cells. Curr Opin Immunol. 19(3):281-6.
- Stoll M., Corneliussen B., Costello CM., Waetzig GH., Mellgard B., Andreas Koch W., Rosenstiel P., Albrecht M., Croucher PJP., Seegert D., Nikolaus S., Hampe J., Lengauer T., Pierrou S., Foelsch UR., Mathew CG., Lagerstrom-Fermer M., Schreiber S. (2004) Genetic variation in DLG5 is associated with inflammatory bowel disease. Nat Genet. 36: 476–480.

- Stumhofer JS., Silver JS., Laurence A., Porrett PM., Harris TH., Turka LA., Ernst M., Saris CJ., O'Shea JJ., Hunter CA. (2007) Interleukins 27 and 6 induce STAT3-mediated T cell production of interleukin 10. Nat Immunol. 8(12):1363-71.
- Sun CM., Deriaud E., Leclerc C., Lo-Man R. (2005) Upon TLR9 signaling, CD5⁺ B cells control the IL-12-dependent Th1-priming capacity of neonatal DCs. Immunity 22, 467–477.
- Sun W., Wu R., Last JA. (1995) Effects of exposure to environmental tobacco smoke on a human tracheobronchial epithelial cell line. Toxicology 100(1-3):163-74.
- Sutherland ER., Crapo JD., Bowler RP. (2006) N-acetylcysteine and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. J COPD 3(4):195–202.
- Sze MA., Dimitriu PA., Hayashi S., Elliott WM., McDonough JE., Gosselink JV., Cooper J., Sin DD., Mohn WW., Hogg JC. (2012) The lung tissue microbiome in chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med. 185(10):1073-80.

T

- Takahashi N, Matsumoto K, Saito H, Nanki T., Miyasaka N., Kobata T., Azuma M., Lee SK., Mizutani S., Morio T. (2009) Impaired CD4 and CD8 effector function and decreased memory T cell populations in ICOS-deficient patients. J Immunol. 182:5515–27.
- Takahashi M., Nakamura K., Honda K., Kitamura Y., Mizutani T., Araki Y., Kabemura T., Chijiwa Y., Harada N., Nawata H. (2006) An inverse correlation of human peripheral blood regulatory T cell frequency with the disease activity of ulcerative colitis. Dig Dis Sci. 51(4):677-86.
- Takanashi S., Hasegawa Y., Kanehira Y., Yamamoto K., Fujimoto K., Satoh K., Okamura K. (1999) Interleukin-10 level in sputum is reduced in bronchial asthma, COPD and in smokers. Eur Respir J. 14(2):309-14.
- Takizawa H., Tanaka M., Takami K., Ohtoshi T., Ito K., Satoh M., Okada Y., Yamasawa F., Nakahara K., Umeda A. (2001) Increased expression of transforming growth factor-beta1 in small airway epithelium from tobacco smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Am J Respir Crit Care Med. 163:1476–1483.
- Tomita K., Barnes PJ., Adcock IM. (2003) The effect of oxidative stress on histone acetylation and IL-8 release. Biochem Biophys Res Commun. 301(2):572-7.
- Torres-Duque C., Maldonado D., Pérez-Padilla R., Ezzati M., Viegi G. (2008) Forum of International Respiratory Studies (FIRS) Task Force on Health Effects of Biomass Exposure. Biomass fuels and respiratory diseases: a review of the evidence. Proc Am Thorac Soc. 5 pp. 577–590.
- Toussiro E. (2012) The IL23/Th17 pathway as a therapeutic target in chronic inflammatory diseases. Inflamm Allergy Drug Targets 11(2):159-68.
- Toy D., Kugler D., Wolfson M., Vanden Bos T., Gurgel J., Derry J., Tocker J., Peschon J. (2006) Cutting edge: interleukin 17 signals through a heteromeric receptor complex. J Immunol. 177(1):36-9.
- Trédaniel J., Boffetta P., Saracci R., Hirsch A. (1994) Exposure to environmental tobacco smoke and adult non-neoplastic respiratory diseases. Eur Respir J. 7:173-85.
- Tsai HC., Velichko S., Hung LY., Wu R. (2013) IL-17A and Th17 Cells in Lung Inflammation: An Update on the Role of Th17 Cell Differentiation and IL-17R Signaling in Host Defense against Infection. Clin Dev Immunol. 267971.

U - V

- van der Strate BW., Postma DS., Brandsma CA., Melgert BN., Luinge MA., Geerlings M., Hylkema MN., van den Berg A., Timens W., Kerstjens HA. (2006) Cigarette smoke-induced emphysema: a role for the B cell? Am J Respir Crit Care Med. 173:751-758.
- van Der Toorn M., Smit-de Vries MP., Slebos DJ., de Bruin HG., Abello N., van Oosterhout AJ., Bischoff R., Kauffman HF. (2007) Cigarette smoke irreversibly modifies glutathione in airway epithelial cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 293(5):L1156–L1162.

- Vargas-Rojas MI., Ramirez-Venegas A., Limon-Camacho L., Ochoa L., Hernandez-Zenteno R., Sansores RH. (2011) Increase of Th17 cells in peripheral blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease. Respir. Med. 105, 1648–1654
- Veldhoen M., Hirota K., Westendorf AM., Buer J., Dumoutier L., Renaud JC., Stockinger B. (2008) The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. Nature 453(7191):106-9.
- Verschuere S., Bracke KR., Demoor T., Plantinga M., Verbrugghe P., Ferdinande L., Lambrecht BN., Brusselle GG., Cuvelier CA. (2011) Cigarette smoking alters epithelial apoptosis and immune composition in murine GALT. Lab Invest. 91(7):1056-67
- Viaud S., Saccheri F., Mignot G., Yamazaki T., Daillère R., Hannani D., Enot DP., Pfirschke C., Engblom C., Pittet MJ., Schlitzer A., Ginhoux F., Apetoh L., Chachaty E., Woerther PL., Eberl G., Bérard M., Ecobichon C., Clermont D., Bizet C., Gaboriau-Routhiau V., Cerf-Bensussan N., Opolon P., Yessaad N., Vivier E., Ryffel B., Elson CO., Doré J., Kroemer G., Lepage P., Boneca IG., Ghiringhelli F., Zitvogel L. (2013) The intestinal microbiota modulates the anticancer immune effects of cyclophosphamide. Science 342(6161):971-6.
- Vicioso MA., Garaud JJ., Réglier-Poupet H., Lebeaut A., Gougerot-Pocidallo MA., Chollet-Martin S. 1998) Moderate inhibitory effect of interleukin-10 on human neutrophil and monocyte chemotaxis in vitro. Eur Cytokine Netw. 9 pp. 247–253.
- Visintin A., Mazzoni A., Spitzer JH., Wyllie DH., Dower SK., Segal DM. (2001) Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. J Immunol. 166(1):249-55.
- Vlahos R., Bozinovski S., Jones JE., Powell J., Gras J., Lilja A., Hansen MJ., Gualano RC., Irving L., Anderson GP. (2006) Differential protease, innate immunity, and NF-kappaB induction profiles during lunginflammation induced by subchronic cigarette smoke exposure in mice. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 290(5):L931-45
- W**
- Wan YY., Flavell RA. (2008) TGF-beta and regulatory T cell in immunity and autoimmunity. J Clin Immunol. 28 pp. 647–659.
- Wang H., Zhao JX., Hu N., Ren J., Du M., Zhu MJ. (2012) Side-stream smoking reduces intestinal inflammation and increases expression of tight junction proteins. World J Gastroenterol. 18(18):2180-7.
- Weaver CT., Harrington LE., Mangan PR., Gavrieli M., Murphy KM. (2006) Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. Immunity 24:677–88.
- Wells JM, Loonen LM, Karczewski JM. (2010) The role of innate signaling in the homeostasis of tolerance and immunity in the intestine. Int J Med Microbiol. 300:41-48.
- Wilson MT., Johansson C., Olivares-Villagómez D., Singh AK., Stanic AK., Wang CR., Joyce S., Wick MJ., Van Kaer L. (2003) The response of natural killer T cells to glycolipid antigens is characterized by surface receptor down-modulation and expansion. Proc Natl Acad Sci U S A. 100(19) :10913-8.
- Willems F., Marchant A., Delville JP., Gérard C., Delvaux A., Velu T., de Boer M., Goldman M. (1994) Interleukin-10 inhibits B7 and intercellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes Eur J Immunol. 24 pp. 1007–1009.
- Wolk K., Witte K., Witte E., Proesch S., Schulze-Tanzil G., Nasilowska K., Thilo J., Asadullah K., Sterry W., Volk HD., Sabat R. (2008) Maturing dendritic cells are an important source of IL-29 and IL-20 that may cooperatively increase the innate immunity of keratinocytes. J Leukoc Biol. 83 pp. 1181–1193.
- Wolk K., Witte E., Wallace E., Döcke WD., Kunz S., Asadullah K., Volk HD., Sterry W., Sabat R. (2006) IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. Eur J Immunol. 36(5):1309-23.
- Wolk K., Witte E., Reineke U., Witte K., Friedrich M., Sterry W., Asadullah K., Volk HD., Sabat R. (2005) Is there an interaction between interleukin-10 and interleukin-22? Genes Immun. 6(1):8-18.
- Wolk K., Kunz S., Witte E., Friedrich M., Asadullah K., Sabat R. (2004) IL-22 increases the innate immunity of tissues. Immunity 21(2):241-54.

Wolk K., Kunz S., Asadullah K., Sabat R. (2002) Cutting edge: immune cells as sources and targets of the IL-10 family members? J Immunol. 168(11):5397-402.

Worlitzsch, D. Tarran R., Ulrich M., Schwab U., Cekici A., Meyer KC., Birrer P., Bellon G., Berger J., Weiss T., Botzenhart K., Yankaskas JR., Randell S., Boucher, RC., Döring G. (2002) Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. J Clin Invest. 109, 317–325.

X

Xie MH., Aggarwal S., Ho WH., Foster J., Zhang Z., Stinson J., Wood WI., Goddard AD., Gurney AL. (2000) Interleukin (IL)-22, a novel human cytokine that signals through the interferon receptor-related proteins CRF2-4 and IL-22R. J Biol Chem. 275(40):31335-9.

Xu J., Yang Y., Qiu G., Lal G., Wu Z., Levy DE., Ochando JC., Bromberg JS., Ding Y. (2009) c-Maf regulates IL-10 expression during Th17 polarization. J Immunol. 182(10):6226-36.

Y

Yamazaki T., Yang XO., Chung Y., Fukunaga A., Nurieva R., Pappu B., Martin-Orozco N., Kang HS., Ma L., Panopoulos AD., Craig S., Watowich SS., Jetten AM., Tian Q., Dong C. (2008) CCR6 regulates the migration of inflammatory and regulatory T cells. J Immunol. 181:8391–401.

Ye P., Rodriguez FH., Kanaly S., Stocking KL., Schurr J., Schwarzenberger P., Oliver P., Huang W., Zhang P., Zhang J., Shellito JE., Bagby GJ., Nelson S., Charrier K., Peschon JJ., Kolls JK. (2001) Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. J Exp Med. 194:519–27.

Yende S., Waterer GW., Tolley EA., Newman AB., Bauer DC., Taaffe DR., Jensen R., Crapo R., Rubin S., Nevitt M., Simonsick EM., Satterfield S., Harris T., Kritchevsky SB. (2006) Inflammatory markers are associated with ventilatory limitation and muscle dysfunction in obstructive lung disease in well functioning elderly subjects. Thorax 61 : 10-16.

Yoon SI., Logsdon NJ., Sheikh F., Donnelly RP., Walter MR. (2006) Conformational changes mediate interleukin-10 receptor 2 (IL-10R2) binding to IL-10 and assembly of the signaling complex. J Biol Chem. 281(46):35088-96.

Yue FY., Dummer R., Geertsen R., Hofbauer G., Laine E., Manolio S., Burg G. (1997) Interleukin-10 is a growth factor for human melanoma cells and down-regulates HLA class-I, HLA class-II and ICAM-1 molecules. Int J Cancer 71 pp. 630–637.

Z

Zhang L., Cheng Z., Liu W., Wu K. (2013) Expression of interleukin (IL)-10, IL-17A and IL-22 in serum and sputum of stable chronic obstructive pulmonary disease patients. COPD 10(4):459-65.

Zhang X., Majlessi L., Deriaud E., Leclerc C., Lo-Man R. (2009) Coactivation of Syk kinase and MyD88 adaptor protein pathways by bacteria promotes regulatory properties of neutrophils. Immunity 31(5):761-71.

Zhou L., Ivanov II., Spolski R., Min R., Shenderov K., Egawa T., Levy DE., Leonard WJ., Littman DR. (2007) IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. Nat Immunol. 8 pp. 967–974.

Zhu J., Min B., Hu-Li J., Watson CJ., Grinberg A., Wang Q., Killeen N., Urban JF. Jr, Guo L., Paul WE. (2004) Conditional deletion of Gata3 shows its essential function in T(H)1-T(H)2 responses. Nat Immunol. 5(11):1157-65.

Zuin R., Palamidese A., Negrin R., Catozzo L., Scarda A., Balbinot M. (2005) High-dose N-acetylcysteine in patients with exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. Clin Drug Investig. 25(6):401–408.

AWARDS AND GRANTS

- **Travel Grant for the bests abstracts on COPD 2013**, European Respiratory Society, For the abstract entitled "Implication of interleukin-10 in the development of Chronic Obstructive Pulmonary Disease induced by cigarette smoke in mice" presented at the 23rd annual congress of the European Respiratory Society (Barcelona, Spain)

PATENT AND PUBLICATIONS

Patent:

- European Patent : Methods and pharmaceutical compositions for the treatment of acute exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease, *Pichavant M., Gosset P., Rémy G.*, 2013, EP14305201.7

Scientific publications:

- Oxidative stress-mediated *i*NKT-cell activation is involved in COPD pathogenesis
*Rémy G.**, Pichavant M., Bekaert S., Le Rouzic O., Kervoaze G., Vilain E., Just N., Tillie-Leblond I., Trottein F., Cataldo D. and Gosset P., *Mucosal Immunology* (2014) 7, 568-578; doi : 10.1038/mi.2013.75
- Evidence of p38 {gamma} and p38 {delta} involvement in cell transformation processes
Cerezo-Guisado M.I., Del Reino P., Rémy G., Kuma Y., Arthur J.S., Gallego-Ortega D., Cuenda A., *Carcinogenesis* (2011), 32(7):1093-9. doi: 10.1093/carcin/bgr079
- Differential activation of p38 MAPK isoforms by MKK6 and MKK3
Rémy G., Risco A.M., González-Teràn B., Iñesta-Vaquera F.A., Sabio G., Davis R.J., Cuenda A., *Cell. Signalling*, (2009), 22(4):660-7. doi: 10.1016/j.cellsig.2009

ORAL COMMUNICATIONS

Posters:

- Implication of Interleukin-10 in the development of Chronic Obstructive Pulmonary Disease due to cigarette smoke in mice
Rémy G., Grandjean T., Kervoaze G., Pichavant M., Chamillard M. and Gosset P., European Respiratory Society Congress, Barcelona (Spain, September 2013)
- Role of Antigen Presenting Cells and oxidative stress in *i*NKT cells activation by cigarette smoke in COPD
Rémy G., Pichavant M., Kervoaze G., Vilain E. and Gosset P., Journée de Recherche en Santé Respiratoire (J2R), Lille (France, October 2012)
- Implication of the p38 δ MAPK in the process of cellular transformation
Del Reino P., Cerezo-Guisado M.I., Rémy G., Cuenda A., XXXII Congreso de la sociedad española de Bioquímica y Biología Molecular, Oviedo (Spain, September 2009)

Congresses and oral diffusion:

- Scientific seminary of the Center for Infection and Immunity of Lille, Lille, France (May 2014)
- Revisiting paradigms in innate immunity international congress, Lille, France (October 2013)
- Workshop Comprehensive Pulmonary Center – Inserm, France/ Germany meeting, Tours, France (September 2013)
- European Respiratory Society Congress, Barcelona, Spain (September 2013)
- Workshop Institut Thématique Multi-Organismes Immunologie Hématologie Pneumologie BPCO (Immunology – Hematology – Pneumology COPD), Paris, France (November 2012)
- Workshop Comprehensive Pulmonary Center – Inserm, France/ Germany meeting, Munich, Germany (February 2012)



Lung Infection and Innate Immunity (LI3).
Center of Infection and Immunity of Lille- CIIL
INSERM U 1019 - CNRS UMR 8204
Dr Muriel Pichavant
Tel : (33) 320 87 79 65
Fax : (33) 320 87 78 88
E-mail : muriel.pichavant@pasteur-lille.fr

Lille, le 04 Juillet 2014

Madame, Monsieur,

Par la présente, je confirme que Mademoiselle Gaëlle Rémy a activement participé à l'étude sur l'implication des cellules NKT dans le développement de la BronchoPneumopathie Chronique Obstructive (BPCO) au cours de sa thèse : élaboration des expériences, rédaction et approches techniques (modèle murin d'exposition chronique à la fumée de cigarette, analyse phénotypique par cytométrie de flux, analyse génomique par qRT-PCR). Ce projet a conduit à la publication d'un premier article dans *Mucosal Immunology* en 2014, dans lequel Mademoiselle Gaëlle Rémy est le co-premier auteur:

M Pichavant*, **G Rémy***, S Bekaert, O Le Rouzic, G Kervoaze, E Vilain, N Just, I Tillie-Leblond, F Trottein, D Cataldo and P Gosset. Oxidative stress-mediated *i*NKT-cell activation is involved in COPD pathogenesis. *Mucosal Immunol.* May 2014; 7(3): 568–578. Published online Oct 30, 2013.

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a major clinical challenge mostly due to cigarette smoke (CS) exposure. Invariant natural killer T (*i*NKT) cells are potent immunoregulatory cells that have a crucial role in inflammation. In the current study, we investigate the role of *i*NKT cells in COPD pathogenesis. The frequency of activated NKT cells was found to be increased in peripheral blood of COPD patients relative to controls. In mice chronically exposed to CS, activated *i*NKT cells accumulated in the lungs and strongly contributed to the pathogenesis. The detrimental role of *i*NKT cells was confirmed in an acute model of oxidative stress, an effect that depended on interleukin (IL)-17. CS extracts directly activated mouse and human dendritic cells (DC) and airway epithelial cells (AECs) to trigger interferon γ and/or IL-17 production by *i*NKT cells, an effect ablated by the anti-oxidant N-acetylcystein. In mice, this treatment abrogates *i*NKT-cell accumulation in the lung and abolished the development of COPD. Together, activation of *i*NKT cells by oxidative stress in DC and AECs participates in the development of experimental COPD, a finding that might be exploited at a therapeutic level.

Je vous prie, Madame, Monsieur, de recevoir mes respectueuses salutations.

Muriel Pichavant
Chargée de recherche Inserm