



HAL
open science

Néogenèse lymphoïde induite par l'infection bactérienne bronchopulmonaire chronique

Justine Frija-Masson

► **To cite this version:**

Justine Frija-Masson. Néogenèse lymphoïde induite par l'infection bactérienne bronchopulmonaire chronique. Médecine humaine et pathologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2015. Français. NNT : 2015USPCB184 . tel-01860282

HAL Id: tel-01860282

<https://theses.hal.science/tel-01860282>

Submitted on 23 Aug 2018

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.



UNIVERSITE PARIS DESCARTES-SORBONNE PARIS CITE

**Ecole doctorale 157
"Bio Sorbonne Paris Cité"**

UPRES EA2511

*"Mucoviscidose et bronchopathies chroniques :
biopathologie et phénotypes cliniques"*

THESE

pour obtenir le grade de
Docteur en Sciences de la Vie et de la Santé
Spécialité : Physiopathologie

Néogenèse lymphoïde induite par l'infection bactérienne bronchopulmonaire chronique

Présentée et soutenue publiquement par
Justine FRIJA-MASSON
le vingt-trois novembre deux mille quinze

Devant un jury composé de :

Pr Pierre-Régis BURGEL	Directeur de thèse	- Université Paris Descartes
Pr Bernard MAITRE	Rapporteur	- Université Paris Est-Créteil
Pr Gaëtan DESLEE	Rapporteur	- Université de Reims Champagne-Ardenne
Pr Bruno CRESTANI	Examineur	- Université Paris Diderot
Dr David MONTANI	Examineur	- Université Paris-Sud

Titre : Néogenèse lymphoïde induite par l'infection bactérienne bronchopulmonaire chronique.

Résumé : Introduction : Les follicules lymphoïdes (FL) sont absents du poumon normal mais ont été décrits dans les poumons de patients atteints de mucoviscidose ou de dilata-tions de bronches non mucoviscidosiques, suggérant un rôle pour l'infection bronchique dans la néogenèse lymphoïde (NL). Nous avons étudié la dynamique de la néogenèse lymphoïde dans l'infection bactérienne.

Méthodes : Les souris C57BL/6 ont reçu une instillation intratrachéale de billes d'aga-rose contenant du PAO1 ou du *S. aureus* (10^6 CFU/animal) permettant une infection prolongée et ont été comparées à des souris contrôles (billes stériles ou absence de billes). Les souris ont été sacrifiées à J1, J4, J7 et J14.

Résultats : L'instillation unique de billes d'agarose contenant du PAO1 ou du *S. aureus* induit en 14 jours des FL fonctionnels situés sous l'épithélium en regard des zones d'infec-tion. Le marquage pour CXCL12 et CXCL13 est faible chez contrôles, mais présent dans l'épithélium (CXCL13) dès J1 et présent également dans les FL (CXCL12 et CXCL13) à J14 chez les souris infectées. Le traitement des souris par un anticorps anti CXCL12 ou anti CXCL13 n'inhibe pas la formation des FL induite par l'infection à PAO1.

Conclusion : Nos données suggèrent un rôle pour l'infection bactérienne prolongée et l'épithélium respiratoire dans la NL des bronchopathies chroniques. Notre modèle per-met d'évaluer les mécanismes de la formation et de persistance des FL dans le poumon.

Title : Intrapulmonary lymphoid neogenesis induced by prolonged bacterial airway in-fection in mice.

Abstract : Introduction : Lymphoid follicles (LF) are absent in normal lungs, but are described in lungs of subjects with cystic fibrosis (CF) or non-CF bronchiectasis, sug-gesting a role for bacterial infection in lymphoid neogenesis. We aimed to study the dynamic of pulmonary lymphoid neogenesis (LN) during bacterial infection.

Methods : C57BL/6 mice were instilled intratracheally with PAO1- or *S. aureus*-coated (1.10^6 CFU/mouse) agarose beads (which produced prolonged airway infection) and compared to controls (sterile beads or no instillation). Mice were sacrificed on day (d)1, d4, d7, and d14 after instillation.

Results : Chronic pulmonary infection with PAO1 or *S. aureus* induced organised LF in 14 days after a single challenge with PAO1- or *S. aureus*-coated beads. Bacteria-induced LF were exclusively localized in the subepithelium of infected airways. Staining for CXCL12 and CXCL13 was weak in airway epithelium of controls, but was positive in airway epithelium (CXCL13) at 1 day and in LF (both) of infected mice at 14 days. Treatment with anti CXCL12 or anti CXCL13 Ab did not reduce LN induced by PAO1 infection.

Conclusions : Chronic bacterial infection and respiratory epithelium could contribute to LN in chronic airway diseases. Our unique model allows to study mechanisms for the formation and maintenance of lung LF.

Mots-clés : Néogenèse lymphoïde, iBALT, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, immunité adaptative, CXCL12, CXCL13, mucoviscidose, BPCO

Keywords : Lymphoid neogenesis, iBALT, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, CXCL12, CXCL13, cystic fibrosis, COPD

Remerciements

Je remercie le Professeur Pierre-Régis Burgel pour m'avoir proposé ce sujet de thèse, qui m'a passionnée pendant 4 ans.

Je remercie le Professeur Isabelle Fajac de m'avoir accueillie au sein du laboratoire.

Je remercie le Professeur Daniel Dusser, pour le temps et les conseils qu'il m'a toujours accordés sans compter, et pour sa bienveillance à mon égard.

Je remercie messieurs les membres du jury, les Professeurs Bernard Maitre, Gaëtan Deslée, Bruno Crestani et le Docteur David Montani, qui ont accepté de juger ce travail et d'y consacrer du temps. J'adresse un remerciement tout particulier au Professeur Maitre, qui a reçu cette année trois manuscrits de ma part, et qui a suivi en grande partie, et toujours avec patience, les étapes de la rédaction de cette thèse.

Je remercie le Docteur Clémence Martin et madame Guiti Thévenot pour leur investissement précieux dans mon travail de thèse.

Je remercie beaucoup madame Murielle Dambo, pour son aide inestimable et son sens de l'organisation qui ont permis à ce travail d'avoir lieu au quotidien, et pour sa gentillesse à mon égard et sa bonne humeur.

Je remercie sincèrement le Docteur Bruno Lucas et madame Aurélie Durand pour leur aide expérimentale et intellectuelle dans ce travail, pour ce qu'il m'ont permis d'apprendre, et pour l'accueil chaleureux qu'ils m'ont toujours réservé dans leur laboratoire. J'adresse toutes mes excuses à Aurélie pour les soirées que je lui ai fait passer à Cochin...

Je remercie le Professeur Claire Poyart et monsieur Abdelouhab Bouaboud pour leur aide et leur transmission de connaissances en bactériologie, ainsi que pour la gentillesse et la disponibilité dont ils ont toujours fait preuve à notre égard.

Je remercie le Docteur Yongzheng Wu et le Docteur Lhousseine Touqui pour l'aide qu'ils nous ont apportée pour la réalisation des qPCR.

Je remercie le Professeur Marco Alifano et le Professeur Diane Damotte pour l'aide qu'ils nous apportent dans la collection des tissus humains.

Je remercie également Marie-Noëlle Lothe-Cartier et Lucile Regard (par ordre alphabétique!) pour l'année passée en commun et le travail qu'elles ont réalisé, qui figure en bonne place dans ce manuscrit.

Je remercie sincèrement Mélanie "Microtomator" Bigeat, qui a coupé quelques milliers de lames avec le sourire, et Claire Toustou, qui a fait le week-end de nombreux kilomètres pour venir m'aider à donner du gefitinib à des souris pas toujours opérantes...

Je remercie les membres de l'équipe Dinh-Xuan que j'ai côtoyés pendant 3 ans, pour leur sympathie et leur soutien au quotidien.

Je remercie vivement la Fondation Groupama pour la Santé pour son soutien pendant trois ans, sans lequel rien n'aurait été possible. Plus particulièrement, je tiens à remercier ici monsieur Gabriel de Montfort et madame Sophie Dancygier, qui m'ont soutenue à tous points de vue pendant ces quatre années de thèse, ainsi que le Professeur Christian Cabrol et feu le Professeur Gérard Lenoir, qui ont sou-

tenu ma candidature auprès de la Fondation. Je remercie également l'association Vaincre la Mucoviscidose et la Chancellerie des Universités (Legs Poix), qui ont financé ce travail. Enfin, je remercie la Fondation L'Oréal pour les femmes et la science qui m'a fait l'honneur de reconnaître mon parcours académique.

Je ne saurais remercier assez vivement ici ma famille pour son soutien indéfectible, non seulement pendant ces quatre années de thèse, mais également auparavant. Mes parents, mes soeurs ont toujours su guider et respecter mes choix et me donner sans compter amour, conseils et réconfort. Mon mari Jean-Baptiste a su accepter les sacrifices financiers et personnels que cette thèse a engendrés, réfléchir avec moi, m'écouter mais faire preuve de fermeté au bon moment.

Beaucoup de souris ont été utilisées pour réaliser ce travail. Je me suis toujours efforcée de les traiter le plus humainement possible, et le poème qui va suivre est un hommage et un remerciement...

"C'est pas mauvais, [... nonobstant] les courgettes."

"Tae a Moose" (Robert Burns, 1785)

Wee, sleekit, cow'rin, tim'rous beastie,
O, what a panic's in thy breastie!
Thou need na start awa sae hasty
 Wi bickering brattle!
I wad be laith to rin an' chase thee,
 Wi' murdering pattle.

I'm truly sorry man's dominion
Has broken Nature's social union,
 An' justifies that ill opinion
 Which makes thee startle
At me, thy poor, earth born companion
 An' fellow mortal!

I doubt na, whyles, but thou may thieve;
What then? poor beastie, thou maun live!
 A daimen icker in a thrave
 'S a sma' request;
I'll get a blessin wi' the lave,
 An' never miss't.

Thy wee-bit housie, too, in ruin!
It's silly wa's the win's are strewin!
An' naething, now, to big a new ane,
 O' foggage green!
An' bleak December's win's ensuin,
 Baith snell an' keen!

Thou saw the fields laid bare an' waste,
 An' weary winter comin fast,
An' cozie here, beneath the blast,
 Thou thought to dwell,
Till crash! the cruel coulter past
 Out thro' thy cell.

That wee bit heap o' leaves an' stibble,
Has cost thee monie a weary nibble!
Now thou's turned out, for a' thy trouble,
 But house or hald,
To thole the winter's sleety dribble,
 An' cranreuch cauld.

But Mousie, thou art no thy lane,
In proving foresight may be vain:
The best-laid schemes o' mice an' men
 Gang aft agley,
An' lea'e us nought but grief an' pain,
 For promis'd joy!

Still thou are blest, compared wi' me!
The present only toucheth thee:
But och! I backward cast my e'e,
 On prospects drear!
An' forward, tho' I canna see,
 I guess an' fear!

Liste des abréviations

- ADCC : antibody-dependant cell-mediated cellular cytotoxicity
- AMPc : adénosine monophosphate cyclique
- APRIL : a proliferation-inducing ligand
- ARN : acide ribonucléique
- ARNm : acide ribonucléique messenger
- ATP : adénosine triphosphate
- BAFF : B-cell activating factor
- bmpr2 : Bone Morphogenetic Protein Receptor type II
- BOS : bronchiolitis obliterans syndrome
- BPCO : bronchopneumopathie chronique obstructive
- CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
- CFU : colony forming unit
- CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
- coDC : cellule dendritique conventionnelle
- CPA : cellule présentatrice d'antigène
- DAB : 3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride
- DDB : dilatation des bronches
- DICV : déficit immunitaire commun variable
- dsRNA : double strand ribonucleic acid
- EDTA : Éthylène Diamine Tétracétique
- EFR : explorations fonctionnelles respiratoires
- EGF : epidermal growth factor
- EGFR : récepteur à l'epidermal growth factor
- ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay
- FACS : fluorescence-activated cell sorting
- FDC : cellule dendritique folliculaire
- Foxp3 : forkhead box P3
- FPI : fibrose pulmonaire idiopathique
- GOLD : Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease
- HEV : high endothelial venules
- HTAP : hypertension artérielle pulmonaire
- iBALT : inducible bronchus-associated lymphoid tissue
- IFN : interféron
- Ig : immunoglobuline
- IL : interleukine
- iTregs : induced T-regulator cells
- LB : lysogeny broth
- LBA : lavage broncho-alvéolaire
- LLR : leucine-rich repeat
- LPS : lipopolysaccharide
- LTBR : lymphotoxin beta receptor
- LTi : lymphocyte T inducer
- Mb : mégabase

- moDC : cellule dendritique dérivée des monocytes
- MVA : modified vaccinia virus Ankara
- NETT : National Emphysema Treatment Trial
- NK : natural killer
- NKT : natural killer-T
- NLR : nucleotide binding oligomerization domain (NOD)-like receptor
- PA : *Pseudomonas aeruginosa*
- PAMPs : pathogen-associated molecular patterns
- PAO1 : *Pseudomonas aeruginosa* souche O1
- PAP : pression artérielle pulmonaire
- PBS : phosphate buffered saline
- PCNA : proliferating cell nuclear antigen
- pDC : cellule dendritique plasmacytoïde
- phospho-EGFR : forme phosphorylée de l'EGFR
- PNA_d : peripheral lymph node addressin
- PRRs : pattern-recognition receptors
- qPCR : quantitative polymerase chain reaction
- RAS : restrictive allograft syndrome
- RLRs : retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I)-like receptors
- ROS : espèce réactive de l'oxygène
- RT-PCR : reverse transcriptase-polymerase chain reaction
- SAA : serum-amyloid A
- SAMS : *Staphylococcus aureus* sensible à la méthicilline
- SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline
- SEM : erreur standard sur la moyenne
- SLPI : secretory leukocyte protease inhibitor
- SVF : sérum de veau fœtal
- TCR : T-cell receptor
- TGF : Transforming Growth Factor
- Th : T-helper
- TIR : Toll/Interleukine 1 receptor
- TLRs : Toll-like receptors
- TNF : tumor necrosis factor
- TS : trypticase soja
- VEMS : volume expiré maximum en une seconde

Table des matières

Table des matières	9
Table des figures	13
Liste des tableaux	15
1 Introduction	17
1.1 Néogenèse lymphoïde	17
1.1.1 Immunité innée et acquise	17
1.1.2 Rôle de l'épithélium respiratoire dans l'immunité	22
1.1.3 Généralités sur les follicules lymphoïdes	26
1.2 Néogenèse lymphoïde dans les maladies respiratoires	32
1.3 Stimuli induisant une néogenèse lymphoïde	42
1.3.1 Stimuli non infectieux induisant une néogenèse lymphoïde pulmonaire	42
1.3.2 Stimuli infectieux induisant une néogenèse lymphoïde pulmonaire	44
1.4 Principales cytokines et chimiokines impliquées dans la néogenèse lymphoïde pulmonaire	48
1.4.1 Chimiokine CXCL13	48
1.4.2 Chimiokine CXCL12	51
1.4.3 Interleukine 17	52
1.4.4 Chimiokines CCL19 et CCL21	55
1.5 Mucoviscidose et dilatations de bronches	56
1.5.1 Dilatations de bronches non mucoviscidosiques	56
1.5.2 Mucoviscidose	57
1.5.3 Importance de l'infection bactérienne dans ces pathologies	58
1.5.4 Mise en jeu de l'immunité dans ces bronchopathies chroniques	59
1.6 Hypothèse de travail	65
2 Méthodes	67
2.1 Modèle d'infection bactérienne bronchique chronique	67
2.1.1 Choix de la souche de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	67
2.1.2 Choix de la souche de <i>Staphylococcus aureus</i>	67
2.1.3 Choix de la souche de souris C57/BL6J	68

2.1.4	Réisolement de la souche bactérienne	69
2.1.5	Culture bactérienne	69
2.1.6	Quantification sur les cultures bactériennes	70
2.1.7	Fabrication des billes d'agarose	70
2.1.8	Inoculum bactérien	72
2.1.9	Quantification de l'inoculum bactérien théorique par souris .	73
2.1.10	Vérification de la stérilité des billes contrôles	73
2.1.11	Instillation	73
2.1.12	Culture bactériologique des poumons de souris	74
2.2	Traitements pharmacologiques administrés aux animaux	75
2.2.1	Traitement par anticorps anti CXCL13 murin ou isotype contrôle	75
2.2.2	Traitement par anticorps anti CXCL12 murin	76
2.2.3	Traitement par gefitinib	76
2.3	Sacrifice des animaux	78
2.4	Aspects éthiques	79
2.5	Immunohistochimie	79
2.5.1	Inclusion en paraffine	79
2.5.2	Coupe au microtome	80
2.5.3	Marquage des protéines d'intérêt	80
2.6	Analyse histomorphométrique	82
2.6.1	Quantification de l'expression épithéliale de la forme phos- phorylée de l'EGFR (phospho-EGFR)	82
2.6.2	Quantification des agrégats lymphoïdes	82
2.7	Traitement des liquides de lavage bronchoalvéolaire (LBA)	83
2.7.1	Cytocentrifugation des liquides de LBA	83
2.7.2	Cytométrie en flux sur les liquides de LBA	83
2.7.3	Mesure des concentrations de chimiokines par ELISA	84
2.8	Quantitative polymerase chain reaction (qPCR)	86
2.8.1	Extraction d'ARN	86
2.8.2	qPCR	86
2.9	Analyse statistique	86
3	Résultats	89
3.1	Modèle d'infection bronchique prolongée	89
3.2	Inflammation intrapulmonaire provoquée par l'infection prolongée .	89
3.2.1	Etude par cytocentrifugation des liquides de lavage bron- choalvéolaire (LBA)	89
3.2.2	Etude par cytométrie en flux	92
3.3	Aspect macroscopique des poumons	94
3.4	Néogenèse lymphoïde en 14 jours	94
3.5	Cinétique de formation des follicules lymphoïdes	95
3.6	Cinétique de l'expression des chimiokines homéostatiques CXCL13 et CXCL12 lors de l'infection bactérienne prolongée	97

3.6.1	Expression de la chimiokine CXCL13	100
3.6.2	Expression de la chimiokine CXCL12	100
3.7	Effets de l'inhibition de CXCL12 ou CXCL13 sur la néogenèse lymphoïde induite par l'infection bronchopulmonaire prolongée à <i>P. aeruginosa</i>	102
3.8	Effet de l'inhibition de la voie de signalisation de l'EGFR sur la néogenèse lymphoïde induite par l'infection bronchopulmonaire prolongée à <i>P. aeruginosa</i>	104
3.8.1	Effets cliniques de l'administration de gefitinib	106
3.8.2	Efficacité de l'inhibition de la phosphorylation de l'EGFR par le gefitinib	106
3.8.3	Effets du gefitinib sur la néogenèse lymphoïde	107
3.9	Données complémentaires	108
3.9.1	Expression de la cytokine IL17	109
3.9.2	Expression de la chimiokine CCL19	109
4	Discussion	113
4.1	Données humaines sur la néogenèse lymphoïde dans les bronchopathies chroniques	114
4.2	Modèles animaux	115
4.3	Possible rôle de l'épithélium bronchique dans la néogenèse lymphoïde	117
4.4	Mécanismes de la formation des follicules lymphoïdes	118
4.5	Forces et faiblesses de l'étude	122
4.6	Perspectives	125
5	Conclusion	127
6	Annexes	129
6.1	Avis du comité d'éthique animale	129
6.2	Article soumis à l'European Respiratory Journal	132
	Bibliographie	135

Table des figures

1.1	Schéma synthétique du système immunitaire.	23
1.2	Expression de PRRs par l'épithélium respiratoire.	25
1.3	Voie de signalisation de l'EGFR.	27
1.4	Follicule lymphoïde.	30
1.5	Possibles rôles des follicules lymphoïdes.	31
1.6	Follicules lymphoïdes dans l'HTAP.	33
1.7	Follicules lymphoïdes dans la FPI	35
1.8	Mécanismes potentiels menant aux anomalies structurelles en réponse au tabac.	37
1.9	Agrégats lymphoïdes dans la BPCO.	39
1.10	Colonisation bactérienne dans la mucoviscidose.	60
1.11	Dilatations de bronches folliculaires.	62
1.12	Néogenèse lymphoïde dans la mucoviscidose et les dilatations de bronches.. . . .	64
2.1	Billes d'agarose calibrées	72
2.2	Formule chimique du gefitinib	78
3.1	Evolution de la charge bactérienne dans les poumons de souris . . .	90
3.2	Cytocentrifugation des LBA	91
3.3	Evolution des comptes cellulaires différentiels dans le LBA de souris infectées par PAO1	93
3.4	Aspect macroscopique des poumons.	94
3.5	Vues microphotographiques après 14 jours d'infection bactérienne. .	96
3.6	Microphotographies de la cinétique du recrutement des lymphocytes B et T	98
3.7	Cinétique du recrutement des lymphocytes B et T	99
3.8	Expression pulmonaire de CXCL13	101
3.9	Expression pulmonaire de CXCL12	103
3.10	Effet d'un anticorps anti-CXCL12 ou anti-CXCL13 sur la néogenèse lymphoïde	105
3.11	Evolution du poids sous gefitinib	106
3.12	Effet du gefitinib sur la phosphorylation de l'EGFR	107
3.13	Effet du gefitinib sur la néogenèse lymphoïde	108
3.14	Expression d'IL17	110

3.15 Expression de CCL19 dans le poumon total 111

Liste des tableaux

1.1	Récepteurs TLRs exprimés par l'épithélium respiratoire.	26
2.1	Liste des anticorps utilisés en immunohistochimie	81
2.2	Anticorps utilisés pour le marquage lymphoïde en cytométrie en flux	84
2.3	Anticorps utilisés pour le marquage myéloïde en cytométrie en flux	84
2.4	Amorces utilisées pour la PCR quantitative	86

Chapitre 1

Introduction

1.1 Néogenèse lymphoïde

1.1.1 Immunité innée et acquise

Le poumon est en contact direct avec l'extérieur et est en permanence exposé à différents stimuli infectieux (virus, bactéries, champignons) contenus dans l'air inhalé. L'immunité anti-infectieuse y est donc en permanence mise en jeu. La défense contre les agents infectieux inhalés fait appel à deux groupes de mécanismes : l'immunité innée et l'immunité adaptative (*cf.* **figure 1.1**).

Immunité innée

L'immunité innée est ainsi nommée car elle ne nécessite pas d'exposition antérieure au pathogène. C'est le premier mécanisme mis en jeu dans les infections aiguës. L'immunité innée repose sur la reconnaissance de composants microbiens très conservés, les *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), par les *pattern-recognition receptors* (PRRs), situés à la surface des cellules épithéliales et des phagocytes [66].

Dans le poumon, l'immunité innée est mise en jeu grâce aux cellules résidentes du poumon que sont les cellules épithéliales respiratoires (*cf. infra*) et alvéolaires, ainsi que par des cellules immunitaires.

Les cellules dendritiques résidentes du poumon sont de trois types : conventionnel (cDCs), plasmacytoïde (pDCs) et dérivées des monocytes (moDCs), chaque type ayant des fonctions et des voies de différenciation spécifiques que nous ne détaillerons pas ici [73]. Elles sont situées principalement du côté basolatéral de l'épithélium respiratoire et exercent une surveillance continue des agents pathogènes situés dans l'arbre respiratoire par "échantillonnage" [73].

Il existe également plusieurs types de macrophages intrapulmonaires : les macrophages bronchiques, interstitiels et alvéolaires (ces derniers représentent 90 à 95% des macrophages à l'état stable) ; de plus, des macrophages ont été décrits chez l'homme à la face interne des capillaires pulmonaires, mais ils n'ont pas été retrouvés chez le rongeur [73]. Les macrophages alvéolaires ont un rôle important dans la tolérance immunitaire face aux agents non pathogènes situés dans l'arbre respiratoire, en réprimant l'activation des lymphocytes T par les cellules dendritiques, en diminuant la production de Transforming Growth Factor (TGF)- β et en induisant la différenciation des lymphocytes T en cellules régulatrices Foxp3+. Cette tolérance est rompue lorsque un agent pathogène pénètre dans l'arbre respiratoire, et induit l'activation de PRRs [73]. Les macrophages alvéolaires sont essentiels à la défense contre les bactéries intra et extracellulaires, les virus et les champignons, du fait de leur pouvoir important de phagocytose [73]. Les macrophages alvéolaires peuvent présenter deux grands phénotypes : M1 et M2, qui diffèrent par leur profil d'expression de chimiokines et leurs fonctions [129].

Les polynucléaires neutrophiles sont recrutés au sein du poumon en réponse aux chimiokines sécrétées par les cellules épithéliales et les macrophages, notamment IL8, CCL3, CCL4 et CXCL2 ; leur fonction essentielle est la destruction intra

et extracellulaire des agents pathogènes, via la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et la dégranulation ou excrétion du contenu de leurs granules azurophiles (myéloperoxydase, élastase, défensines, lysozymes) [143].

Certaines cellules lymphoïdes sont également rattachées à l'immunité innée : les cellules NK sont des cellules lymphoïdes innées présentes à l'état basal dans le poumon et pouvant exercer leurs fonctions par cytotoxicité directe indépendante de l'antigène ou par la voie ADCC (antibody-dependent cell-mediated cellular cytotoxicity, c'est-à-dire destruction d'une cellule infectée sur laquelle est fixée un anticorps) [26]. Les cellules lymphoïdes innées sont des sous-types de lymphocytes plus récemment mis en évidence, qui semblent provenir de la même sous-population que les cellules NK ; elles ont des profils de sécrétions de chimiokines particuliers permettant de les différencier [143]. Enfin les cellules $T\gamma\delta$ et les cellules NKT (*cf. infra*) sont à la frontière entre immunité innée et adaptative.

L'immunité innée comprend également le système du complément, un groupe de protéines pouvant être activé selon trois voies distinctes : la voie classique d'une part, qui nécessite la présence d'un anticorps spécifique, et les voies alternes et des lectines d'autre part, qui peuvent être activées en l'absence d'anticorps spécifique. La cascade du complément est activée très précocement après la rencontre avec le pathogène. La voie alterne est en permanence active à la recherche de "surfaces activatrices" du complément. La voie des lectines et la voie classique sont activées en cas de reconnaissance d'éléments comme des débris cellulaires, des pathogènes, des complexes immuns. Ces trois voies convergent vers le clivage de la protéine inactive C3 en deux fragments actifs : C3a (médiateur de l'inflammation) et C3b (opsonine favorisant la destruction de la cellule infectée ou du pathogène par phagocytose) [86, 87].

Immunité adaptative

L'immunité adaptative ou acquise nécessite un contact préalable avec l'agent microbien en cause et fait intervenir les lymphocytes B, T et NKT.

Il existe trois grands lignages de lymphocytes chez l'Homme et la souris, utilisant des récepteurs recombinants pour la surveillance de leur environnement et la mise en jeu de la réponse de l'hôte : les lymphocytes B, les lymphocytes $T\alpha\beta$ et les lymphocytes $T\gamma\delta$. Les lymphocytes B sont responsables de l'immunité humorale par la synthèse d'anticorps ou immunoglobulines (Ig), dont il existe plusieurs types (IgA, D, E, G et M principalement) ; ils existent sous forme de lymphocytes B naïfs, c'est-à-dire n'ayant pas encore rencontré l'antigène, mais également de lymphocytes B mémoires, capables de produire rapidement un anticorps de haute affinité en cas de nouvelle rencontre avec un antigène connu. Plus récemment, on a également mis en évidence l'existence de lymphocytes B régulateurs, qui peuvent inhiber la différenciation des lymphocytes proinflammatoires de type Th1, Th2 et Th17 (*cf. infra*) et favoriser la différenciation de lymphocytes T régulateurs (Foxp3+ et TR1) [115].

Les lymphocytes T expriment à leur surface le cluster de différenciation CD3 et le récepteur TCR (T Cell Receptor) qui peut être de deux types : hétérodimère $\alpha\beta$ (très majoritaire) ou hétérodimère $\gamma\delta$. Dans le cas des lymphocytes $T\alpha\beta$, ce récepteur est associé à d'autres marqueurs permettant de définir des sous-populations lymphocytaires : lymphocytes T CD4+ dits helpers, T CD8+ dits cytotoxiques. Les lymphocytes CD4+ naïfs helpers peuvent se différencier à leur tour pour assurer différentes fonctions : lymphocytes Th1, Th2, Th17. Les lymphocytes Th1 (sécrétant de l'interféron (IFN)- γ , de l'interleukine (IL)-2 et du tumor necrosis factor (TNF)- β), Th2 (sécrétant les interleukines IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 et IL-13) et Th17 (sécrétant l'interleukine 17) diffèrent par les chimiokines qu'ils produisent et donc par la réaction immunitaire qu'ils induisent, centrée plutôt sur la

réponse cellulaire ou humorale [114]. Il existe également des lymphocytes T CD4 régulateurs (induced T regs ou iTregs), exprimant la protéine Foxp3 et impliqués dans le contrôle de la réponse immunitaire [80].

Les lymphocytes $T\gamma\delta$ représentent une part variable des lymphocytes T chez l'Homme et la souris, selon le stimulus antigénique en cours et l'organe auquel on s'intéresse. On sait qu'ils ont un rôle dans la clairance du pathogène, la réparation tissulaire, la surveillance tumorale et l'immunorégulation mais leurs fonctions sont moins bien connues que celles des lymphocytes $T\alpha\beta$, en premier lieu du fait de leur moins grande fréquence qui rend leur étude plus difficile. Il a été montré qu'ils ont un rôle dans la défense contre divers pathogènes d'intérêt pour le poumon, dont *Staphylococcus aureus* et *Mycobacterium tuberculosis* [150].

Les cellules NKT sont des cellules NK exprimant également un récepteur des lymphocytes T (TCR), dont les fonctions sont à la frontière entre immunité innée et acquise car ils peuvent être activés par des voies dépendantes ou indépendantes de l'antigène, mais sont également capables de produire des cytokines de type Th1 ou Th2 [63].

Le recrutement des lymphocytes peut se faire par deux grands mécanismes :

- un contact direct avec les cellules présentatrices d'antigènes (CPA), qui sont les cellules dendritiques, les macrophages et les lymphocytes B eux-mêmes. Elles ont pour fonctions principales la capture de l'antigène et sa présentation aux lymphocytes B et T, la maturation cellulaire et l'activation des lymphocytes. Après endocytose médiée par le clathrine, phagocytose ou pinocytose, l'antigène est présenté conjointement avec des éléments du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I ou II [2, 113]. Les CPA présentent également à leur surface des molécules de costimulation participant à l'activation des lymphocytes. Les neutrophiles participent au recrutement des CPA en libérant des ROS (reactive oxygen species), les

contenus de leurs granules de phagocytose et des chimiokines ; ils peuvent ainsi participer au recrutement et à la différenciation des lymphocytes mais ne possèdent pas stricto sensu les caractéristiques des CPA, notamment la capacité à présenter l'antigène accompagné du CMH [131].

- par le biais de chimiokines attirant les lymphocytes, sécrétées par les CPA et les cellules épithéliales, et du système du complément (*cf. supra*).

Dans le cas d'une infection aiguë, l'immunité adaptative est mise en jeu après l'immunité innée, notamment grâce au recrutement des cellules de l'immunité acquise par les cellules de l'immunité innée, dont les cellules dendritiques ; dans le cas d'une infection chronique, la part respective de l'immunité innée et de l'immunité adaptative est moins bien connue et il est probable qu'elles coexistent.

1.1.2 Rôle de l'épithélium respiratoire dans l'immunité

L'épithélium respiratoire tapisse les voies aériennes dans leur ensemble. Celles-ci, à partir des bronches, présentent des divisions régulières sous forme de bronches puis de bronchioles et d'alvéoles. La division bronchique se fait de façon dichotomique chez l'Homme (chaque bronche se divise en deux) et de façon monopodale chez la souris (une grosse bronche donne naissance à plusieurs plus petites) et il existe quelques différences de composition de l'arbre bronchique entre ces deux espèces, notamment du fait de la présence de cartilage uniquement dans la trachée et les bronches lobaires et de l'absence quasi complète de bronchioles terminales chez la souris [57]. Chez ces deux espèces toutefois, l'arbre bronchique est recouvert d'un épithélium composé de plusieurs types cellulaires, essentiellement des cellules ciliées et des cellules mucosécrétantes. L'épithélium respiratoire constitue une des premières lignes de défense de l'organisme. Ceci passe d'une part par une barrière physique, grâce au mucus sécrété par les cellules épithéliales et aux mouvements de l'épithélium cilié (clairance mucociliaire), d'autre part par la synthèse de molé-

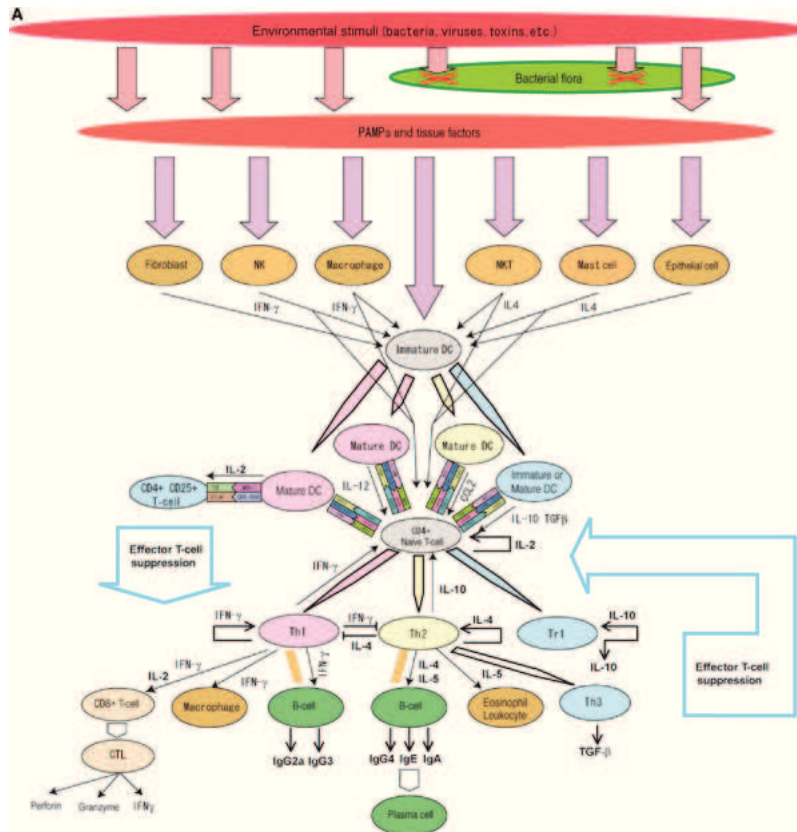


FIGURE 1.1 – Schéma synthétique du système immunitaire. D'après [70]. L'immunité innée y est représentée par les cellules épithéliales, les cellules NKT, les macrophages, les polynucléaires (non représentés ici) et la flore bactérienne commensale. Les cellules dendritiques, à la frontière entre immunité innée et adaptative, sont activées directement par les PAMPs et par les cellules de l'immunité innée ; elles présentent l'antigène aux cellules de l'immunité adaptative qui, une fois activées, se différencient en cellules effectrices (cellules B, cellules T CD4+ Th1 et Th2, cellules T CD8+) et en cellules T et B régulatrices exerçant un rétrocontrôle sur les différentes cellules immunitaires.

cules antimicrobiennes et l'expression de PRRs (*cf.* **figure 1.2**).

Les cellules épithéliales sécrètent des molécules appartenant à différentes classes : enzymes, peptides perméabilisants, opsonines, inhibiteurs de protéases, petites molécules toxiques et macromolécules liant et neutralisant les pathogènes potentiels. Il s'agit essentiellement des défensines, de la lactoferrine, du lysozyme, des collectines, des pentraxines, de l'IL-37, du secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI), du serum amyloid A (SAA)) [66]. Parmi les PRRs, on compte la famille des Toll-like Receptors (TLR) qui comprend à l'heure actuelle 13 récepteurs (*cf.* **tableau 1.1**). Les TLR sont des glycoprotéines membranaires et peuvent être situés directement à la membrane cellulaire ou dans des vésicules intracytoplasmiques selon le PAMP qu'ils reconnaissent. Ce sont des récepteurs transmembranaires de type I comportant 3 éléments : un domaine N-terminal extracellulaire contenant des "leucine rich repeats" (LLRs) permettant la reconnaissance du ligand ; une région transmembranaire ; un domaine C-terminal globulaire TIR (Toll/interleukine-1 receptor, ainsi nommé du fait de la grande homologie entre ces deux récepteurs), permettant la signalisation. Les cellules épithéliales expriment essentiellement les TLR2-6 et peuvent donc reconnaître différents pathogènes viraux et bactériens [66]. Les cellules épithéliales respiratoires sécrètent également des chimiokines dont le B cell activating factor (BAFF), CXCL9, CXCL10, CCL17, CCL20 et CCL22 et peuvent donc induire la migration des cellules B et T de type Th1 et Th2 [66]. La synthèse épithéliale de CCL20 peut être induite par une grande variété de stimuli, comme le Tumor Necrosis Factor (TNF)-alpha, les interleukines (IL)1, IL4, IL13 et IL17 et certains PAMPS dont le dsRNA et le peptidoglycane. L'épithélium respiratoire peut également exprimer des PRRs n'appartenant pas à la famille des TLR, notamment les scavenger receptors, les Retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I)-like receptors (RLRs), les C-type lectin receptors (CLRs) et les Nucleotide binding oligomerization domain (NOD)-like receptors (NLRs) [143].

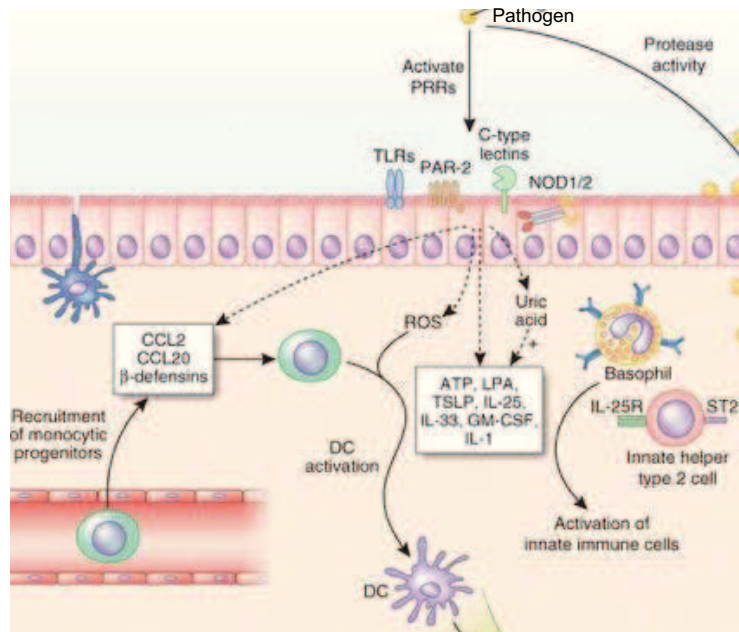


FIGURE 1.2 – **Expression de PRRs par l'épithélium respiratoire.** En présence d'un pathogène, des PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) sont reconnus par les pattern recognition receptors (PRRs) exprimés par l'épithélium, qui sont les récepteurs TLR, NOD, PAR et les lectines de type C. La liaison aux PRRs engendre des cascades de signalisation conduisant au recrutement des cellules immunitaires et à la sécrétions d'oxydants et d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). D'après [75].

Le récepteur à l'épidermal growth factor (EGFR) est exprimé par l'épithélium respiratoire. Ce récepteur est impliqué dans la réponse immunitaire innée à divers stimuli, dont le virus respiratoire syncytial, le lipopolysaccharide (LPS), certaines protéines de *S. aureus*. Cela passe par la liaison à des PRRs comme le récepteur TLR4, qui peut activer le récepteur à l'EGF et induire la production de mucines, la réparation épithéliale et la synthèse d'interleukine 8 conduisant au recrutement de neutrophiles [18]. Il a par ailleurs été montré que la phosphorylation de l'EGFR peut être induite par l'activation des récepteurs TLR2, TLR4 et TLR6. L'activation de la voie EGFR peut, en retour, induire la sécrétion de certaines chimiokines, dont CCL20, qui à son tour favorise la phosphorylation de l'EGFR [69].

L'EGFR appartient à la famille ErbB, formée de 4 récepteurs : EGFR (également appelé ErbB1 et human epidermal growth factor receptor (HER)1), ErbB2/Neu (ou HER2), ErbB3 (ou HER3) et ErbB4 (ou HER4) [18]. La liaison des ligands aux récepteurs ErbB induit une homo- ou une hétérodimérisation et une activation du domaine tyrosine kinase intrinsèque (*cf.* **figure 1.3**). Cette activation entraîne une phosphorylation de certains résidus du récepteur et déclenche la cascade signalétique intracellulaire selon deux voies : la voie Ras-Raf-MEK-ERK et la voie phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-AKT. Parmi les stimuli d'intérêt dans les bronchopathies chroniques et pouvant induire une activation de l'EGFR, on compte des stimuli infectieux bactériens, viraux et fongiques, mais également non infectieux (nicotine, fumée de cigarette) [82].

L'ensemble de ces données laisse présager un rôle pour l'épithélium dans la réponse immunitaire innée et adaptative via diverses voies de signalisation, dont la voie de l'EGFR.

TABLE 1.1 – Récepteurs TLRs exprimés par l'épithélium respiratoire. D'après [27]. La liste des ligands n'est pas exhaustive ; MP : membrane plasmatique ; PGN : peptidoglycane ; dsRNA : ARN double brin ; LPS : lipopolysaccharide.

TLR	Espèce	Localisation	Ligands microbiens
TLR2	Homme/souris	MP	PGN, zymosan, acide lipoteichoïque
TLR3	Homme/souris	Endolysosome	dsRNA viral
TLR4	Homme/souris	MP/endolysosome	LPS
TLR5	Homme/souris	MP	flagelline
TLR6	Homme/souris	MP	zymosan, acide lipoteichoïque

1.1.3 Généralités sur les follicules lymphoïdes

La réponse immunitaire adaptative est initiée dans les organes lymphoïdes secondaires comme la rate et les ganglions. Le rôle de ces organes lymphoïdes se-

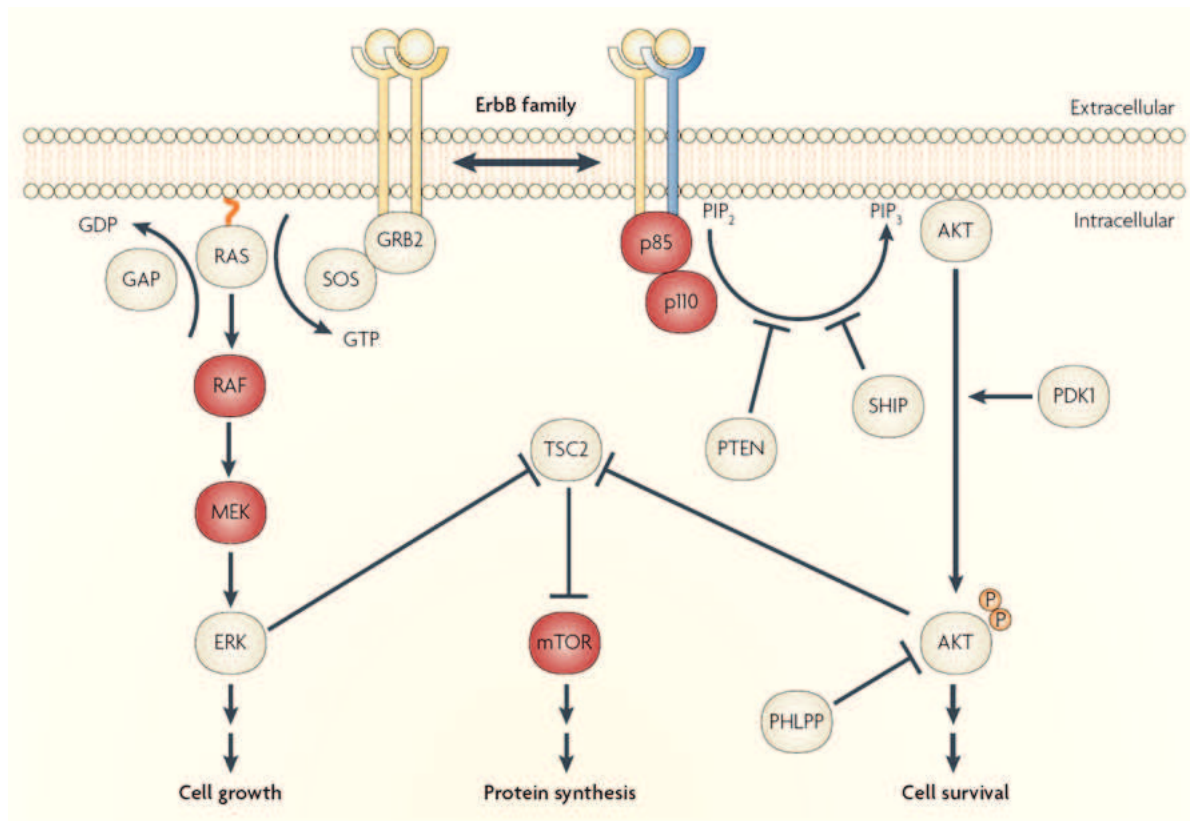


FIGURE 1.3 – Voie de signalisation de l'EGFR. La liaison des ligands induit une homodimérisation (jaune) ou une hétérodimérisation (jaune et bleu) des récepteurs ErbB; deux grandes voies de signalisation cohabitent : la voie Ras-Raf-MEK-ERK et la voie phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-AKT. ERK, extracellular signal-regulated kinase; GRB2, growth factor receptor-bound protein 2; mTOR, mammalian target of rapamycin; SOS, son of sevenless. D'après [67].

secondaires est de favoriser l'interaction entre les cellules présentatrices d'antigènes et les lymphocytes afin d'induire une expansion clonale des lymphocytes B et T qui seront ensuite recrutés sur des sites spécifiques pour y exercer leurs fonctions. Le développement des organes lymphoïdes secondaires a lieu de manière contrôlée et à des localisations précises durant l'embryogenèse [85]. Au cours de la vie, lors d'une stimulation antigénique, des formations lymphoïdes ectopiques peuvent se développer au sein même du poumon [3]. Ce phénomène est appelé néogenèse lymphoïde. Les structures ainsi créées sont dénommées follicules lymphoïdes (terme que nous utiliserons par la suite) ou iBALT (inducible bronchus-associated lymphoid tissue) du fait de leur caractère inductible.

Les follicules lymphoïdes sont absents du poumon humain et murin normal [100]. Leur formation résulte d'un processus dynamique. Les mécanismes de formation de ces organes lymphoïdes tertiaires pourraient se rapprocher pour partie de ceux nécessaires à la formation des organes lymphoïdes secondaires (rate, plaques de Peyer, ganglions, amygdales). Celle-ci implique une interaction entre des lymphocytes spécifiques, les « lymphocytes T inducer » (LT_i, cellules CD45+CD4+CD3- dérivées des progéniteurs hématopoïétiques du foie), et les cellules stromales, à l'origine de la sécrétion des chimiokines homéostatiques CXCL12, CXCL13, CCL19, CCL21 qui vont permettre le recrutement et l'organisation des lymphocytes en follicules (*cf. infra*) [38, 85, 94]. Une différence notable entre les organes lymphoïdes secondaires et tertiaires est toutefois la possibilité d'obtenir des organes lymphoïdes tertiaires matures en l'absence de lymphotoxines, notamment en réponse à l'exposition à la fumée de cigarette ou au virus grippal [28, 92]. Les lymphotoxines alpha et bêta sont des cytokines de la famille du Tumor Necrosis Factor (TNF) qui sont sécrétées par les lymphocytes T et se lient à la surface des cellules à leur récepteur (Lymphotoxin Beta Receptor ou LTBR) sous forme d'hétérotrimère LT $\alpha_1\beta_2$. La présence de ces protéines est indispensable à la formation et au maintien des

organes lymphoïdes secondaires [108].

Lorsqu'ils sont présents, les follicules lymphoïdes sont situés au sein d'un réseau de cellules stromales et présentent plusieurs caractéristiques témoignant de leur caractère fonctionnel [107](*cf.* **figure 1.4**) :

- des zones de lymphocytes B et T séparées ; les clusters de lymphocytes B sont constitués de lymphocytes B matures pouvant proliférer et présentent des centres germinatifs, c'est-à-dire des zones fonctionnelles de production d'anticorps et de commutation isotopique des immunoglobulines ; les lymphocytes B peuvent également se différencier en plasmocytes. Les clusters de lymphocytes T sont souvent moins denses et peuvent contenir d'autres cellules, notamment macrophages et cellules dendritiques ;
- la présence de vaisseaux spécialisés dénommés high endothelial venules (HEV) dont la fonction est de permettre l'entrée des cellules immunitaires naïves au sein du follicule. Ces vaisseaux contribuent par ailleurs à la formation et la persistance du follicule en exprimant des récepteurs aux lymphotoxines [116], des chimiokines comme CCL21 [111] et des molécules d'adhésion, dont la peripheral lymph node addressin PNAd, qui permet le recrutement de lymphocytes naïfs au sein du follicule ;
- la présence de cellules dendritiques folliculaires (FDC) au sein du follicule ; ces FDC sécrètent la chimiokine attractante des lymphocytes B CXCL13. Les cellules dendritiques sont impliquées dans la formation mais également dans la persistance des follicules lymphoïdes. Ainsi, l'instillation intranasale de virus Ankara induit des follicules lymphoïdes en 8 jours mais la déplétion pulmonaire sélective des cellules dendritiques CD11b+CD11c+ entraîne une nette réduction de la taille des follicules [45]. Après une infection par le virus de la grippe, les cellules dendritiques pulmonaires CD11b+CD11c+ isolées sécrètent les chimiokines CXCL12, CXCL13, CCL19 et CCL21 et

la lymphotoxine bêta même après la clairance du virus et il existe une augmentation de l'ARNm de CXCL12, CXCL13, CCL19 et CCL21 dans ces cellules dendritiques [41].

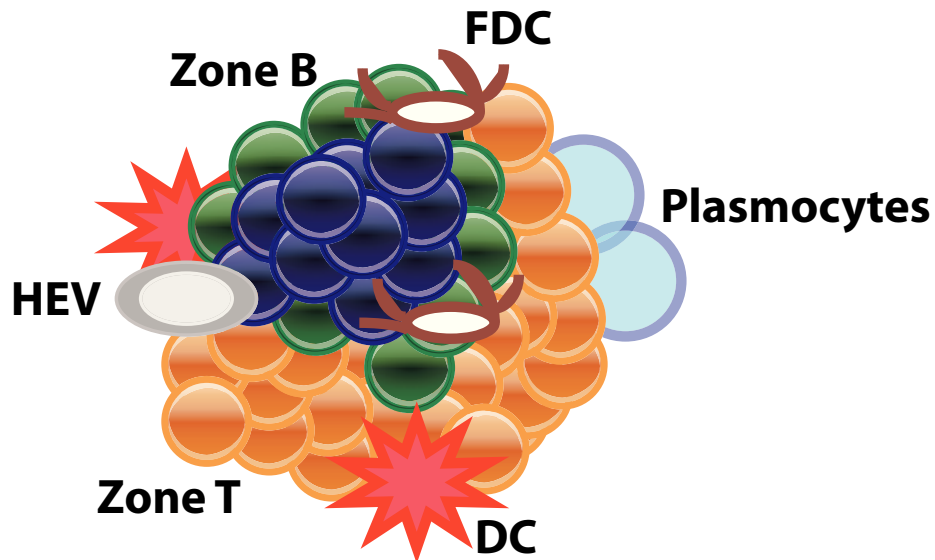


FIGURE 1.4 – Représentation schématique d'un follicule lymphoïde. DC = Cellule dendritique; FDC = Cellule dendritique folliculaire; HEV = High endothelial venule. D'après [149].

Le rôle des follicules lymphoïdes n'est à l'heure actuelle pas connu. En effet, il semble qu'ils participent à l'immunité anti-infectieuse mais il n'existe pas de données sur leur rôle dans les pathologies non infectieuses ni sur leur potentiel rôle néfaste dans l'aggravation des lésions pulmonaires; ainsi, la présence de follicules lymphoïdes chez les patients atteints de BPCO sévère pourrait contribuer à l'inflammation chronique et donc à la destruction des voies respiratoires, possiblement par l'induction de cellules immunitaires et d'anticorps autoréactifs en réponse à l'exposition chronique à des fragments de cellules épithéliales et alvéolaires [50,149], ce d'autant qu'il existe des autoanticorps dans le sérum des patients atteints de BPCO [101]. En revanche, l'induction préalable de follicules lymphoïdes par l'administration d'une protéine non infectieuse (protein cage nanoparticle ou

PCN) accélère la clairance de coronavirus ou de pneumovirus et améliore la survie des souris [145]. De même, l'induction de follicules lymphoïdes par une stimulation avec la bactérie *E. coli* permet une amélioration de la survie lors d'une stimulation ultérieure par le virus grippal à dose subléthale [96]. Il pourrait s'agir d'un rôle protecteur des follicules lymphoïdes, stimulant la réponse immunitaire locale et diminuant la réponse systémique [149]. La **figure 1.5** résume les hypothèses concernant le rôle potentiel des follicules lymphoïdes pulmonaires.

Dans la suite de cette introduction, nous allons détailler les principaux stimuli ayant démontré leur capacité à induire des follicules lymphoïdes et les principales chimiokines mises en jeu dans la formation et le maintien de ces follicules.

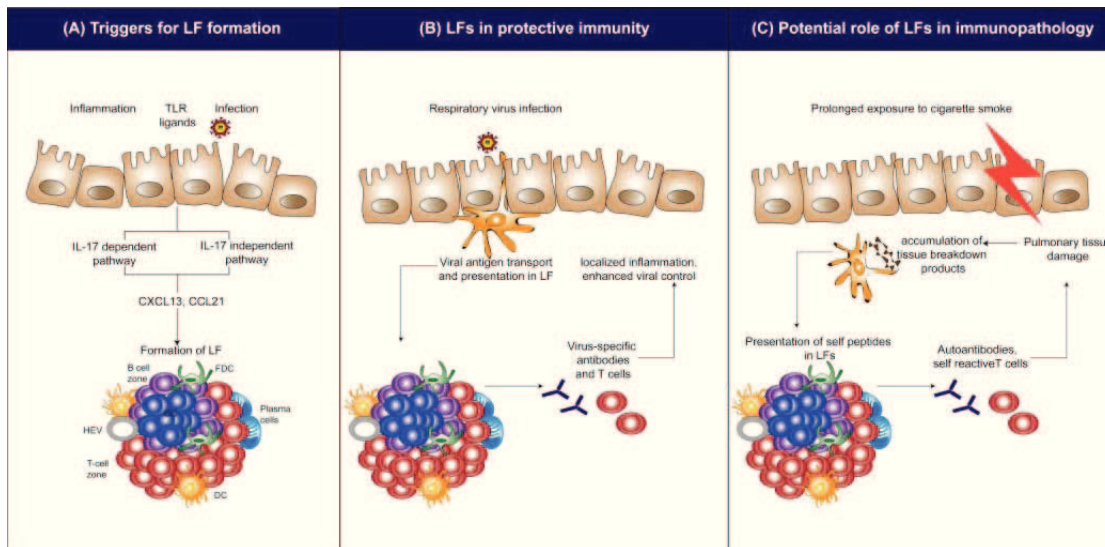


FIGURE 1.5 – Possibles rôles des follicules lymphoïdes. LF= Follicules lymphoïdes ; DC = Cellule dendritique ; FDC = Cellule dendritique folliculaire ; HEV = High endothelial venule. Issu de [149].

1.2 Néogenèse lymphoïde dans les maladies respiratoires

L'existence de follicules lymphoïdes a été montrée dans plusieurs maladies respiratoires chroniques, mais avec des différences importantes entre ces maladies.

Hypertension artérielle pulmonaire (HTAP)

L'HTAP idiopathique (anciennement dénommée HTAP primitive) est définie par la survenue d'une hypertension pulmonaire en l'absence d'une affection associée [90]. Il s'agit d'une maladie touchant les artères pulmonaires de petit calibre, entraînant une augmentation progressive des résistances artérielles pulmonaires et une défaillance ventriculaire droite. Histologiquement, l'artériopathie plexiforme, lésion vasculaire caractéristique de l'HTAP, associe une hypertrophie de la média, une fibrose de l'intima, des lésions plexiformes et des thromboses organisées et recanalisées. 10 à 30 % des cas sont liés à la mutation du gène *bmpr2*. La dyspnée d'effort est le signe le plus souvent retrouvé, présent chez plus de 95% des patients, d'apparition en règle générale progressive et souvent négligée, expliquant le fréquent retard à la prise en charge (environ 2 ans entre le début des symptômes et le diagnostic). Le cathétérisme droit est le seul examen permettant d'affirmer le diagnostic d'HTAP, avec une pression artérielle pulmonaire (PAP) moyenne supérieure à 25 mmHg au repos ou supérieure à 30 mmHg à l'effort en l'absence d'élévation de la PAP d'occlusion.

L'étude d'explants de patients atteints d'hypertension artérielle pulmonaire (n=21) met en évidence la présence d'agrégats lymphoïdes en nombre significativement augmenté par rapport aux patients contrôles (n=21) et aux patients atteints de syndrome d'Eisenmenger (hypertension pulmonaire compliquant l'évolution de certaines cardiopathies congénitales, n=5) [104]. Ces agrégats lymphoïdes sont situés

autour des lésions de remodelage vasculaire caractéristiques de l'hypertension artérielle pulmonaire (*cf.* **figure 1.6**) mais sont variables en taille et en composition, avec des agrégats ne contenant que des lymphocytes et des agrégats correspondant à des follicules lymphoïdes fonctionnels. Il existe par ailleurs significativement plus de follicules lymphoïdes fonctionnels chez les patients non mutés pour *bmpr2* comparativement aux patients mutés (n=7 dans chaque groupe).

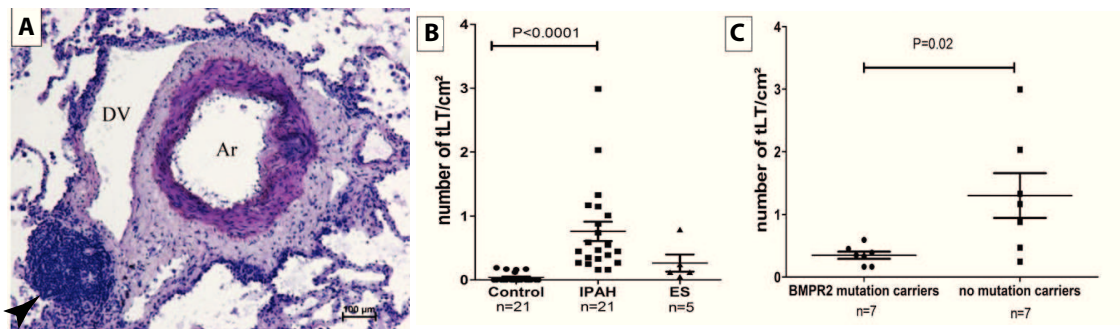


FIGURE 1.6 – Follicules lymphoïdes dans l’hypertension artérielle pulmonaire idiopathique (HTAP). A) L’étude d’explants pulmonaires de patients atteints d’HTAP montre la présence de follicules lymphoïdes (tête de flèche) autour des lésions vasculaires (Ar, DV). B) La quantification des follicules montre qu’ils sont quasi absents chez les sujets contrôles (gauche) et significativement plus fréquents dans l’HTAP (IPAH, milieu) que dans le syndrome d’Eisenmenger (ES, droite). C) Les patients mutés pour *bmpr2* (gauche) présentent significativement moins de follicules lymphoïdes que les patients non mutés (droite). D’après [104].

Fibrose pulmonaire idiopathique (FPI)

La FPI est une maladie chronique progressive et irréversible. il s’agit d’une maladie sévère, dont la médiane de survie ne dépasse pas 3 ans. Elle représente, en fréquence et gravité, la première des pneumopathies infiltrantes diffuses idiopathiques [25] et débute en majorité entre 60 et 70 ans. La prévalence a été évaluée aux Etats-Unis entre 14 et 28/100 000 personnes, ce qui correspondrait à un minimum de 9000 patients en France, et une incidence entre 6,8 et 8,8/100 000 par an, soit un minimum de 4400 nouveaux patients par an en France [25]. Le

diagnostic est retenu soit sur un aspect scanographique typique, associé à l'exclusion d'une autre cause de pneumopathie infiltrante diffuse, soit sur la présence en anatomopathologie d'une pneumopathie interstitielle commune [25]. L'étude de Marchal-Somme et coll. a porté sur des poumons de 12 patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique et a étudié deux types de spécimens : des explants pulmonaires et des fragments de biopsies pulmonaires chirurgicales. Tous les patients inclus dans l'étude présentaient des lésions caractéristiques de FPI et un trouble ventilatoire restrictif aux EFR, sans que la sévérité de l'atteinte fonctionnelle ne soit précisée dans l'article. L'étude immunohistochimique des spécimens retrouve des follicules lymphoïdes autour des lésions de fibrose alvéolaire, à proximité des vaisseaux pulmonaires [79]. Ces follicules présentent des zones B CD20+ et T CD3+ distinctes, des cellules dendritiques folliculaires CNA42+, mais peu de centres germinatifs toutefois, ceux-ci ayant été marqués dans l'article par l'antigène Ki67 (*cf. figure 1.7*). Ces résultats sont légèrement discordants avec ceux de l'étude de 2006 de Rangel-Moreno, qui a porté sur des biopsies pulmonaires de patients atteints de pneumopathie infiltrante diffuse d'étiologies variées. Au sein du groupe de 7 patients présentant en histologie une pneumopathie intersituelle commune, aucun n'avait de cellules dendritiques folliculaires (marquées par un anticorps dirigé contre le CD21) et seuls 4 avaient des centres germinatifs au sein des follicules lymphoïdes, mais ceux-ci avaient été marqués cette fois-ci par un anticorps dirigé contre le PCNA [110].

Bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO)

La BPCO est une cause très importante de morbidité et de mortalité dans le monde, puisqu'on estime qu'elle touche 65 millions de personnes et qu'elle deviendra la troisième cause de décès en 2030 [98]. La première cause en est le tabagisme actif, mais il existe également des causes environnementales et professionnelles.

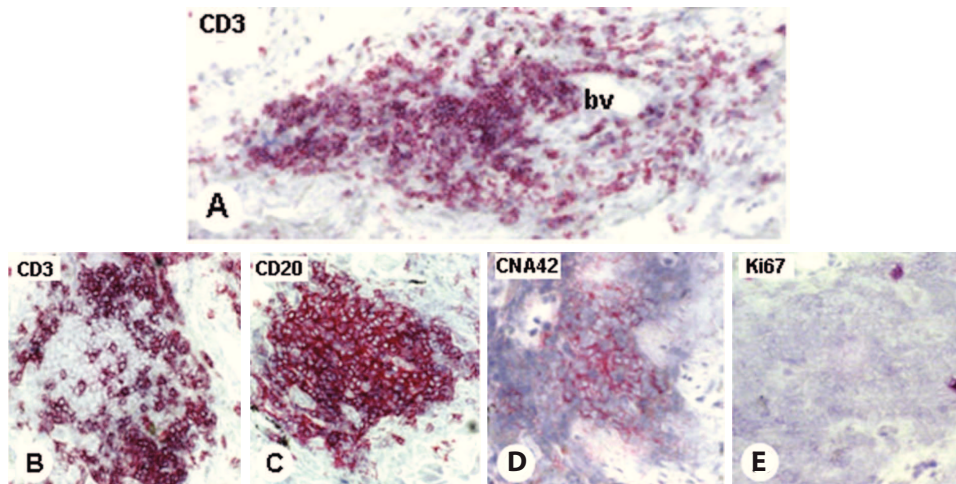


FIGURE 1.7 – Follicules lymphoïdes dans la fibrose pulmonaire idiopathique (FPI). A) L'étude d'explants pulmonaires de patients atteints d'HTAP montre la présence d'agrégats de lymphocytes T CD3+ autour des vaisseaux (bv). B)-E) Ces agrégats de lymphocytes T CD3+ (B) sont associés à des agrégats de lymphocytes B CD20+ (C) situés dans des zones distinctes et à des cellules dendritiques folliculaires CNA42+ (D). Il existe un marquage faible pour le Ki67, marqueur des centres germinatifs (E). D'après [79].

Elle se caractérise cliniquement par une dyspnée d'effort progressive, associée chez certains patients à une bronchite chronique, avec une toux et une expectoration persistantes. Elle peut à terme se compliquer d'insuffisance respiratoire chronique. En parallèle de cette évolution chronique, les patients peuvent présenter des exacerbations de la maladie dont les facteurs déclenchants sont variés (infection virale ou bactérienne, exposition à des irritants dont le tabac) qui contribuent à l'aggravation de la pathologie. Les explorations fonctionnelles respiratoires (EFR) retrouvent un trouble ventilatoire obstructif non ou incomplètement réversible ; la sévérité de la maladie peut être déterminée entre autres par la classification GOLD, qui prend en compte le VEMS (volume expiré maximal pendant la première seconde) et la fréquence des exacerbations. Dans la BPCO, *Pseudomonas aeruginosa* n'est responsable que de 5 à 10% des exacerbations infectieuses mais ce taux est 6 fois supérieur chez les patient les plus sévères (VEMS <50%) [88, 95, 127].

Du fait de sa fréquence et de sa gravité, elle est responsable de coûts importants, liés directement aux soins en état stable et en exacerbation, aux hospitalisations, mais également à l'arrêt, temporaire ou permanent, de l'activité professionnelle. En France, la BPCO représente la deuxième indication de transplantation pulmonaire [1].

La BPCO se caractérise par une obstruction progressive et permanente des voies aériennes liée à un remodelage des voies aériennes distales et du parenchyme pulmonaire (emphysème). La plupart des cellules inflammatoires ont été retrouvées en excès dans les voies aériennes des patients atteints de BPCO (lymphocytes T CD4+, CD8+, B, cellules dendritiques, polynucléaires neutrophiles et éosinophiles, et mastocytes) et une réponse inflammatoire persistante et exagérée est supposée être impliquée dans le remodelage (cf **figure 1.8**) [81].

L'étude de biopsies bronchiques ou de pièces de résection chirurgicale de patients fumeurs montre significativement plus de lymphocytes T CD8+ chez les patients présentant une BPCO par rapport aux patients fumeurs sans obstruction bronchique ou aux patients non fumeurs, et cette infiltration est inversement corrélée au VEMS, y compris chez les patients ayant une obstruction bronchique modérée [99, 117, 118].

Plusieurs études font état de la présence d'agrégats lymphoïdes dans la BPCO [50, 139]. L'étude de Hogg et coll a porté sur des patients fumeurs présentant soit une tumeur pulmonaire (spécimen obtenu lors de la chirurgie de résection) soit un emphysème (patients inclus dans l'étude National Emphysema Treatment Trial ou NETT) et a inclus uniquement des patients ayant une BPCO de stade GOLD 0 (VEMS normal) à 4. Sur les 159 patients, 25% étaient GOLD 0, 25% étaient GOLD 1, 13% GOLD 2, 10% GOLD 3 et 27% GOLD 4; tous les patients de stade GOLD 3 et 4 ont été inclus via l'étude NETT. Ces agrégats, constitués de zones

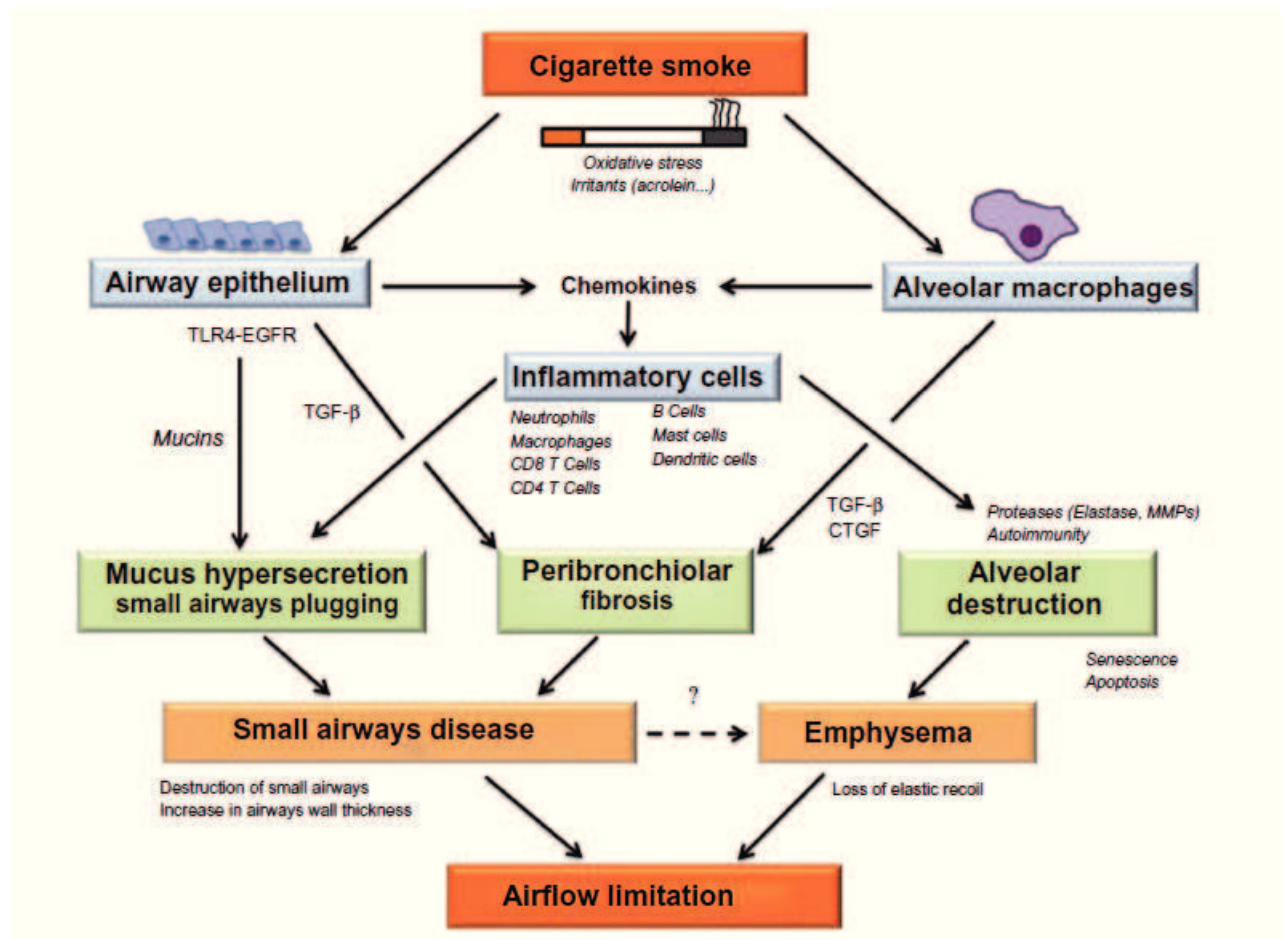


FIGURE 1.8 – Mécanismes potentiels menant aux anomalies structurales des petites voies aériennes et alvéoles en réponse au tabac. EGFR, epidermal growth factor receptor ; TGF-bêta, transforming growth factor ; TLR-4, toll-like receptor-4 ; CTGF, connective tissue growth factor ; MMPs, matrix metalloproteinases. D'après [81]

de lymphocytes B et T CD4+ et CD8+, ne sont présents que chez les patients ayant une BPCO sévère (stade GOLD 3 ou 4) et sont situés sous l'épithélium bronchique (*cf. figure 1.9*). Les auteurs font état de la présence de centres germinatifs au sein de la zone de lymphocyte B, sans toutefois que le marqueur utilisé pour les mettre en évidence ne soit précisé dans l'article. La présence de follicules lymphoïdes uniquement chez les patients ayant une BPCO sévère semblait confirmée par l'étude de Van Pottelberge et coll., qui a comparé des sujets témoins non fumeurs, fumeurs n'ayant pas de BPCO et fumeurs atteints de BPCO. Il existait des agrégats lymphocytaires constitués de zones séparées de lymphocytes B et T, au sein desquels on trouvait également des cellules dendritiques plasmacytoïdes. Ces agrégats n'étaient toutefois présents en quantité significative que chez les patients ayant une BPCO de stade GOLD 3 et 4, qui représentaient 19% des patients de l'étude, contre 38% pour les patients GOLD 1 et 2. L'étude de Litsiou et coll. a porté sur des patients atteints de BPCO de sévérité variable mais dont la moitié environ étaient en stade GOLD 2 (BPCO modérée); les auteurs mettent en évidence la présence de follicules lymphoïdes (définis dans l'étude uniquement par des agrégats de lymphocytes B et T) également chez les patients ayant une BPCO modérée, mais en nombre beaucoup plus faible. Ces follicules présentent une expression intense de la chimiokine CXCL13 et de la lymphotoxine alpha. La présence de follicules lymphoïdes chez les patients ayant une BPCO modérée est confirmée par les données plus récentes de Polverino et coll. [106]. Cette étude a comparé des sujets non fumeurs (n=5), fumeurs sans BPCO (n=5), et atteints de BPCO (n=19, VEMS moyen dans l'étude à 45% de la valeur prédite); les follicules lymphoïdes ont été définis par la présence de lymphocytes B et T (CD4+ et CD8+) dans des zones séparées, de cellules dendritiques folliculaires, mais la présence de centres germinatifs n'a pas été étudiée. Les auteurs mettent en évidence la présence de follicules lymphoïdes chez l'ensemble des sujets de l'étude, mais en nombre plus

important chez les patients ayant une BPCO que chez les sujets non fumeurs ou fumeurs sans BPCO, au niveau du parenchyme, autour des parois vasculaires et bronchiques. Les follicules lymphoïdes retrouvés chez les patients ayant une BPCO présentent plus fréquemment des centres germinatifs, témoignant de leur caractère fonctionnel, que les follicules observés chez les sujets n'ayant pas de BPCO (16% des follicules dans la BPCO, versus 11% chez les sujets fumeurs sans BPCO et 0% chez les sujets non fumeurs). Chez les patients les plus sévères (GOLD 4), les follicules lymphoïdes sont significativement plus importants en nombre et en taille que chez les patients GOLD 1 ou 2 et il existe significativement plus de cellules marquant le B-cell activating factor (BAFF, chimiokine des lymphocytes B) au sein des follicules lymphoïdes chez les patients GOLD 4, tandis que chez les patients GOLD 1 ou 2 on retrouve plus fréquemment des cellules apoptotiques.

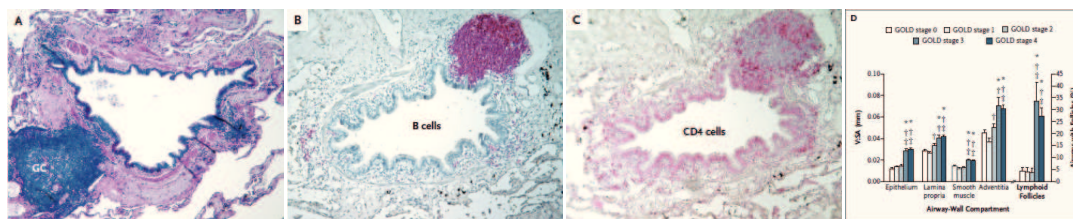


FIGURE 1.9 – Agrégats lymphoïdes dans la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO). L'étude de poumons de patients atteints de BPCO met en évidence la présence de centres germinatifs (A, marqueur non précisé par les auteurs), au sein d'une zone de lymphocyte B CD20+ (B), et une zone de lymphocyte T CD4+ (C). L'étude histomorphométrique (D, histogrammes de gauche) montre que ces agrégats ne sont présents que chez les patients les plus sévères (stade GOLD 3 et 4). Issu de [50].

Asthme

L'asthme est une maladie bronchique chronique qui touche plus de 10 millions de personnes de moins de 40 ans en Europe ; en France, 3,5 millions de personnes présentent un asthme dont 1/3 d'enfants, ce qui en fait un véritable problème de

santé publique. Il existe des prédispositions génétiques à l'asthme, souvent dans un contexte d'atopie, mais ces facteurs génétiques n'expliquent pas à eux seuls la survenue de l'ensemble des cas d'asthme. L'atopie est retrouvée chez 80% à 90% des enfants et chez 30% à 50% des adultes asthmatiques. En l'absence de contrôle approprié de l'asthme par les traitements, il existe un remodelage bronchique qui peut être responsable à long terme d'une insuffisance respiratoire chronique. Environ 10% des patients ont un asthme sévère, non ou difficilement contrôlé par le traitement. Les EFR retrouvent cette fois-ci un trouble ventilatoire obstructif réversible.

Une série autopsique a comparé les agrégats lymphoïdes présents chez des patients témoins, fumeurs, atteints d'asthme fatal ou non fatal [31]. Chez les patients asthmatiques, il existe significativement plus d'agrégats lymphoïdes, situés sous l'épithélium, et ces agrégats comprennent plus de structures vasculaires que chez les sujets témoins et fumeurs ; ces agrégats prédominent dans les voies aériennes proximales. Les auteurs n'ont toutefois pas caractérisé ces agrégats et il n'est donc pas possible d'affirmer qu'il s'agit de follicules lymphoïdes fonctionnels.

Déficit immunitaire commun variable (DICV)

Une seule étude à ce jour a fait état de follicules lymphoïdes dans le DICV, un groupe hétérogène de maladies caractérisées par une hypogammaglobulinémie de cause inconnue avec déficit de production d'anticorps spécifiques après immunisation, provoquant des infections bactériennes récidivantes, en général par bactéries encapsulées. La prévalence est estimée à 1/25 000 dans la population d'origine européenne ; la plupart des cas sont sporadiques mais 20% environ seraient familiaux à transmission autosomique dominante (80%) ou autosomique récessive (20%). Dans le DICV, les follicules semblent plus variables en composition, avec une prédominance de cellules B ou T selon les patients ; ils sont également situés

sous l'épithélium mais peuvent s'accompagner de pneumonie organisée réactionnelle [78].

Dysfonction chronique de greffon pulmonaire

Des follicules lymphoïdes ont été observés dans les explants de patients transplantés pulmonaires présentant un rejet chronique [124]. Les prélèvements ont été obtenus au moment de la retransplantation, avec des patients ayant donc probablement une maladie sévère, même si les auteurs ne donnent pas d'information sur la fonction respiratoire. Il faut souligner par ailleurs que la dysfonction chronique du greffon est une pathologie hétérogène comportant des formes de type bronchiolite oblitérante (Bronchiolitis Obliterans Syndrome ou BOS) et des formes de type restrictif (Restrictive Allograft Syndrome ou RAS). Ces follicules sont de répartition diffuse dans le poumon, mais essentiellement péribronchovasculaire (46% des follicules). Ils comprennent des zones de lymphocytes B et de lymphocytes T séparées, avec des lymphocytes T mémoires effecteurs CD45RO+, des cellules dendritiques folliculaires, des centres germinatifs et des HEV, et présentent donc les caractéristiques de follicules lymphoïdes fonctionnels. Les auteurs ont également réalisé des prélèvements successifs par biopsies transbronchiques chez des patients transplantés et ont retrouvé l'apparition d'HEV au fil du temps, significativement plus importante chez les patients développant une dysfonction chronique du greffon.

Ainsi, si des agrégats lymphoïdes ont été constatés dans plusieurs maladies respiratoires, leur localisation est différente d'une maladie à l'autre et semble coïncider avec le siège préférentiel de l'atteinte respiratoire correspondante (parenchymateuse, vasculaire ou bronchique) et l'ensemble des caractères des follicules lymphoïdes fonctionnels n'a pas été systématiquement étudié dans toutes les études.

Cela suggère un rôle et des mécanismes de formation différents d'une maladie à l'autre.

1.3 Stimuli induisant une néogenèse lymphoïde intrapulmonaire

Divers stimuli sont capables d'induire une néogenèse lymphoïde intrapulmonaire chez l'animal. On peut les classer en deux groupes : les stimuli non infectieux et les stimuli infectieux.

1.3.1 Stimuli non infectieux induisant une néogenèse lymphoïde pulmonaire

Dans l'étude de Bracke et coll., des souris ont été exposées de façon répétée à la fumée de cigarette selon un protocole standardisé : exposition de 10 animaux dans une cage à la fumée de 5 cigarettes de référence, 4 fois par jour avec un intervalle libre de 30 minutes entre chaque exposition, 5 jours par semaine. Cette exposition pendant 24 semaines est suffisante pour induire une néogenèse lymphoïde chez la souris [12]. Cette néogenèse est dépendante de la lymphotoxine alpha [28].

L'inhalation 5 jours sur 7, 7 heures par jour, de particules de diesel pendant 3 mois, à forte dose (3 mg/m^3), induit la présence d'agrégats de lymphocytes B et T, ces derniers étant situés à la périphérie des agrégats de lymphocytes B [48]. Il n'y a pas eu dans cette étude de recherche de cellules dendritiques folliculaires ou de centres germinatifs, en revanche les agrégats sont constatés chez deux souches de souris différentes (Balb/c et C57BL/6). Cela s'accompagne d'une augmentation de la quantité d'ARNm des cytokines TNF- α , IL-12p40, IL-4 et IL-10 dans le poumon total. L'exposition à de plus faibles concentrations de particules n'induit

pas la formation de ces agrégats lymphoïdes.

Dans l'étude de Baay-Gunzman et coll., la néogenèse lymphoïde a été étudiée dans un modèle d'asthme induit par l'ovalbumine chez la souris Balb/c. Ce modèle comporte deux phases expérimentales : une sensibilisation préalable par injection intrapéritonéale d'ovalbumine associée à de l'aluminium à J1 et J5, puis une semaine plus tard (J12) une phase de stimulation antigénique ("challenge") par instillation intratrachéale d'ovalbumine, répétée à J22. Chez les animaux sacrifiés à J26, il existe des agrégats lymphoïdes, situés sous l'épithélium bronchique et exprimant la chimiokine CXCL13 [7].

Une étude de 2013 ayant utilisé des souris C57BL/6 atteintes d'arthrite auto-immune a montré l'existence chez ces souris de follicules lymphoïdes [128]. Ce modèle repose sur un croisement entre des souris K/BxN et des souris disposant d'une mutation activatrice (knock-in) d'un récepteur BCR de haute affinité pour glucose-6-phosphate isomérase (GPI), une enzyme impliquée dans la glycolyse. L'expression d'un transgène KRN T-cell receptor (TCR), qui reconnaît un auto-allèle de la GPI présenté par le CMH de classe II, active les cellules T et B et conduit au développement d'une arthrite spontanée associée à des lésions pulmonaires. Ces lésions pulmonaires sont constituées d'agrégats de lymphocytes B et T en zones distinctes et contiennent des centres germinatifs. Elles ne sont pas présentes chez les souris K/BxN ou les souris ayant la mutation activatrice du BCR seule, soulignant la coopération nécessaire entre lymphocytes B et T pour la formation des follicules lymphoïdes. De façon intéressante, ces souris sont protégées de la fibrose pulmonaire induite par l'instillation intratrachéale de bléomycine. Cela rejoint les données de l'étude de Trujillo et coll., qui a mis en évidence une fibrose pulmonaire moindre chez les souris déficientes pour CCR7 traitées avec de la bléomycine en comparaison aux souris C57BL/6 sauvages, alors même que l'intensité du recrutement des fibrocytes est identique à celle des souris sauvages ; les souris déficientes

présentent spontanément des follicules lymphoïdes fonctionnels autour des grosses bronches et artères, mais ces follicules ne semblent pas augmenter en taille ou nombre 21 jours après une exposition intratrachéale à la bléomycine, qui provoque plutôt une inflammation endoalvéolaire, et sont associés à la présence intrapulmonaire précoce et prolongée de cellules T régulatrices Foxp3+ [71,133]. Cette étude a été réalisée avec un modèle de fibrose pulmonaire à la bléomycine dans lequel les animaux reçoivent une instillation intratrachéale unique de bléomycine et sont sacrifiés à différents temps entre J3 et J21 après l'instillation.

Enfin, l'étude du rejet chronique de transplantation orthotopique de trachée et de poumon chez le rat Lewis montre l'existence de follicules lymphoïdes constitués de zones de lymphocytes B et de zones de lymphocytes T contenant des HEV autour des petites voies aériennes, 21 jours après la transplantation [123].

1.3.2 Stimuli infectieux induisant une néogenèse lymphoïde pulmonaire

Parmi les stimuli infectieux, il faut distinguer les extraits d'agents microbiens des agents microbiens entiers (inactivés ou vivants).

Extraits microbiens

Dans l'étude de Huvenne et coll., l'administration endonasale d'entérotoxine B de *S. aureus* (0,5 µg tous les deux jours pendant 12 jours) permet d'obtenir chez la souris une néogenèse lymphoïde en 4 semaines seulement lorsqu'elle est combinée à une exposition à la fumée de cigarette (exposition à la fumée de 5 cigarettes de référence 4 fois par jour, 5 jours par semaine), tandis que l'exposition à la fumée de cigarette seule ne provoque l'apparition d'amas lymphoïdes peu denses qu'en cas

d'exposition chronique (6 mois), sans zones B et T séparées [56]. Ainsi, l'adjonction d'un stimulus bactérien pourrait être responsable d'une majoration de l'inflammation induite par un stimulus non infectieux chez l'animal, sans pour autant que les auteurs aient pu déterminer quels antigènes étaient en cause. Il n'y a toutefois pas d'étude publiée à ce jour ayant utilisé du *Staphylococcus aureus* vivant chez l'animal.

Dans l'étude de Vernooy et coll., l'administration intratrachéale bihebdomadaire pendant 12 semaines de lipopolysaccharide (LPS), composant de la paroi des bactéries à Gram négatif (5 μg , dose correspondant à la dose délivrée au poumon par 25 cigarettes), induit l'apparition d'un infiltrat de lymphocytes B, T CD4+ et T CD8+ autour des voies aériennes, mais sans organisation en zones distinctes, ne permettant pas de parler de follicules lymphoïdes [141]. Cet infiltrat persiste néanmoins au moins 8 semaines après la fin de l'exposition au LPS alors que l'infiltrat alvéolaire de macrophages diminue après la fin de l'exposition. Rangel-Moreno et coll. ont étudié les effets du LPS à différents stades de la vie chez la souris (5 instillations à raison d'une instillation tous les deux jours, par voie intranasale, à des doses comprises entre 1 et 10 μg), et en combinaison avec un stimulus viral (virus de la grippe) [109]. Le développement de follicules lymphoïdes organisés (zones B et T séparées, présence de cellules dendritiques folliculaires) n'est observé qu'en cas d'instillation préalable de LPS chez le nouveau-né associée à une infection unique par le virus grippal à 6 semaines de vie ou à une nouvelle administration répétée de LPS à 8 semaines de vie. Ces follicules s'observent 3 semaines après le dernier stimulus par LPS ou l'infection par le virus de la grippe. L'administration endonasale de LPS seul chez la souris âgée de 6 semaines induit uniquement l'apparition d'agrégats de lymphocytes sans organisation en follicules lymphoïdes ; de même, l'administration répétée de LPS chez la souris plus âgée (au delà de 2 semaines de vie) avant une infection par le virus grippal ne permet pas l'obtention de follicules

lymphoïdes organisés. Les auteurs n'ont pas pratiqué d'infection par une bactérie totale.

Agents microbiens entiers

Dans les études sur des modèles d'infection chronique à *Pseudomonas aeruginosa* chez la souris C57BL/6, les colorations par l'hématoxyline/éosine montrent la présence d'un infiltrat inflammatoire péribronchique après 14 jours d'infection par une souche clinique mucoïde ou par la souche de laboratoire PAO1, mais il n'y a pas eu à ce jour de caractérisation détaillée de cet infiltrat ; certaines souches de *Pseudomonas aeruginosa* induisent plutôt une infection aiguë avec une mortalité importante qu'une infection chronique, d'autres au contraire (souche BT dérivée de la souche PA14) induisent uniquement une infection chronique avec une faible mortalité. Ces études utilisent souvent des billes d'agarose de petite taille (100 à 200 μm chez la souris), et l'étude par immunohistochimie montre que 2 semaines après une instillation unique de billes contenant du *P. aeruginosa*, les bactéries persistent dans les billes situées dans les petites bronches, et dans les alvéoles sous forme de macrocolonies [13].

Dans un modèle murin d'infection intranasale à *Mycoplasma pulmonis* (application de 25 μL dans chaque narine d'une solution contenant 10^6 CFU), il existe en 14 jours un développement de follicules lymphoïdes associé à un développement à proximité des vaisseaux et sous l'épithélium bronchique [10]. *Mycoplasma pulmonis*, bactérie intrapulmonaire, n'est toutefois pas une espèce classiquement pathogène chez l'Homme.

L'administration de *Mycobacterium tuberculosis* sous forme d'un aérosol unique (100-200 CFU par animal) permet de créer une infection pulmonaire chronique se prolongeant au moins pendant 120 jours. Dans l'étude de Kahnert et coll., l'analyse immunohistochimique a permis de mettre en évidence des follicules lymphoïdes dès

J42 post infection, contenant des zones B et T séparées et des cellules dendritiques folliculaires [65]; ces follicules persistent jusqu'à J120 après infection. Ces résultats ont été confirmés par la suite par l'étude de Khader et coll., qui utilise la même souche de *M. tuberculosis* (souche H37Rv), administrée par aérosol [68]. Ces données expérimentales chez l'animal sont par ailleurs concordantes avec les observations anatomopathologiques d'Ulrichs et coll., qui avaient constaté la présence d'amas évocateurs de follicules lymphoïdes autour de la nécrose caséuse des granulomes tuberculeux sur des pièces de résection chirurgicales réalisées en raison de lésions tuberculeuses extensives [136]. Ces amas étaient constitués de zones B et T séparées et portaient l'antigène Ki67, faisant suspecter la présence de centres germinatifs en leur sein.

Enfin, il a été montré qu'un stimulus viral unique (100 unités de virus grippal par voie endonasale) induit en 7 jours la présence de follicules lymphoïdes matures chez les animaux chimériques dépourvus d'organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions et plaques de Peyer), tandis que les souris adultes de souche sauvage infectées de la même façon présentent seulement des amas de lymphocytes B [93]. Notons que les animaux étaient maintenus sous antibiothérapie préventive par cotrimoxazole dans l'étude. L'utilisation du poxvirus MVA (modified vaccinia virus Ankara) permet l'obtention de follicules lymphoïdes fonctionnels après une infection unique (10^7 unités par animal, par voie endonasale), mais il existe également dans les poumons des agrégats de lymphocytes ne présentant pas les caractéristiques de follicules lymphoïdes (cellules B et T agrégées de façon diffuse) [37, 45]. Ce virus ne provoque pas de maladie respiratoire chez l'Homme et présente une immunogénicité élevée.

1.4 Principales chimiokines impliquées dans la néogenèse lymphoïde pulmonaire

Les chimiokines sont des protéines chimiotactiques (c'est-à-dire capables de provoquer la migration cellulaire), de bas poids moléculaire (8 à 10 kDa). Elles sont classées, selon la répartition de leurs résidus cystéines en N-terminal, en 4 groupes : CXC, CC, C et CX3C-. Elles induisent une voie de signalisation intracellulaire en se liant à leur récepteur correspondant. Leur rôle principal est le recrutement et l'activation des leucocytes, mais leurs récepteurs sont exprimés par de nombreuses cellules non hématopoïétiques, au premier rang desquelles les cellules tumorales [8]. Ces récepteurs se divisent en deux grands groupes : des récepteurs transmembranaires couplés aux protéines G (dont CCR7, CXCR4 et CXCR5) et des récepteurs non couplés aux protéines G (dépendants de l'arrestine).

Les chimiokines sont impliquées dans le développement et la persistance des follicules. Les chimiokines CXCL12, CXCL13, IL17, CCL19 et CCL21 semblent impliquées de façon prédominante dans la néogenèse lymphoïde. Il existe toutefois des différences selon le stimulus utilisé pour induire la néogenèse et il semble qu'aucune d'entre elle ne soit indispensable [38].

1.4.1 Chimiokine CXCL13

CXCL13 est chimiotactique des lymphocytes B matures, qui expriment son récepteur CXCR5. Le gène codant pour la protéine CXCL13 est situé sur le chromosome humain 4 et sur le chromosome murin 5. Elle est exprimée de façon constitutive dans les organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions et plaques de Peyer) et sa présence est indispensable au développement embryonnaire de ces organes [34]. Elle a été impliquée dans la formation et la persistance des follicules lymphoïdes intrapulmonaires en réponse à divers stimuli.

CXCL13 et fumée de cigarette

La relation entre l'exposition à la fumée de cigarette et l'expression de CXCL13 a été mise en évidence dans plusieurs études chez l'homme et l'animal.

Dans l'étude de Bracke et coll., il s'agissait de patients âgés en moyenne de plus de 60 ans, à la fonction respiratoire plutôt préservée (VEMS >65% dans le groupe BPCO) [12]. Les auteurs ont constaté une augmentation significative de l'expression de la protéine CXCL13 dans l'expectoration induite et de l'ARNm de CXCL13 dans les pièces de résection chirurgicale chez les patients ayant une BPCO, en comparaison avec les patients non fumeurs. Il existait une augmentation non significative pour les patients fumeurs sans BPCO. Dans cette même étude, l'exposition quasi-quotidienne (5 jours sur 7) de souris à la fumée de cigarette pendant 24 semaines était suffisante pour induire une néogenèse lymphoïde, et un traitement prophylactique (avant exposition à la fumée) ou curatif (pendant l'exposition) par anticorps anti CXCL13 permettait d'inhiber cette néogenèse. Ces résultats vont dans le même sens que ceux de l'étude de Litsiou et coll., qui ont retrouvé des follicules lymphoïdes sur des pièces de résection chirurgicale pulmonaire de patients atteints de BPCO en majorité de classe GOLD I et II, avec une corrélation entre la surface de follicules observée et la concentration en CXCL13 mesurée en ELISA dans l'homogénat des pièces de résection. Ils sont discordants avec les travaux plus anciens de Hogg et coll., qui ne trouvaient de follicules lymphoïdes de façon significative que chez les patients ayant une obstruction bronchique sévère (GOLD III et IV).

Autres stimuli non infectieux

Chez les patients présentant une atteinte interstitielle pulmonaire de polyarthrite rhumatoïde, on retrouve des follicules lymphoïdes autour des vaisseaux et des voies aériennes, mais également sous la plèvre [110]; tous les agrégats lym-

phoïdes ne comportent pas les caractéristiques de follicules lymphoïdes organisés et fonctionnels dans cette étude. CXCL13 est exprimée au sein de ces follicules par les cellules dendritiques folliculaires, mais également par des vaisseaux sanguins situés en dehors du follicule. Aucun des patients inclus dans l'étude ne présentait de dilatation de bronche en imagerie.

Dans l'hypertension artérielle pulmonaire, on constate la présence de follicules lymphoïdes sur les explants pulmonaires de patients (*cf. supra*), associée à une augmentation de l'expression de l'ARNm de CXCL13 et à une expression de la protéine CXCL13 au sein des follicules, notamment par les cellules dendritiques folliculaires [104].

Enfin, l'étude de Baay-Gunzman menée chez la souris, et utilisant le modèle d'exposition à l'ovalbumine détaillé plus haut, retrouvait une augmentation de l'expression de CXCL13 par rapport au groupe contrôle, avec une expression épithéliale, endothéliale et au sein d'agrégats lymphoïdes évoquant des follicules lymphoïdes. Le traitement des souris par anticorps anti CXCL13 permettait de prévenir l'apparition de ces agrégats. En parallèle, les auteurs montraient que la protéine et l'ARNm de CXCL13 étaient augmentés dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire (LBA) de patients asthmatiques atopiques [7].

Stimuli infectieux

Dans l'étude de Kahnert et coll., l'infection par une dose unique de *Mycobacterium tuberculosis* chez la souris s'accompagne d'une néogenèse lymphoïde avec une augmentation progressive de l'expression de l'ARNm CXCL13 et une expression de CXCL13 au sein des follicules (jusqu'à 120 jours post infection) [65]; dans cette étude, il n'existe toutefois pas de colocalisation stricte du marquage pour CXCL13 avec celui des cellules dendritiques folliculaires. Cette expression de CXCL13 semble être sous le contrôle de l'interleukine 23, car dans l'étude de

Khader et coll., utilisant la même souche de *Mycobacterium tuberculosis*, les souris knock-out pour IL23 perdent l'expression de CXCL13 [68].

Une étude récente chez l'animal (Fleige et coll.) a comparé deux stimuli infectieux : l'un viral par le poxvirus MVA (modified vaccinia virus Ankara, application unique intranasale) et l'autre bactérien, avec une souche clinique hypervirulente de *Pseudomonas aeruginosa* (PA14) inactivée par la chaleur (2 applications intranasales à J0 et J6) [37]. Dans les deux cas, l'infection résultait en l'apparition de follicules lymphoïdes pulmonaires, mais seul le virus induisait l'expression de CXCL13.

L'implication de CXCL13 dans la réponse antivirale n'est cependant pas parfaitement établie, car les souris déficientes pour CXCL13 (knock-out CXCL13) présentent des follicules lymphoïdes normaux en nombre et architecture en réponse à une infection intranasale unique par le virus grippal [93, 111].

1.4.2 Chimiochine CXCL12

CXCL12 a pour récepteur principal CXCR4. Il a également été plus récemment montré que CXCL12 peut se lier au récepteur CXCR7 [9], exprimé sur certains lymphocytes B [54]. Le gène codant pour la protéine CXCL12 est situé sur le chromosome humain 4 et sur le chromosome murin 5. CXCL12 est impliquée dans l'adressage aux organes lymphoïdes secondaire des lymphocytes B tant pendant le développement intra-utérin que chez l'adulte. Il existe un antagoniste de CXCR4, le plerixafor (Mobizil), possédant une autorisation de mise sur le marché pour la mobilisation des cellules souches hématopoïétiques avant autogreffe chez les patients atteints d'hémopathie maligne. Un anticorps anti CXCL12 (NOX-A12) est en cours d'étude chez l'Homme.

Stimuli infectieux

L'étude de Fleige et coll. a permis de montrer que la voie CXCL13 n'était pas la seule impliquée dans le recrutement des lymphocytes B au sein des follicules lymphoïdes. Ainsi, l'infection par voie intranasale avec du *Pseudomonas aeruginosa* (PA) souche 14 inactivé par la chaleur et l'infection par le virus MVA induisaient toutes deux une néogenèse lymphoïde pulmonaire avec une expression de CXCL12 au sein des zones B des follicules lymphoïdes [37] ; dans le cas de l'infection à PA14, cette néogenèse était fortement réduite chez les animaux traités par un anticorps anti CXCL12. L'infection à PA14 n'induisait pas, comme nous l'avons vu plus haut, l'expression CXCL13.

Stimuli non infectieux

Il a été montré que les patients présentant un rejet chronique de transplantation pulmonaire présentaient sur les greffons explantés des follicules lymphoïdes associés à une expression épithéliale et stromale de CXCL12 [124]. D'autre part, dans un modèle murin de fibrose pulmonaire, une pathologie s'accompagnant de néogenèse lymphoïde, il a été retrouvé une augmentation de CXCL12 dans le liquide de LBA [132] ; dans l'étude de Perros et coll., contrairement à CXCL13 il n'existait pas d'augmentation de l'ARNm de CXCL12 chez les patients atteints d'HTAP [104].

1.4.3 Interleukine 17

La famille de l'interleukine (IL) 17 comprend 6 membres (IL17-A à IL-17F). L'IL-17A (souvent appelée IL-17) et l'IL-17F sont produites par les lymphocytes T-helper (Th) 17. IL-17A et IL-17F se lient au récepteur hétérodimérique composé des sous-unités IL17RA et IL17Rc, préférentiellement exprimé sur les fibroblastes et les cellules épithéliales [44]. L'IL-17 augmente la production épithéliale de CXCL8

chimiotactique pour les neutrophiles, et augmente la sensibilité des macrophages aux pathogen-associated molecular pattern (PAMPs) [62, 140].

Stimuli non infectieux

Dans les poumons de patients atteints de BPCO, il existe une expression d'IL-17A et d'IL-17F par les lymphocytes, les macrophages et les neutrophiles. Dans l'étude d'Eustace et coll., l'expression d'IL-17F était plus importante que celle d'IL-17A en immunohistochimie dans les follicules lymphoïdes et l'épithélium [32]. Il s'agissait toutefois de patients peu sévères, avec un VEMS moyen supérieur à 60%. Chez la souris déficiente en IL17RA, l'exposition répétée à l'extrait de fumée de cigarette administré par voie intratrachéale pendant 6 mois ne provoque pas d'emphysème, contrairement aux souris sauvages [22].

Stimuli infectieux

L'infection de souris par une dose unique de virus grippal induit une néogenèse lymphoïde associée à une augmentation de la production d'IL-17, sans qu'il soit décrit dans cette étude s'il s'agit d'une cause ou conséquence de la néogenèse lymphoïde [125]. Les données sur l'implication de l'IL-17 dans la néogenèse lymphoïde sont par ailleurs discordantes. Ainsi, les souris déficientes pour IL-17A présentent une réduction en taille et nombre des follicules lymphoïdes par rapport aux souris sauvages en réponse à une administration répétée de LPS (tous les deux jours pendant 10 jours par voie intranasale) [109]. Il existe toutefois probablement d'autres voies nécessaires au développement des follicules lymphoïdes en réponse à un stimulus bactérien car, dans la même étude, les souris déficientes pour le récepteur $ROR\gamma$ présentent une néogenèse lymphoïde normale en réponse au LPS alors que ces souris ont une production d'IL-17 par les cellules T $CD4+\alpha\beta$ et $T\gamma\delta$ très diminuée. En revanche, Fleige et coll. rapportent une néogenèse lymphoïde

normale en réponse à une stimulation unique par le virus MVA chez les souris double-déficientes pour IL-17A et IL-17F [36,37] mais pas après une stimulation répétée (J0 et J6, *cf. supra*) par du *Pseudomonas aeruginosa* inactivé par la chaleur. Dans le cas d'une stimulation par *P. aeruginosa*, à J12, les agrégats formés chez les souris déficientes ne présentent pas de zones B et T séparées ni de cellules dendritiques folliculaires, contrairement aux souris sauvages, et on ne peut donc les qualifier de follicules lymphoïdes [37]. Ces différences pourraient être liées à une orientation différente de la réponse immunitaire selon l'agent microbien en cause (plutôt de type Th1 dans les infections virales versus de type Th17 dans les infections bactériennes), ou à la production résiduelle d'IL17 par les lymphocytes T chez les souris déficientes pour le récepteur ROR γ [36,109].

Dans l'étude de Gopal et coll., l'infection prolongée (au moins 60 jours) a été obtenue par l'administration de *Mycobacterium tuberculosis* en aérosol unique (100 CFU) chez la souris [43]. Chez la souris déficiente pour IL17, la charge bactérienne pulmonaire à J30 et J60 est identique à celle des souris sauvages au fil du temps en cas d'utilisation d'une souche de laboratoire classique de *M. tuberculosis* (H37Rv), mais significativement plus élevée à J30 et J60 en cas d'infection par la souche hypervirulente HN878, qui induit une production d'IL-17 importante et dépendante de TLR-2 et IL-1 β . Les souris déficientes pour IL-17 ont une production de CXCL13 et un nombre de follicules lymphoïdes diminués par rapport aux souris sauvages en réponse à l'infection par la souche hypervirulente; la surexpression pulmonaire d'IL-17 par administration intratrachéale d'un vecteur adénoviral exprimant IL17 permet de diminuer la charge bactérienne pulmonaire au même niveau que celui des souris sauvages, diminue l'infiltrat périvasculaire de lymphocytes T, augmente la surface des agrégats lymphoïdes B et augmente l'ARNm et la protéine de CXCL13.

1.4.4 Chimiockines CCL19 et CCL21

CCL19 et CCL21 ont pour récepteur CCR7, présent notamment sur les cellules dendritiques folliculaires matures, les lymphocytes B et T naïfs. CCL19 est exprimée sur les vaisseaux lymphatiques au sein des zones T des follicules lymphoïdes ; CCL21 est exprimée sur les cellules endothéliales et réticulaires, souvent en périphérie des follicules [93]. Elles ont été impliquées dans la néogenèse lymphoïde extrapulmonaire et notamment le recrutement des lymphocytes B et l'organisation des amas [76]. Les données sur la néogenèse lymphoïde intrapulmonaire sont moins nombreuses.

Le récepteur CCR7 est exprimé à la surface des cellules T régulatrices Foxp3+ et il a été montré que les souris déficientes pour CCR7 présentent spontanément des follicules lymphoïdes pulmonaires dès 5 jours de vie en l'absence de tout stimulus [71]. Le transfert adoptif de cellules T régulatrices sauvages permettait dans cette étude de diminuer le nombre de follicules.

Stimuli non infectieux

Nous avons vu plus haut qu'il existe une néogenèse lymphoïde dans l'hypertension artérielle pulmonaire [104]. Les auteurs retrouvent une augmentation de l'expression de CCL19 et CCL21 en immunofluorescence mais, de même que pour CXCL12, sans augmentation de l'ARNm correspondant. Le marquage observé est essentiellement situé sur les vaisseaux lymphatiques et dans les zones T des follicules.

Stimuli infectieux

Une étude de 2007 montre que la présence de CCL19 et CCL21 est indispensable à la néogenèse lymphoïde induite par le virus grippal car les souris *plt/plt*, qui sont déficientes pour ces deux chimiokines, présentent une nette réduction de

la quantité d'agrégats de lymphocytes B, ces agrégats ne comprenant par ailleurs pas de cellules dendritiques folliculaires [111]. Il n'y avait toutefois pas dans cette étude d'inhibition sélective de CCL19 ou CCL21.

En résumé, les différents stimuli capables d'induire une néogenèse lymphoïde chez l'animal sont associés à des expressions différentielles de chimiokines, ce qui suggère des mécanismes de formation et d'homéostasie différents. La fumée de cigarette et l'exposition à un allergène (ovalbumine) sont liées de façon prédominante à CXCL13 ; dans les infections, le type d'agent microbien, sous réserve de l'utilisation fréquente d'extraits pathogènes ou d'agents inactivés, semble pouvoir dépendre de CXCL12 ou de CXCL13.

1.5 Mucoviscidose et dilatations de bronches

1.5.1 Dilatations de bronches non mucoviscidosiques

Les dilatations de bronches (DDB) non mucoviscidosiques sont définies par une augmentation permanente et irréversible du calibre des bronches dont les fonctions sont altérées, et sont caractérisées par une hypersécrétion bronchique (bronchorrhée), d'intensité variable. Elles représentent un groupe de maladie hétérogène, du fait de la variété des étiologies retrouvées [103]. Les causes les plus fréquentes de DDB sont les séquelles d'infections respiratoires sévères, virales, bactériennes ou mycobactériennes (séquelles de rougeole, coqueluche ou tuberculose notamment). Elles peuvent également être de cause génétique (dyskinésie ciliaire primitive), liées à un déficit immunitaire primitif ou secondaire (Maladie de Bruton, déficit immunitaire commun variable, hypogammaglobulinémie secondaire) ou à une maladie inflammatoire chronique (polyarthrite rhumatoïde, syndrome de Gougerot-Sjögren...). Les manifestations respiratoires peuvent donc être isolées ou s'inscrire

au sein des manifestations générales liées à la pathologie sous-jacente. Les manifestations inflammatoires au niveau pulmonaire peuvent être différentes selon l'existence ou non d'une maladie inflammatoire [110].

1.5.2 Mucoviscidose

La mucoviscidose est une maladie génétique de transmission autosomique récessive. Elle est liée à l'atteinte du gène *cftr* (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) situé sur le chromosome 7, qui code pour un canal chlore et bicarbonate régulé par l'AMP cyclique (AMPC) exprimé au pôle apical des cellules épithéliales. Plus de 2000 mutations ont été identifiées à ce jour, dont la plus fréquente (rencontrée chez près de 70 % des malades en France) est la mutation F508del. Les différentes mutations sont regroupées en 6 classes, selon le défaut qu'elles engendrent : absence totale (mutations de classe I) ou partielle (classe V) de protéine, absence d'adressage à la membrane (classe II), protéine totalement (classe III) ou partiellement (classe IV) non fonctionnelle, protéine instable (classe VI) [5]. Sa prévalence est très variable selon les populations, et en France elle est d'environ 1/4250 naissances. Cette fréquence relativement importante associée au bénéfice d'une prise en charge précoce ont conduit à la mise en place d'un dépistage néonatal systématique depuis 2002.

Le canal CFTR est impliqué dans la régulation du contenu hydrique du mucus respiratoire. Sa dysfonction dans le cadre de la mucoviscidose se traduit par un défaut de clairance mucociliaire lié à un mucus exagérément épais. Ce défaut de clairance entraîne une infection bactérienne très précoce (dès les premiers jours de vie) de l'arbre respiratoire conduisant progressivement à l'apparition des dilatations de bronches, malgré des poumons normaux à la naissance. Il existe en parallèle un important recrutement de cellules inflammatoires au sein des voies aériennes (*cf. infra*). C'est cette atteinte respiratoire qui fait la gravité de la mala-

die et est responsable du décès, par insuffisance respiratoire chronique dans la très grande majorité des cas.

La prise en charge actuelle de l'atteinte respiratoire consiste d'une part à améliorer la clairance du mucus par une kinésithérapie quotidienne voire pluriquotidienne, et des aérosols fluidifiant les sécrétions, d'autre part à traiter précocement et agressivement les infections bactériennes par des antibiothérapies itératives et adaptées aux germes mis en évidence dans l'expectoration. De nouveaux traitements sont par ailleurs commercialisés ou font l'objet de protocoles de recherche, qui permettent de rétablir une activité partielle de la protéine CFTR chez les patients : correcteurs, et potentiateurs de CFTR [5]. L'efficacité de ces traitements est dépendante de la mutation en cause. Malgré une nette amélioration de l'état de santé respiratoire de ces patients, avec une espérance de vie médiane à la naissance actuellement aux alentours de 40 ans [39, 142], la prise en charge actuelle ne permet pas d'éviter l'apparition des dilatations de bronches et du handicap respiratoire. Ainsi, une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques menant à la destruction progressive de l'arbre bronchique est nécessaire. De même que dans la BPCO, il existe une inflammation importante et persistante au sein des poumons des patients atteints de mucoviscidose, et un rôle de cette inflammation est suspecté dans l'aggravation des lésions pulmonaires, mais il n'a pas été mis en évidence de façon certaine à l'heure actuelle [52].

1.5.3 Importance de l'infection bactérienne dans ces pathologies

Dans ces bronchopathies chroniques, l'infection bactérienne tient globalement une place importante. Les bactéries mises en cause ne sont toutefois pas les mêmes

selon la pathologie et le stade évolutif de la maladie. Dans la mucoviscidose, les données des registres nord-américain et français font état d'une prédominance dans l'enfance de la colonisation à *Staphylococcus aureus*, avec plus de 70% des patients colonisés à l'âge de 10 ans ; cette prévalence chute par la suite au profit d'une colonisation de plus en plus fréquente à *Pseudomonas aeruginosa*, dont la prévalence est de moins de 25% avant 10 ans mais dépasse les 50% à partir de 20 ans [39,142]. Ces données microbiologiques sont résumées dans la **figure 1.10**. Dans les DDB, *Pseudomonas aeruginosa* et *Haemophilus influenzae* sont les pathogènes les plus fréquents, atteignant environ 30% des patients [97].

Dans ces bronchopathies, l'infection chronique des voies aériennes par *Pseudomonas aeruginosa* est associée à une morbidité (moins bonne fonction respiratoire et plus grande consommation de soins) et une mortalité plus importantes [42, 89].

Les raisons de la persistance de *Pseudomonas aeruginosa* dans les voies aériennes des patients atteints de bronchopathie chronique sont mal comprises [23]. Dans la mucoviscidose, la bactérie est retrouvée principalement sous forme de macro-colonies situées au sein de bouchons de mucus bronchiques hypoxiques [147]. Il existe par ailleurs des modifications phénotypiques et génotypiques permanentes du *Pseudomonas* : l'étude des expectorations de patients atteints de mucoviscidose au fil du temps a mis en évidence une hypermutabilité avec l'apparition successive de clones de virulence adaptée, ainsi que l'existence de mécanismes d'échappement du *Pseudomonas* au système immunitaire [11, 14].

1.5.4 Mise en jeu de l'immunité dans ces bronchopathies chroniques

Dans la mucoviscidose, les anomalies du mucus induites par la dysfonction de CFTR favorisent la persistance de pathogènes dans l'arbre respiratoire par diminu-

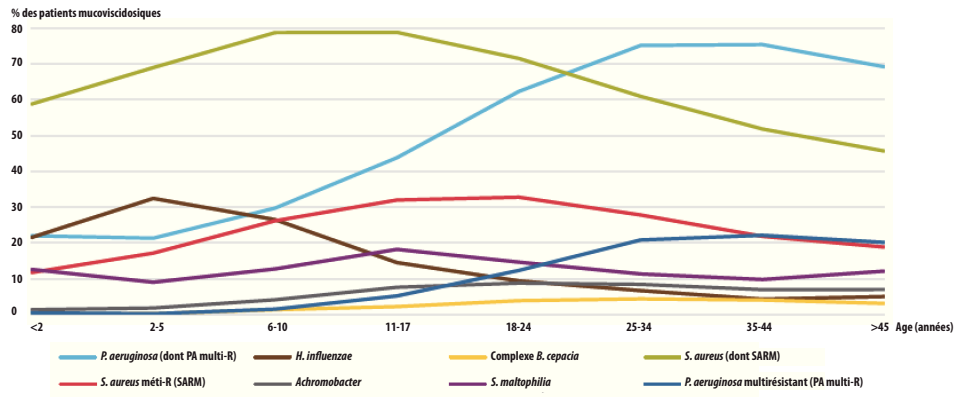


FIGURE 1.10 – Evolution de la colonisation bactérienne selon l'âge dans la mucoviscidose. D'après les données du registre nord-américain de la mucoviscidose

tion de la clairance mucociliaire. De plus, la faible teneur en oxygène des bouchons de mucus contenant des bactéries, les anomalies du pH liées à la dysfonction de CFTR pourraient perturber la réponse immunitaire en inactivant certaines molécules de l'immunité innée et en induisant des voies de signalisation secondaires à l'hypoxie [20]. La dysfonction de CFTR perturbe également la voie du NO et la phagocytose de certaines bactéries in vitro (*B. cepacia*) [47]. Enfin, il existe de façon précoce et prolongée un afflux de polynucléaires neutrophiles au sein des bronches des patients atteints de mucoviscidose.

Il existe également de forts arguments pour impliquer l'immunité adaptative dans la réponse à l'infection bactérienne chronique dans la mucoviscidose et les DDB non mucoviscidosiques. Des constatations anatomopathologiques anciennes (1952) font état de la présence de follicules autour de certaines lésions de dilatations de bronches, alors considérées comme des bronchiolites folliculaires [144]. L'étude a été réalisée sur 200 spécimens de résection chirurgicale de dilatations de bronches (lobectomies ou pneumonectomies pour la grande majorité) issus de 196 patients. Les spécimens étaient traités au bloc opératoire par instillation de formol dans l'arbre bronchique sous contrôle de la vue (arrêt de l'instillation lorsque le niveau

d'inflation pulmonaire semblait proche de celui observé lors de la ventilation). Les régions les plus sévèrement et les moins sévèrement atteintes macroscopiquement ont été étudiées. 74% des pièces provenaient du poumon gauche (68,5% dans le lobe inférieur). L'auteur classe les DDB en trois types histologiques : folliculaires, sacculaires (lésions à paroi fibreuse sans épithélium cilié) et atelectatiques (réduction de calibre plus ou moins marquée avec un épithélium plus ou moins respecté) mais plus de la moitié des lésions ne rentrait dans aucune de ces catégories ("unclassified bronchiectasis"). Les lésions de DDB folliculaire sont décrites comme un excès de tissu lymphoïde situé dans la région sous-épithéliale des bronches et bronchioles, parfois compressives sur la lumière bronchique, et également autour des alvéoles (*cf. figure 1.11*). Elles concernaient dans cette étude moins de la moitié des patients et semblaient prédominer dans l'enfance et l'adolescence (aucun patient n'avait plus de 20 ans au moment de la chirurgie), et 50% des patients avaient des symptômes depuis moins de 5 ans au moment de la chirurgie. L'ancienneté de ces constatations ne permet toutefois pas d'affirmer avec certitude qu'il s'agissait de follicules lymphoïdes matures tels que nous les avons définis plus haut, en raison de l'absence d'identification des différentes populations de cellules immunitaires constituant ces follicules. En revanche, une étude plus récente a montré la présence de lymphocytes T dans les biopsies bronchiques de certains patients adultes atteints de DDB non mucoviscidosiques [40]. Dans cette étude, la moitié des patients recevaient des corticoïdes inhalés et le VEMS moyen était de 60%. L'infiltration cellulaire était située dans la muqueuse bronchique mais il s'agissait de biopsies obtenues en bronchoscopie, c'est-à-dire de prélèvements de petite taille ne permettant pas l'étude fine des lésions sous-muqueuses. Il n'y avait pas d'infiltrat lymphocytaire B significatif.

Dans la mucoviscidose, il n'existe pas de follicules lymphoïdes dans les poumons

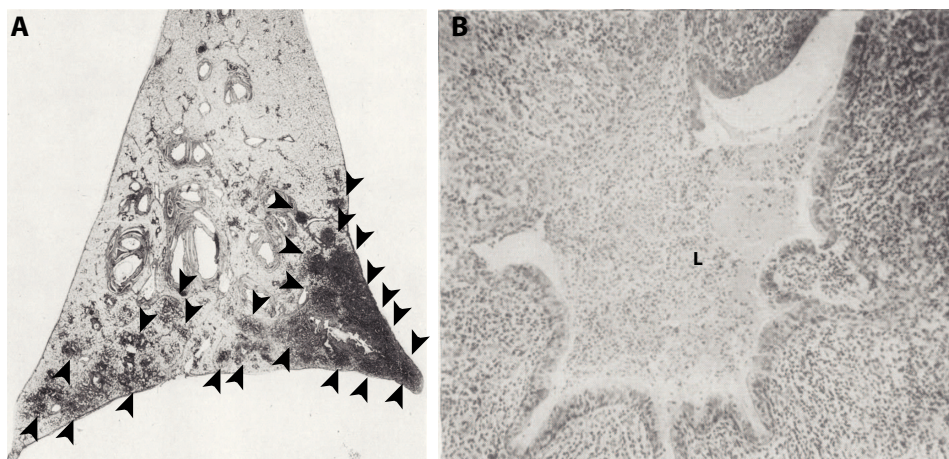


FIGURE 1.11 – **Dilatations de bronches folliculaires décrites par Whitwell en 1952.** A) On observe des agrégats de cellules sous l'épithélium bronchique (têtes de flèches). B) Ces agrégats sont parfois compressifs sur la lumière bronchique (L). Ces lésions concernent dans l'étude uniquement des patients de moins de 20 ans et moins de la moitié des patients au total. Issu de [144]

de foetus décédés in utero de mucoviscidose [53]. Hubeau et coll. ont étudié l'infiltrat inflammatoire pulmonaire chez des patients atteints de mucoviscidose et présentant une colonisation bronchique à *Pseudomonas aeruginosa* ou *Burkholderia cepacia*, comparés à des sujets sains [52]. Ils retrouvent de façon significativement plus élevée des agrégats de lymphocytes B sous-épithéliaux et une accumulation de lymphocytes T sous et dans l'épithélium bronchique. Il s'agissait dans cette étude d'explants pulmonaires obtenus lors de transplantation pulmonaire, avec des patients présentant un trouble ventilatoire obstructif sévère (VEMS entre 16 et 27% de la valeur prédite) et les auteurs n'ont pas cherché à caractériser ces amas pour déterminer s'il pouvait s'agir de follicules lymphoïdes fonctionnels tels que nous les avons définis plus haut.

Ainsi, malgré les limites de ces études anatomopathologiques portant souvent sur des malades sévères, l'ensemble de ces données suggère une mise en jeu de l'immunité adaptative dans les bronchopathies chroniques associées à une infection bactérienne persistante ; le stimulus déclenchant et le rôle, protecteur ou néfaste à

plus ou moins long terme, ne sont toutefois pas bien connus. Ils pourraient en effet se développer en réponse à l'infection mais par la suite contribuer à l'aggravation des lésions pulmonaires, en reconnaissant les produits de dégradation pulmonaire présentés par le biais des cellules de l'immunité innée [16, 149].

Il n'existe à ce jour pas de données publiées sur la néogenèse lymphoïde dans la mucoviscidose et les DDB non mucoviscidosiques. Des travaux menés au laboratoire utilisant des explants pulmonaires de patients atteints de mucoviscidose d'une part, et des pièces de résections chirurgicale de dilatations de bronches d'autre part, comparés à des pièces de résection chirurgicale de patients témoins (résection pour une pathologie en général néoplasique), ont montré la présence de follicules lymphoïdes péribronchiques dans la mucoviscidose et les DDB en nombre statistiquement plus important que chez les patients témoins de l'étude (Marie-Noëlle Lothe-Cartier, travail de Master 2). Ces follicules lymphoïdes présentaient les caractéristiques de follicules lymphoïdes matures, comprenant des zones B et T séparées, de HEV et des centres germinatifs. Ces données sont résumées dans la **figure 1.12**.

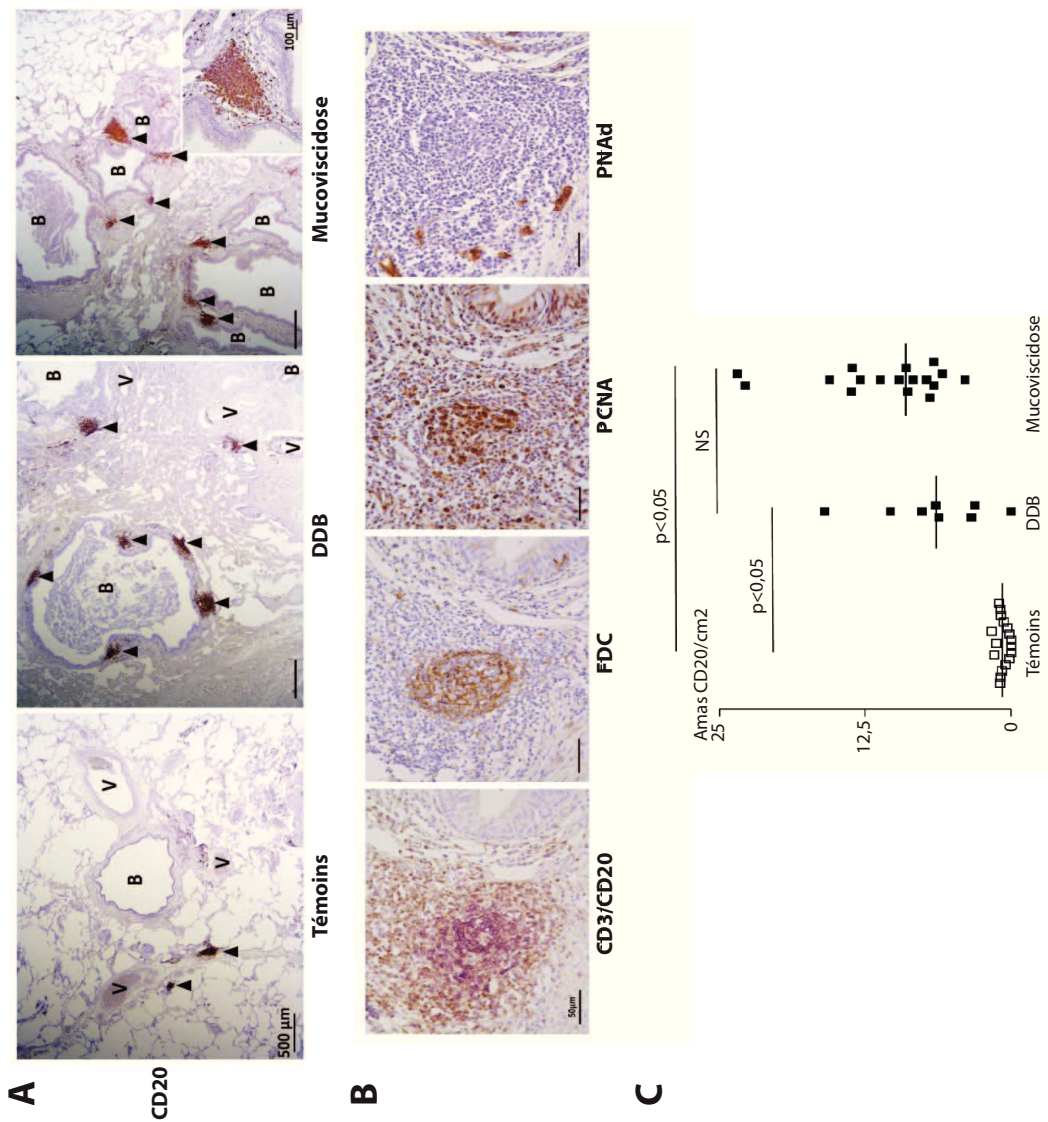


FIGURE 1.12 – Néogenèse lymphoïde dans la mucoviscidose et les dilata-tions de bronches. A : présence d'amas lymphoïdes B sous-épithé-liaux chez les patients atteints de DDB et mucoviscidose. B : follicules lymphoïdes ma-tures associés à ces amas lymphoïdes comprenant des zones B (CD20+) et T (CD3+) séparées, des cellules dendritiques folliculaires (FDC), des centres germi-natifs (PCNA+) et des HEV (PNAd+). C : quantification histomorphométrique des amas lymphoïdes B chez les patients témoins (carrés blancs), atteints de DDB (carrés noirs, première col-onne) et de mucoviscidose (carrés noirs, deuxiè-me col-onne). B = bronche ; V = vaisseau ; DDB = dilatations de bronches ; NS : non significatif

1.6 Hypothèse de travail

La néogenèse lymphoïde est présente dans les poumons des patients atteints de mucoviscidose et de DDB non mucoviscidosiques. Elle est en revanche absente des poumons de foetus atteints de mucoviscidose, ce qui suggère que la néogenèse lymphoïde n'est pas un mécanisme dépendant de CFTR. Nous avons vu plus haut que l'infection bronchopulmonaire chronique était constante dans ces maladies et précoce dans le cas de la mucoviscidose. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'infection bactérienne prolongée pouvait induire une néogenèse lymphoïde. Nous avons utilisé un modèle animal d'infection bactérienne prolongée par instillation intratrachéale de billes d'agarose contenant des bactéries, mis au point dans notre laboratoire [83]. Notre choix s'est porté d'une part sur la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* (une bactérie à Gram négatif) et d'autre part sur la bactérie *Staphylococcus aureus* (une bactérie à Gram positif), qui sont les pathogènes principaux retrouvés chez les patients atteints de mucoviscidose [39, 142]; *Pseudomonas aeruginosa* est également très fréquent dans les DDB non mucoviscidosiques [97] et la BPCO [127].

Chapitre 2

Méthodes

2.1 Modèle d'infection bactérienne bronchique chronique

2.1.1 Choix de la souche de *Pseudomonas aeruginosa*

La souche de *Pseudomonas aeruginosa* de sérotype O1 (PAO1) est une souche de laboratoire non mucoïde. Il s'agit de la souche de laboratoire de référence, dont le génome de 6,3 Mb a été complètement séquencé. Elle a déjà été utilisée avec succès dans un modèle d'infection pulmonaire chronique chez le rat comme chez la souris [15, 74]. Sa pertinence clinique est également augmentée par sa capacité à s'entourer de biofilms et sécréter de l'alginate dans ces mêmes études, ce qui permet de se rapprocher du phénotype mucoïde observé chez les patients atteints de mucoviscidose et de DDB.

2.1.2 Choix de la souche de *Staphylococcus aureus*

En l'absence de souche de laboratoire de *S.aureus* consensuelle en termes de pertinence clinique dans la mucoviscidose, nous avons choisi une souche de *S.aureus*

sensible à la méticilline (SAMS) provenant des expectorations d'un patient mucoviscidique suivi au CRCM de l'hôpital Cochin et infecté depuis de plus de 10 ans à ce germe. Le choix du caractère sensible à la méticilline se justifie d'une part sur un argument de fréquence : en Europe, la prévalence de SAMS chez les patients mucoviscidosiques et atteints de DDB non mucoviscidosiques est nettement supérieure à celle de SARM [137, 142]. D'autre part, le caractère résistant à la méticilline chez *S.aureus* est dû à l'acquisition d'une cassette chromosomique portant le gène *mecA*, lui-même codant pour une protéine liant la pénicilline [49]. L'acquisition de cette cassette a pour conséquence une résistance accrue aux antibiotiques entraînant des difficultés de prise en charge thérapeutique mais elle n'est pas considérée comme un facteur de virulence à part entière. La présence de cette cassette dans le génome de *S.aureus* ne modifie donc pas la pathogénicité de la bactérie (si l'on compare 2 souches ayant le même fond génétique) [102]. La persistance de *S.aureus* dans l'arbre bronchique des patients résulte d'un processus d'adaptation complexe de la bactérie en réponse au système immunitaire de l'hôte, à la pression antibiotique et à la compétition inter-espèces en cas de colonisation à plusieurs germes [102]. L'utilisation d'une souche issue de l'arbre respiratoire d'un patient mucoviscidosique permet donc de développer notre modèle à partir d'une bactérie possédant ces propriétés d'adaptation et de mimer ainsi l'infection chronique humaine.

2.1.3 Choix de la souche de souris C57/BL6J

La complexité et la multiplicité des mécanismes mis en jeu lors de la réaction immunitaire ne permettent pas de s'affranchir de l'utilisation d'animaux de laboratoire par des études cellulaires seules. La possibilité de moduler l'expression de certains gènes (souris transgéniques ou knock-out) est un avantage certain pour étudier le rôle de cellules ou de molécules. Par ailleurs, les études antérieures ont

montré que des souris de fonds génétiques différents avaient une sensibilité différente à l'infection broncho-pulmonaire bactérienne. Ainsi les souris Balb/C sont résistantes au développement d'une infection chronique alors que les souris C57bl/6 développent une infection broncho-pulmonaire se poursuivant plusieurs mois sans surmortalité excessive contrairement à d'autres souches de souris (DBA2 notamment) [91,130]. L'ensemble de ces éléments nous a incités à porter notre choix sur la souche C57/BL6J.

2.1.4 Réisolement de la souche bactérienne

A partir d'une souche de *Pseudomonas aeruginosa* (PA) O1 ou de *Staphylococcus aureus* conservée à -80 ° C dans du glycérol, on ensemence à J-4 de l'instillation sur un milieu de culture solide « Lysogeny Broth » (LB) sans ampicilline en boîte de Pétri. La boîte de Pétri est ensuite placée pendant 24h à l'étuve à 37 ° C. Cela permet d'isoler une colonie unique qui servira à la fabrication des billes.

2.1.5 Culture bactérienne

La colonie de *Pseudomonas aeruginosa* sélectionnée est prélevée à l'aide d'une anse à inoculer et ensemencée dans deux tubes stériles contenant 45 mL de milieu de culture Trypticase Soja (TS). Les tubes, incomplètement fermés afin de maintenir l'aérobiose, sont placés à 37 ° C sur plateau rotatif pendant 72h (pic de sécrétion des facteurs de virulence du *Pseudomonas* [19]).

La souche de *S.aureus* est réisolée sur membrane d'agarose à partir de la souche congelée puis pré-cultivé en milieu liquide dans du trypticone soy (TS) pendant 10 à 12 heures. A la fin de la pré-culture, la bactérie est cultivée pendant 15 à 18 heures dans du TS frais et le bouillon ainsi obtenu est concentré afin d'obtenir

environ 10^{10} CFU/ml.

Les bactéries sont utilisées dans l'heure pour la préparation des billes.

2.1.6 Quantification sur les cultures bactériennes

Après 72h de culture, le bouillon de culture est homogénéisé et 100 μL sont prélevés pour la quantification. Après dilutions successives au 100^e dans du sérum physiologique stérile, un étalement est réalisé sur milieu de culture LB sans ampicilline. La boîte est placée à 37 ° C pendant 24h puis le nombre de colony forming units (CFU) est compté et exprimé en CFU/mL de bouillon de culture. Nos cultures de bactéries en milieu liquide contiennent environ $3,1 \cdot 10^{10}$ CFU/mL.

2.1.7 Fabrication des billes d'agarose

Un modèle utilisant des bactéries enrobées dans des billes d'agarose, qui permettent l'obtention d'une infection broncho-pulmonaire prolongée, a été développé dans notre laboratoire à partir de modèles préexistants [138]. Pour la préparation des billes d'agarose, nous nous sommes inspirés des techniques décrites par plusieurs équipes dans la littérature [21, 91]. Ces modèles publiés utilisent toutefois des billes d'agarose de petit calibre qui provoquent une infection essentiellement pulmonaire (alvéolaire). La technique de fabrication a donc été adaptée à nos besoins quant à la taille et à la concentration des billes dans la solution d'instillation. Le but est d'obtenir des billes d'une taille de 300 à 400 μm de diamètre afin qu'elles se bloquent dans les bronches des souris et non dans les alvéoles [83]. L'utilisation de billes d'agarose permet d'éviter la clairance bactérienne spontanée : après une instillation unique de bactéries planctoniques, la souris meurt en général de sepsis dans les premières 48 à 72 heures si la quantité de bactéries instillées est élevée, mais survit avec une éradication bactérienne et une résolution complète de l'in-

flammation en 72 heures si la quantité de bactéries instillées est plus faible [13].

Pour préparer les billes contenant du *Pseudomonas aeruginosa*, de l'huile minérale (SIGMA 330760, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) est chauffée à 50 ° C et mélangée à 8.5 mL d'agarose (SIGMA A7299 type XII, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) préalablement dissout au bain marie. A ce mélange, on ajoute la souche de *Pseudomonas aeruginosa* (PA) O1 ou de *Staphylococcus aureus* en suspension dans son milieu de culture (1 mL). Pour la fabrication des billes d'agarose stériles ("billes contrôles"), on mélange 9.5 mL d'agarose dissout avec l'huile minérale, tous les instruments en contact avec la solution ayant été préalablement stérilisés. Pour les deux préparations, 0,5 mL d'encre de Chine pure sont ajoutés afin de permettre la visualisation des billes sur les coupes histologiques en microscopie optique. Les mélanges ainsi obtenus sont ensuite maintenus à 50 ° C et mélangés pendant 6 minutes, puis rapidement refroidis à 4 ° C tout en continuant de mélanger à la même vitesse pendant 20 minutes. La taille finale des billes dépend de la vitesse de mélange et de la rapidité de refroidissement. L'huile minérale dans laquelle les billes sont initialement en suspension est ensuite progressivement remplacée par rinçage et centrifugation par une solution tampon (sodium deoxycholate puis phosphate-buffered saline, PBS) stérile. Pour obtenir des billes d'un calibre homogène, la solution de billes est tamisée au travers de deux filtres avec des pores de 400 puis 300 μm . Les billes ayant une taille comprise entre 300 et 400 μm sont conservées et remises en suspension dans du PBS stérile à la concentration de 20%. Cette concentration de billes permet d'obtenir une solution d'une viscosité suffisamment faible pour réaliser une instillation satisfaisante, avec peu ou pas de mortalité immédiate et un nombre de billes par poumon de souris compris entre 10 et 30. Les billes d'agarose sont mises en culture de façon à comptabiliser la quantité de bactéries instillées aux souris pour les billes contenant des bactéries, et afin de vérifier leur stérilité pour les billes contrôles (*cf. infra*). La

figure 2.1 représente des billes de 300 à 400 μm photographiées en microscopie optique. Les intérêts principaux de ce modèle sont d'utiliser une instillation unique, non traumatique, permettant le suivi au fil du temps de la réaction immunitaire. Ce modèle présente également une valeur localisatrice car les billes, grâce à l'encre de chine, peuvent être visualisées macroscopiquement et microscopiquement dans les poumons.

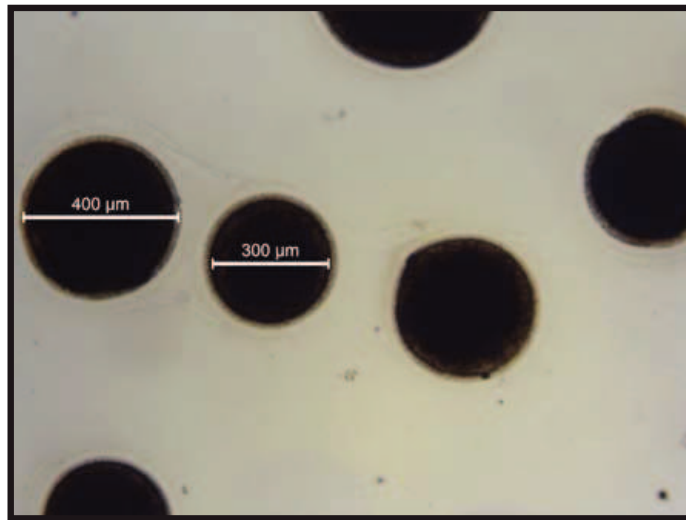


FIGURE 2.1 – Billes calibrées entre 300 et 400 μm photographiées en microscopie optique.

2.1.8 Inoculum bactérien

Notre objectif est de limiter la quantité de l'inoculum bactérien pour ne pas provoquer une surmortalité précoce des souris. Il faut cependant avoir un inoculum suffisant pour provoquer une infection chronique. L'analyse de la littérature montre que les modèles de pneumonie utilisent généralement un inoculum bactérien de l'ordre de 10^7 à 10^9 CFU/animal, suggérant qu'un inoculum plus faible (10^6 CFU/animal) est plus adapté à la création d'un modèle d'infection chronique [13]. Nos cultures de *Pseudomonas aeruginosa* en milieu liquide contiennent

environ $3,1 \cdot 10^{10}$ CFU/mL ; les solutions de billes d'agarose contenant du *Pseudomonas aeruginosa* contiennent en moyenne $6,8 \cdot 10^7$ CFU/mL, correspondant à une instillation de $1,1 \cdot 10^6$ CFU par souris en moyenne (pour 150 microlitres de solution de billes à 20%). Nos billes contenant du *Staphylococcus aureus* contiennent en moyenne $1,8 \cdot 10^8$ CFU/mL, correspondant à un inoculum de $1,5 \cdot 10^7$ CFU par souris en moyenne.

2.1.9 Quantification de l'inoculum bactérien théorique par souris

Après fabrication de la solution de billes à 20%, 1 mL de la solution est prélevé et homogénéisé au Turax™. Après dilutions sériées au sérum physiologique stérile, les dilutions à 10^{-8} et 10^{-6} sont étalées sur milieu de culture LB sans ampicilline. La boîte est placée à 37 ° C pendant 24h puis le nombre de colony forming units (CFU) de bactérie est compté et exprimé en CFU/150 μ L de solution de billes par souris.

2.1.10 Vérification de la stérilité des billes contrôles

Après fabrication des billes d'agarose stériles, 1 mL de la solution est prélevé et homogénéisé au Turax™ et étalé sur milieu de culture LB sans ampicilline. La boîte est placée à 37 ° C pendant 24h. L'absence de colonies bactériennes à 24h montre la stérilité de la solution inoculée aux animaux.

2.1.11 Instillation

Les souris sont anesthésiées par injection intrapéritonéale d'un mélange de kétamine (100 mg/kg d'une solution à 100 mg/mL) et xylazine (10 mg/kg d'une solution à 20 mg/mL) au moyen d'une aiguille de 20 gauges, selon le protocole

en vigueur dans notre animalerie. La souris anesthésiée est placée sur le dos, la tête luxée par un contrepoids fixé au niveau des incisives supérieures. Une canule à pointe arrondie est introduite à l'entrée de la trachée de façon non traumatique et 150 μL d'une solution de billes d'agarose à 20% dans du PBS sont injectés directement dans la trachée. La souris anesthésiée est observée attentivement, une augmentation de sa fréquence respiratoire témoignant du succès de l'instillation intratrachéale. La souris est ensuite placée dans une chambre contenant un air enrichi en oxygène et surveillée jusqu'aux premiers signes de réveil (mouvements spontanés). Les souris sont alors placées dans des cages propres sur des portoirs ventilés à raison de 4 à 5 animaux par cage selon leur taille. Les animaux sont observés quotidiennement. Avec ces conditions expérimentales, la mortalité prématurée des souris est très faible (environ 3%) et la majorité des souris instillées avec des billes contenant des bactéries développe une infection pulmonaire chronique (authentifiée par la culture microbiologique des poumons de certaines souris euthanasiées). Les souris instillées avec des billes d'agarose stériles n'ont pas d'infection bactérienne.

2.1.12 Culture bactériologique des poumons de souris

Pour l'analyse bactériologique, les poumons sont extraits de la cage thoracique en conditions stériles (*cf.* infra) puis homogénéisés au TuraxTM dans 500 μL de sérum physiologique. L'homogénat est mis en culture sur milieu de culture LB sans ampicilline à différentes dilutions pour le décompte bactérien effectué 24h plus tard.

2.2 Traitements pharmacologiques administrés aux animaux

2.2.1 Traitement par anticorps anti CXCL13 murin ou isotype contrôle

Nous avons choisi pour l'inhibition de CXCL13 un anticorps monoclonal afin d'assurer une inhibition spécifique. La dose administrée à chaque injection est identique à celle de l'étude de Bracke et coll. [12]. Dans cette étude, les animaux étaient traités tous les 15 jours par anticorps selon un schéma prophylactique (début du traitement par anticorps au début de l'exposition à la fumée de cigarette) ou curatif (début du traitement par anticorps après 13 semaines d'exposition à la fumée de cigarette) ; nous avons décidé de traiter nos animaux à une seule reprise selon le schéma prophylactique du fait de la rapidité d'apparition de nos follicules (10 à 14 jours). Les anticorps lyophilisés sont reconstitués le jour même dans 200 μ L de PBS sans calcium (SIGMA D8537, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Le traitement est administré par voie intrapéritonéale à J0, à raison de 500 μ g d'anticorps monoclonal anti CXCL13 (R&D AF470) pour le groupe traité ou 500 μ g d'anticorps monoclonal de rat IgG2A isotype contrôle (R&D MAB006) pour le groupe contrôle. L'instillation des billes infectées par PAO1 a lieu le même jour (J0).

Les animaux sont pesés avant l'administration du traitement et marqués individuellement. Ils sont pesés à nouveau à J7 et J14 dans le cadre de la surveillance clinique et sacrifiés après 14 jours d'infection.

2.2.2 Traitement par anticorps anti CXCL12 murin

Nous avons choisi pour l'inhibition de CXCL12 un anticorps monoclonal afin d'assurer une inhibition spécifique. La dose administrée à chaque injection est identique à celle de l'étude de Fleige et coll., et le schéma d'administration (tous les 4 jours) a été adapté à partir de cette étude pour respecter le même intervalle entre les injections [37]. Les anticorps lyophilisés sont reconstitués le jour même dans 200 μL de PBS sans calcium (SIGMA D8537, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Le traitement est administré par voie intrapéritonéale à J1 (un jour après instillation), J5 et J9 à raison de 250 μg d'anticorps monoclonal anti CXCL12 (R&D MAB370).

Les animaux sont pesés avant l'administration du traitement et marqués individuellement. Ils sont pesés à nouveau à J5 et J10 dans le cadre de la surveillance clinique et sacrifiés après 10 jours d'infection.

2.2.3 Traitement par gefitinib

Le gefitinib est un inhibiteur de la tyrosine kinase de l'EGFR, de la même famille que l'erlotinib et l'afatinib. Il inhibe la phosphorylation de l'EGFR en entrant en compétition avec l'adénosine triphosphate (ATP) pour la liaison au site catalytique de la tyrosine kinase de l'EGFR. Contrairement à l'afatinib, le gefitinib et l'erlotinib, inhibiteurs de première génération, se fixent de façon réversible à ce site ; de plus, l'afatinib inhibe l'ensemble des récepteurs de la famille ErbB, c'est-à-dire EGFR, mais également HER2, HER3 et HER4 [105]. Cette absence de sélectivité n'en faisait pas une molécule de choix pour notre étude. Ensuite, la biodisponibilité du gefitinib chez l'Humain n'est pas modifiée par l'absorption de nourriture, ce qui n'est pas le cas de l'erlotinib (biodisponibilité augmentée par l'apport de nourriture) [105]. Enfin, le gefitinib a chez la souris une très bonne

diffusion pulmonaire et une demie-vie plasmatique d'environ 3 heures, permettant une seule administration par jour [84]. Notre choix s'est donc porté sur le gefitinib, qui était un inhibiteur sélectif et efficace de l'EGFR ne nécessitant pas de maintenir les animaux périodiquement à jeun. La **figure 2.2** illustre la formule chimique du gefitinib

Il existe des données pharmacologiques chez la souris permettant de fixer une dose adaptée à l'animal : ainsi, si une dose de 20 mg/kg permet une inhibition partielle de la phosphorylation de l'EGFR [46], il persiste une expression de la forme phosphorylée de l'EGFR (phospho-EGFR) dans un modèle de souris stimulées à l'ovalbumine et traitées à la dose journalière de 50 mg/kg [55]. En comparant les concentrations sériques maximales chez l'homme et la souris, Harada et coll. ont déterminé que la dose journalière standard utilisée en clinique humaine (250 mg/j en une prise) correspondait à une dose située entre 20 et 90 mg/kg/j chez la souris. Par ailleurs, la dose maximale tolérée par les animaux dans cette étude était de 200 mg/kg/j. L'ensemble de ces données nous a incités à utiliser une dose de gefitinib proche des doses maximales tolérées (150 mg/kg/j) afin d'assurer un blocage efficace de la phosphorylation de l'EGFR. Enfin, le gefitinib dispose d'une formulation commerciale adaptée à l'expérimentation animale (Iressa Tocris Bioscience, Lille, France), ce qui en fait une molécule de choix en termes de fiabilité des doses administrées ; certaines études en effet sont réalisées avec des comprimés destinés à l'usage humain écrasés, ce qui ne permet pas de garantir l'homogénéité des doses d'un animal à l'autre.

Le gefitinib est reconstitué dans de l'hydroxypropyl-méthyl cellulose 0.5% (Santa Cruz Sc-279197) reconstituée dans du polysorbate 80 0.1% (Santa Cruz Sc-255444). La solution est par la suite aliquotée en quantité suffisante pour chaque jour de traitement et conservée à -20 ° C. Des aliquots de solvant seul sont réalisés et conservés à -20 ° C pour le traitement du groupe contrôle.

Les animaux sont pesés avant la première administration de gefitinib et marqués individuellement. Le traitement est administré par gavage oral de J-1 à J14 de l'ins-tillation, à raison de 150 mg/kg/j de gefitinib en une prise. Les animaux sont pesés à nouveau à J7 et J14 dans le cadre de la surveillance clinique. Le groupe contrôle reçoit un volume égal de solvant seul selon les mêmes modalités. Les animaux sont sacrifiés après 14 jours d'infection.

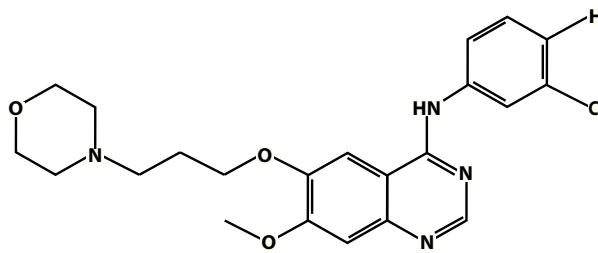


FIGURE 2.2 – Formule chimique du gefitinib

2.3 Sacrifice des animaux

Les souris sont sacrifiées selon un protocole établi et conforme à la réglementation. Elles sont euthanasiées par l'injection intra-péritonéale d'une surdose d'anesthésiant (kétamine 200 mg/kg et xylazine 20 mg/kg d'une solution à 20 mg/mL). Après le sacrifice, divers prélèvements sont réalisés :

- prélèvement des poumons : le sang est aspiré par ponction dans le ventricule droit puis les gros vaisseaux sont sectionnés
- pour inclusion en paraffine : 1 mL de formaldéhyde 4% est injecté dans la circulation droite. Les poumons sont ensuite prélevés et immédiatement immergés dans le formaldéhyde 4% ;
- pour extraction d'ARN : 1 mL de PBS sans calcium est injecté dans la circulation droite puis les poumons sont prélevés et rapidement immergés dans l'azote liquide. Ils sont par la suite conservés à -80°C ;

- pour ELISA : les poumons sont recueillis dans 1,5 mL de tampon de lyse (RIPA 1X (Cell Signaling ref 9806) 10 mL + 1 cp d'inhibiteur de protéases et phosphatases sans EDTA (Thermo Scientific 88669))
- pour bactériologie : 1 mL de PBS sans calcium est injecté dans la circulation droite puis les poumons sont prélevés et immergés dans du PBS stérile. Ils sont par la suite conservés dans la glace.
- lavage bronchoalvéolaire : on met à nu la trachée en réalisant une incision cervicale. La trachée est ouverte par une incision punctiforme et un cathéter court pour perfusion périphérique de 20 Gauges est inséré. Le lavage est réalisé en instillant et récupérant 2 mL de PBS sans calcium ± Sérum de veau foetal en 4 fois. Les lavages sont conservés dans la glace.

2.4 Aspects éthiques

L'ensemble des procédures animales a été réalisé en conformité avec la réglementation française et la directive européenne 2010/63/UE du 22 septembre 2010. Le protocole expérimental a reçu un avis favorable du Comité d'Éthique Animale de l'Université Paris Descartes (avis numéro CEEA34.PRB.135.12.)

2.5 Immunohistochimie

2.5.1 Inclusion en paraffine

Les poumons sont fixés par immersion dans une solution de formaldéhyde 4% (Formalin SIGMA HT 501128-4L, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) pendant 48h puis déshydratés par des bains d'éthanol successifs de 15 minutes à 30%, 50% et 70%. Par la suite, la bronche souche gauche est sectionnée aux ciseaux pour séparer les deux poumons, puis les poumons sont placés dans des

cassettes d'inclusion (Histosette 2) et immergés pendant 12h dans l'éthanol 100% puis pendant 4 heures dans le xylène.

Les poumons sont ensuite immergés pendant 4 heures dans la paraffine à 60 ° C. Ils sont disposés dans un moule en métal et la paraffine chaude est coulée dans le moule à l'aide d'un appareil à inclusion (Leica EG1150H, Leica Microsystemes, Nanterre, France). Les blocs sont démoulés lorsque la paraffine est solidifiée et stockés à température ambiante jusqu'à la coupe.

2.5.2 Coupe au microtome

Des coupes de 5 μm sont réalisées à l'aide d'un microtome (Leica RM2145, Leica Microsystemes, Nanterre, France) et disposées sur des lames en verre Superfrost. Les lames sèchent à l'air libre pendant 24 heures puis sont stockées dans des boîtes.

2.5.3 Marquage des protéines d'intérêt

Les lames sont déparaffinées et réhydratées par des bains successifs de xylène puis d'éthanol à degré décroissant. L'activité peroxydase endogène est bloquée par immersion des lames dans un mélange de méthanol et de peroxyde d'hydrogène. En cas de démasquage nécessaire de l'antigène à mettre en évidence, celui-ci est réalisé par diverses méthodes :

- application d'une solution de protéase de *Streptomyces griseus* à 0.06% (SIGMA P6911, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) pendant 5 à 30 minutes ;
- application d'une solution de saponine à 0.5% (SIGMA S4521, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) à 37 ° C pendant 30 minutes ;
- immersion dans la solution de démasquage Target Retrieval Solution® de Dako (Dako France, Les Ulis, France) à 95 ° C pendant 40 minutes ;

- immersion dans une solution de citrate à pH = 6 chauffée au four à micro-ondes.

Après démasquage, les sites de fixation non spécifiques sont bloqués par application d'une solution d'albumine bovine à 2% (SIGMA A3294, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) puis l'anticorps primaire est déposé à la concentration appropriée; les conditions de marquage sont récapitulées dans le **tableau 2.1**). Après rinçage, l'anticorps primaire est remplacé par un anticorps secondaire biotinylé adapté dilué au 1/200 puis la fixation est révélée par le système streptavidine/peroxydase (Vector ABC Vectastain R.T.U. PK7100, Vector Laboratories, Burlingame, USA). Les chromogènes utilisés sont le 3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride (SIGMA FAST DAB D0426, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), marron, et le Vector VIP (SK-4600, Vector Laboratories, Burlingame, USA), violet. Les lames sont ensuite contre colorées à l'hématoxyline (Vector H-3401, Vector Laboratories, Burlingame, USA) ou au méthyl green (Vector H-3402, Vector Laboratories, Burlingame, USA), déshydratées et montées de façon permanente.

TABLE 2.1 – Liste des anticorps utilisés en immunohistochimie

Anticorps	Référence	Fournisseur	Concentration	Démasquage
CD20	sc-7735	Santa Cruz	1 : 250	Aucun
CD3	sc-101442	Santa Cruz	1 : 400	Protéase 5 min
PNAd	553863	BD Pharmingen	1 : 50	Aucun
Neutrophils Marker	sc-71674	Santa Cruz	1 : 200	Protéase 5 min
PCNA	PC474	Calbiochem	1 : 200	Protéase 15 min
Phospho-EGFR	sc-16803	Santa Cruz	1 : 50 OVN	Protéase 30 min
Pseudomonas	ab68358	Abcam	1 : 400	Aucun
CXCL12	sc-28876	Santa Cruz	1 : 50 OVN	Citrate
CXCL13	AF470	R&D	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ OVN	Citrate
IL17	sc-7927	Santa Cruz	1 : 50	Saponine

2.6 Analyse histomorphométrique

2.6.1 Quantification de l'expression épithéliale de la forme phosphorylée de l'EGFR (phospho-EGFR)

Pour chaque animal, des immunomarquages sont réalisés pour le phospho-EGFR. On prend par la suite 20 photos d'épithélium bronchique par animal, au hasard, au grossissement 400. Par la suite, la surface épithéliale totale et la surface épithéliale phospho-EGFR positive sont quantifiées sur chaque photo à l'aide d'une grille histomorphométrique standardisée. Les résultats sont additionnés pour déterminer un pourcentage de surface épithéliale phospho-EGFR positive pour chaque animal (rapport entre la surface phospho-EGFR positive et la surface épithéliale totale).

2.6.2 Quantification des agrégats lymphoïdes

Les agrégats lymphoïdes CD20+ sont définis comme des amas arrondis ou ovales marquant le CD20, péribronchiques ou périvasculaires. Pour chaque animal, au moins 2 tissus distants de 200 μm sont marqués; les follicules sont ensuite comptés manuellement au microscope. La surface pulmonaire de l'ensemble des tissus marqués est mesurée en cm^2 à l'aide d'une grille de comptage histomorphométrique et le nombre d'agrégats lymphoïdes est rapporté à la surface pulmonaire (déterminée en cm^2 à l'aide d'une grille histomorphométrique) pour chaque animal. La même méthode est utilisée pour la quantification des agrégats CD3+.

2.7 Traitement des liquides de lavage bronchoalvéolaire (LBA)

2.7.1 Cytocentrifugation des liquides de LBA

Après recueil chez l'animal, les LBA sont immédiatement centrifugés à 250g pendant 10 minutes à +4 ° C. Les surnageants sont récupérés pour conservation à -80 ° C puis le culot cellulaire est repris dans 150 μL de PBS sans calcium. La numération globale des cellules du LBA est réalisée sur cellule de Malassez. Pour réaliser la cytocentrifugation, on utilise $2 \cdot 10^4$ cellules que l'on dilue dans du PBS sans calcium (QSP 250 μL). Les cellules sont alors cytocentrifugées sur lame à 750 rpm pendant 5 minutes à température ambiante. Après séchage, elles sont colorées par le kit RAL 555 (RAL diagnostics, Martillac, France) selon le protocole du fabricant, déshydratées par trempage bref dans l'éthanol 100% et le xylène, et montées de façon permanente. On réalise un compte cellulaire différentiel sur 200 cellules.

2.7.2 Cytométrie en flux sur les liquides de LBA

Après recueil, les LBA sont traités immédiatement. Ils sont filtrés sur membrane en nylon (40 μm) afin de retirer les billes. Les cellules sont numérées au FACS puis centrifugées à 1600 rpm pendant 6 minutes à 4 ° C. Le culot est repris dans 200 μL de PBS-SVF et séparé en 2 parts égales pour réaliser le marquage myéloïde et le marquage lymphoïde dans des plaques 96 puits. Après centrifugation à 2000 rpm pendant 1 minute à 4 ° C, on pratique un blocage des sites de fixation non spécifique par adjonction de 24G2 pendant 15 minutes à 4 ° C. Les cellules sont lavées et centrifugées et on dépose dans les puits l'anticorps primaire biotinylé pendant 15 minutes à 4 ° . Après lavage et centrifugation, on dépose le mélange de

la streptavidine et des anticorps secondaires couplés à leur fluorochrome pendant 15 minutes à 4 ° C. Après lavage et centrifugation, les échantillons sont analysés en cytométrie en flux sur un appareil multicolore (BD Fortessa ou LSR II). Les **tableaux 2.2 et 2.3** récapitulent les anticorps utilisés pour les marquages.

TABLE 2.2 – Anticorps utilisés pour le marquage lymphoïde en cytométrie en flux

Anticorps	Référence	Fournisseur	Concentration
TCRbêta biotinylé	553169	BD Pharmingen	1 : 100
SAV PE Cy7	557598	BD Pharmingen	1 : 100
CD4 PB	558107	BD Pharmingen	1 : 100
CD8 APC H7	130-096-602	MACS	1 : 50
CD19 FITC	553785	BD Pharmingen	1 : 100
NK1.1 Pcp Cy5.5	551114	BD Pharmingen	1 : 100
TCRgd PE	553178	BD Pharmingen	1 : 100
CD45 APC	559864	BD Pharmingen	1 : 100

TABLE 2.3 – Anticorps utilisés pour le marquage myéloïde en cytométrie en flux

Anticorps	Référence	Fournisseur	Concentration
Ly6C biotinylé	557359	BD Pharmingen	1 : 100
SAV PB	S11222	Invitrogen	1 : 600
CD11b APC	17011283	eBioscience	1 : 200
CD11c PE Cy7	558079	BD Pharmingen	1 : 100
NK1.1 PE	557391	BD Pharmingen	1 : 100
Ly6G FITC	551460	BD Pharmingen	1 : 100
CD45 Pcp Cy5.5	550994	BD Pharmingen	1 : 100

2.7.3 Mesure des concentrations de chimiokines par ELISA

Pour l'obtention des homogénats de poumon, les poumons sont broyés au Turax™ 2 minutes à 24000 rpm à 4 ° C. L'homogénat est laissé à la même température pendant 5 à 10 minutes puis centrifugé 150 000 rpm pendant 20 minutes à 4 ° C. Les surnageants sont récupérés et utilisés immédiatement pour le dosage ou

aliquotés et conservés à -80 ° C jusqu'à leur utilisation.

Les concentrations des chimiokines CXCL12, CXCL13, CCL19 et IL17 dans les surnageants de liquides de lavage bronchoalvéolaire ou dans les broyats de poumons de souris sont mesurées à l'aide de kits ELISA commercialisés en suivant les recommandations du fabricant (Quantikine mouse CXCL13 MCX130 et mouse IL17 MI700 ; Duo Set mouse CCL19 DY440, DuoSet mouse CXCL12 DY460 R&D systems, Lille, France). Les échantillons et les contrôles de concentrations connues sont déposés de façon répliquée sur une plaque de 96 puits recouverte au préalable d'un anticorps monoclonal dirigé contre la chimiokine d'intérêt. Après incubation pendant 2 heures et rinçage avec une solution de PBS-Tween 0.05%, un anticorps polyclonal biotinylé également dirigé contre la chimiokine d'intérêt est déposé dans les puits pendant 2 heures. Après un nouveau rinçage avec une solution de PBS-Tween 0.05%, la streptavidine-HRP, qui se fixe à la biotine, est déposée dans les puits de la plaque. Cette enzyme réagit avec un mélange de peroxyde d'hydrogène et de tétraméthylbenzidine, entraînant une réaction colorée proportionnelle à la quantité de la molécule d'intérêt détectée dans les puits. Cette réaction colorée est arrêtée par l'ajout d'acide sulfurique. La plaque est ensuite lue à une longueur d'ondes de 450 nm avec une correction des imperfections optiques de la plaque par soustraction des densités optiques obtenues par lecture à 570 nm, à l'aide d'un lecteur de densité optique à double longueur d'ondes (Elx 808, ultra microplate reader, Biotek instruments). Les concentrations sont obtenues par comparaison à une courbe de contrôles de concentrations connues et exprimées en pg/mL.

2.8 Quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

2.8.1 Extraction d'ARN

Après homogénéisation des poumons congelés par le système FastPrep system (MP Biomedicals, Illkirch, France), l'ARN total a été extrait grâce au kit RNeasy mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) selon les instructions du fabricant.

2.8.2 qPCR

Les analyse de RT-PCR ont été réalisées sur un appareil ABI 7900 (Applied Biosystems, Foster City, CA) dans un volume total de 10 μL contenant 1 μL de cDNA dilué, 300 nM de chaque amorce (sens et antisens) et du SYBR Green PCR Master Mix (Fisher scientific, Illkirch, France). Le tableau 2.4 récapitule les amorces utilisées pour la qPCR sur les poumons murins.

TABLE 2.4 – Amorces utilisées pour la PCR quantitative

Transcrit	Amorce sens	Amorce antisens
IL17	5'AAGGCAGCAGCGATCATCC3'	15'GGAACGGTTGAGGTAGTCTGAG3'
CXCL12	5'GAGAGCCACATCGCCAGAG3'	5'TTTCGGGTCAATGCACACTTG3'
CXCL13	5'CAGGCCACGGTATTCTGGA3'	5'CAGGGGGCGTAACTTGAATC3'
CCL19	5'AGACTGCTGCCTGTCTGTGA3'	5'GCCTTTGTTCTTGGCAGAAG3'

2.9 Analyse statistique

Les résultats sont exprimés en médiane pour les variables quantitatives et en valeur absolue (pourcentage) pour les valeurs qualitatives. Les variables quantitatives ont été comparées deux à deux avec un test non paramétrique de Mann-Whitney. Les variables qualitatives ont été comparées avec un test exact de Fisher ou par un

test du Chi². Une valeur de P <0,05 était considérée comme significative. L'analyse statistique a été réalisée avec le programme Graphpad Prism 4.03.

Chapitre 3

Résultats

3.1 Modèle d'infection bronchique prolongée

La mise en culture des poumons de souris instillés avec des billes contenant du PAO1 ou du *S. aureus* à différents temps expérimentaux montre la persistance de l'infection bactérienne jusqu'à 14 jours après une instillation unique (*cf.* **figure 3.1**). Cela confirme la validité de notre modèle expérimental avec chacune des bactéries.

3.2 Inflammation intrapulmonaire provoquée par l'infection prolongée

3.2.1 Etude par cytocentrifugation des liquides de lavage bronchoalvéolaire (LBA)

Les souris non instillées (contrôles) présentent une cellularité faible dans le LBA (moins de 50 000 cellules/mL), principalement composée de macrophages

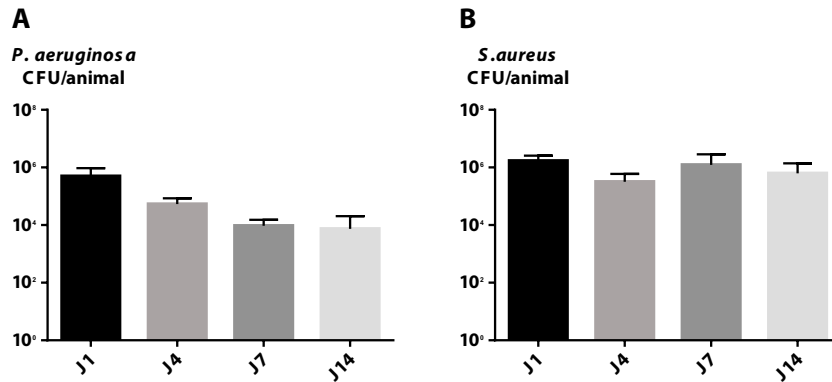


FIGURE 3.1 – **Evolution de la charge bactérienne dans les poumons de souris après instillation.** Les souris ont été instillées avec une dose unique de PAO1 (A) ou de *S. aureus* (B) et sacrifiées à différents temps (J) après instillation. Il persiste une charge bactérienne jusqu'à 14 jours (J) après instillation. Les résultats sont présentés en médiane +/- erreur standard de colony forming unit (CFU) par animal.

(plus de 95%). L'instillation avec des billes stériles n'entraîne pas d'augmentation significative de la cellularité ni de la répartition des types cellulaires dans le LBA par rapport aux contrôles (*cf.* **figure 3.2**).

L'instillation de billes contenant du PAO1 provoque une augmentation massive de la cellularité du LBA à J1 (moyenne de 2,3 millions de cellules/mL), qui décroît progressivement par la suite pour atteindre en moyenne 324 000 cellules/mL après 14 jours d'infection. Les souris sacrifiées à J1 présentaient une majorité de polynucléaires neutrophiles dans le LBA (plus de 70%). Progressivement (dès J4), on note une diminution du nombre total de polynucléaires neutrophiles et l'apparition de lymphocytes (environ 10% à J14) et de macrophages (environ 85% à J14). Ainsi, la persistance de l'infection endoluminale s'accompagne d'une diminution de la quantité de cellules inflammatoires et d'une modification de la cellularité différentielle.

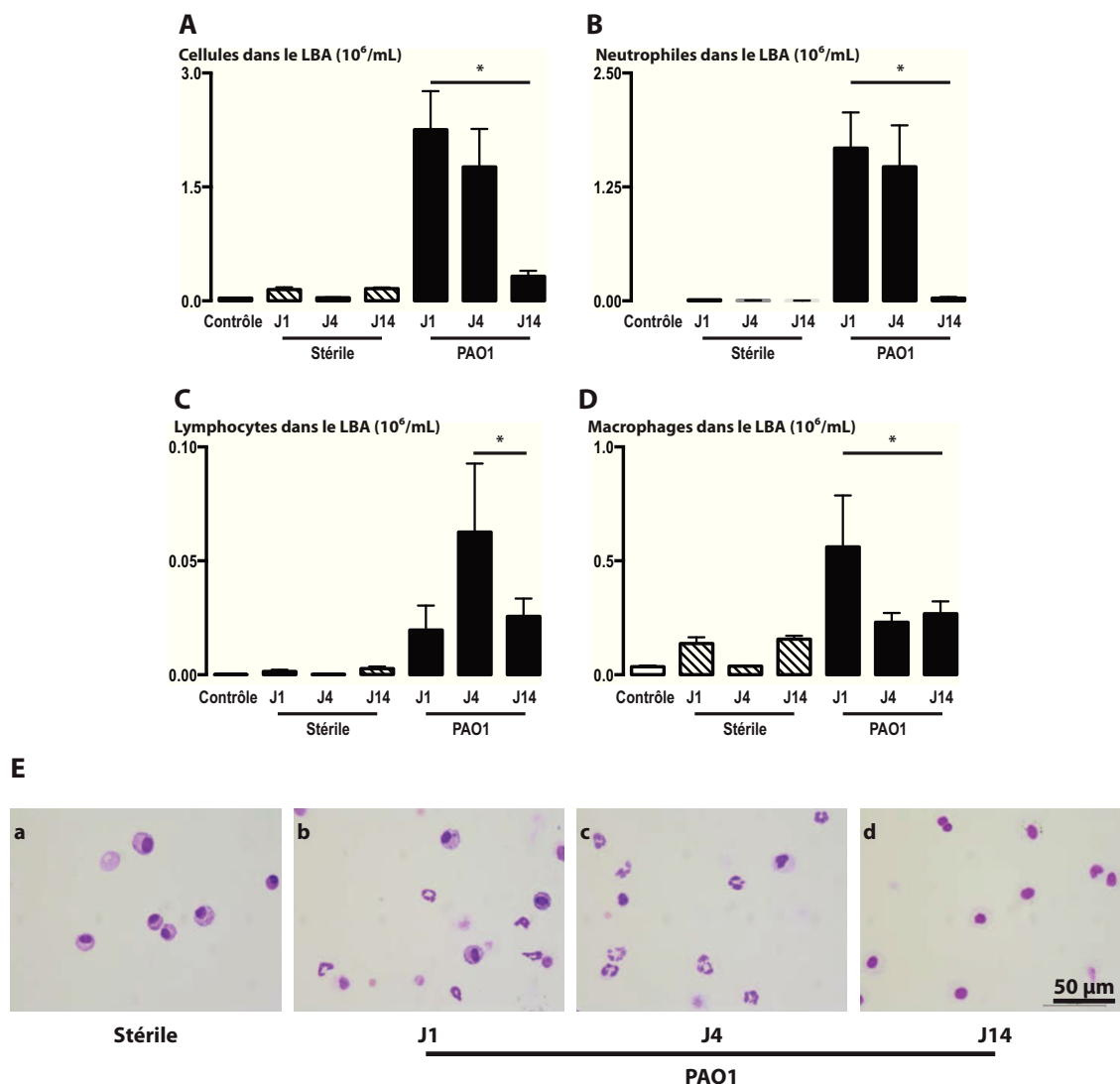


FIGURE 3.2 – **Cellularité des LBA.** A-D : Comptes cellulaires différentiels dans le LBA. Les animaux non instillés (Contrôle, histogrammes blancs), ou instillés avec des billes stériles (histogrammes hachurés) ou contenant du PAO1 (histogrammes noirs) ont été sacrifiés à des temps (J) successifs. Les LBA ont été recueillis pour une numération globale (A) et une cytocentrifugation permettant un compte cellulaire différentiel des neutrophiles (B), lymphocytes (C) et macrophages (D). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM; * : $p < 0,05$ par rapport au contrôle. E : microphotographies représentatives de lames de cytocentrifugation des LBA chez des souris instillées avec des billes stériles (a) ou PAO1 (b-d). Les cytocentrifugations sont réalisées à une concentration de $2 \cdot 10^4$ cellules/mL quelle que soit la numération initiale, et la densité cellulaire est identique pour toutes les lames. Grossissement original 400X.

3.2.2 Etude par cytométrie en flux

Afin de caractériser par cytométrie en flux l'évolution des types cellulaires recrutés après une instillation unique de billes contenant du PAO1, nous avons sacrifié des animaux à des temps successifs (de J1 à J14 après instillation) et les avons comparés à des animaux n'ayant pas reçu d'instillation (contrôles). Nous avons recueilli le liquide de LBA et avons réalisé des marquages des différents types cellulaires en cytométrie en flux, que nous avons comparés à ceux de souris n'ayant pas reçu d'instillation (contrôles). Ces expériences ont confirmé l'augmentation majeure de la cellularité du LBA à J1 après instillation de billes contenant du PAO1, avec une diminution dans les temps plus tardifs (J7 et J14), et ont permis de caractériser les types cellulaires présents dans le LBA des souris infectées au fil du temps.

A J1 après instillation de billes contenant du PAO1, la cellularité du LBA est essentiellement liée à la présence de polynucléaires neutrophiles (*cf.* **figure 3.3**). Dès J4, il existe un afflux de cellules NK. Dès J7, on observe un changement de la cellularité du LBA au profit de cellules de l'immunité acquise, initialement des lymphocytes T CD8+ (à J7) puis des lymphocytes T CD4+, des lymphocytes T $\gamma\delta$ et des lymphocytes B CD20+, mais également des cellules dendritiques CD11b+CD11c+ et des macrophages.

Ces résultats indiquent une modification de la réponse immunitaire intrapulmonaire en réponse à une infection bronchopulmonaire prolongée : l'infection aiguë est caractérisée par une réponse immunitaire rapide et intense faisant intervenir principalement les cellules de l'immunité innée (granulocytes puis cellules NK et macrophages). La persistance de l'infection s'accompagne de l'apparition d'une réponse adaptative caractérisée par la présence de lymphocytes T et B.

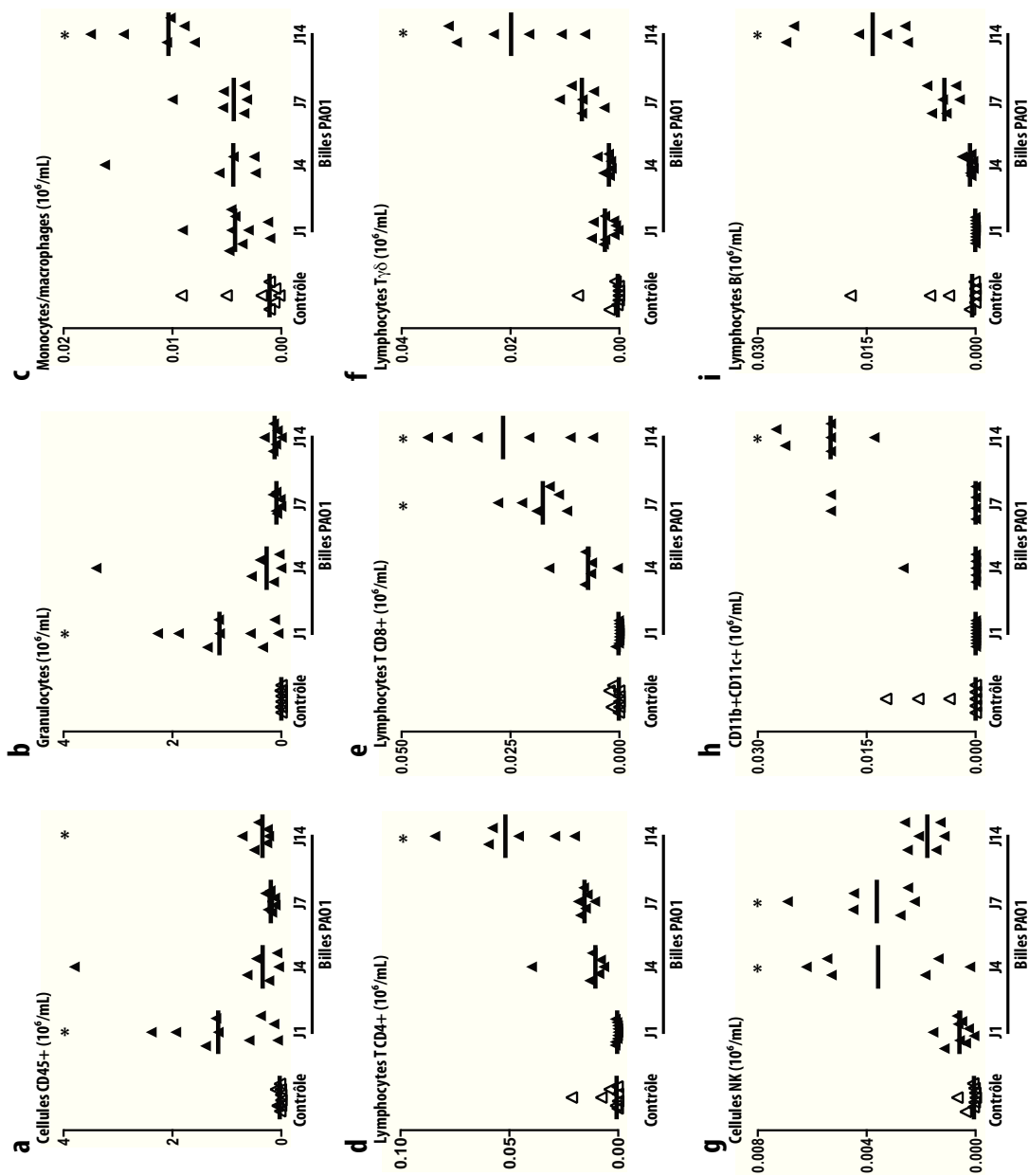


FIGURE 3.3 – Evolution des comptes cellulaires différentiels dans le LBA de souris infectées par PAO1 pendant 14 jours. Les souris ont été sacrifiées sans instillation (Contrôle) ou à des temps successifs après instillation unique avec des billes contenant du PAO1. Le LBA a été recueilli pour une numération globale des cellules hématopoïétiques (CD45+), un marquage des cellules myéloïdes (Granulocytes, monocytes/macrophages, CD11b+CD11c+) et un marquage des cellules lymphoïdes (Lymphocytes B, T CD4+, T CD8+, T $\gamma\delta$). Les résultats ont été comparés à des souris non instillées (contrôles, triangles blancs). Chaque triangle représente un animal, les barres horizontales représentent les médianes ; * : $p < 0,05$ par rapport au contrôle.

3.3 Aspect macroscopique des poumons

L'instillation de billes contenant du PAO1 (*cf.* **figure 3.4**) ou du *S. aureus* (non représenté) provoque macroscopiquement un aspect inflammatoire autour des billes, qui n'est pas observé avec l'instillation de billes stériles. En revanche, le poumon situé à distance des billes reste macroscopiquement normal.

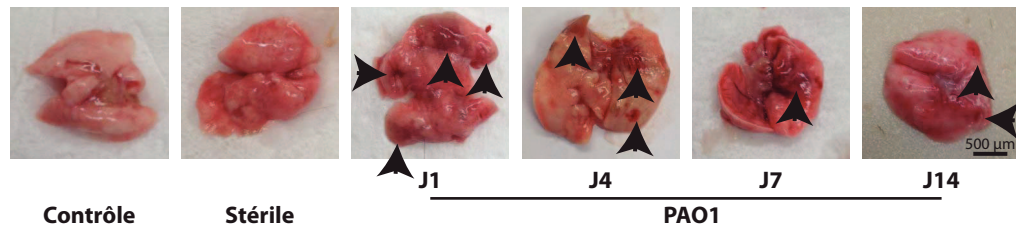


FIGURE 3.4 – **Aspect macroscopique des poumons.** Les poumons de souris non instillées (contrôles) ou instillées avec des billes stériles ne sont pas inflammatoires macroscopiquement, tandis que les poumons des souris ayant reçu une dose unique de billes contenant du PAO1 et sacrifiées à différents jours (J) post instillation présentent des zones d'inflammation (têtes de flèche) autour des billes, mais avec un poumon à distance des billes d'aspect normal.

3.4 Induction d'une néogenèse lymphoïde péri-bronchique en 14 jours par l'infection bactérienne bronchopulmonaire

Les données de la littérature montrent que l'infection par des virus ou des bactéries inactivées provoque une néogenèse lymphoïde en 10 à 14 jours. Par ailleurs, nos données de cytométrie en flux retrouvent une mise en jeu de l'immunité adaptative dans la lumière bronchique prédominant à la deuxième semaine post infection. Nous avons donc étudié histologiquement les poumons de souris 14 jours après une instillation unique par des billes contenant du PAO1 ou du *S. aureus*. Dans les poumons de souris non instillées (souris contrôle), il n'est jamais observé

d'agrégats lymphoïdes mais un marquage CD20 montre la présence de lymphocytes B dans les alvéoles pulmonaires. L'instillation de billes stériles ne provoque pas l'apparition d'un infiltrat inflammatoire à J14. Chez les souris instillées avec des billes contenant du PAO1 ("billes PAO1") ou du *S. aureus* (Billes "*S. aureus*") et sacrifiées après 14 jours d'infection, on observe la présence d'agrégats distincts de lymphocytes B CD20+ et T CD3+ autour des zones d'infection. Au sein des zones B CD20+, il existe des centres germinatifs mis en évidence par le marquage pour le proliferating cell nuclear antigen (PCNA) et des cellules dendritiques folliculaires CD21+. Il existe également au sein des zones T CD3+ des vaisseaux spécialisés caractéristiques des structures lymphoïdes matures, les high endothelial venules (HEV), mis en évidence par le marquage dirigé contre la peripheral lymph node adressin (PNAd). En dehors des zones d'infection (à distance des billes), le poumon est normal. La **figure 3.5** présente des microphotographies représentatives après 14 jours d'infection.

3.5 Cinétique de formation des follicules lymphoïdes lors de l'infection bactérienne bronchopulmonaire prolongée

Afin de caractériser la cinétique de formation des follicules lymphoïdes lors de l'infection bronchique prolongée, nous avons pratiqué une instillation unique de billes contenant du PAO1 ou du *S. aureus* chez des souris et sacrifié les animaux à des temps (J) successifs (J1, J4, J7 et J14). Les sections de tissus pulmonaires ont été analysées en immunohistochimie.

L'instillation de billes contenant du PAO1 ou du *S. aureus* induit un recrutement précoce (dès J1) de lymphocytes B CD20+ sous l'épithélium, en regard des zones

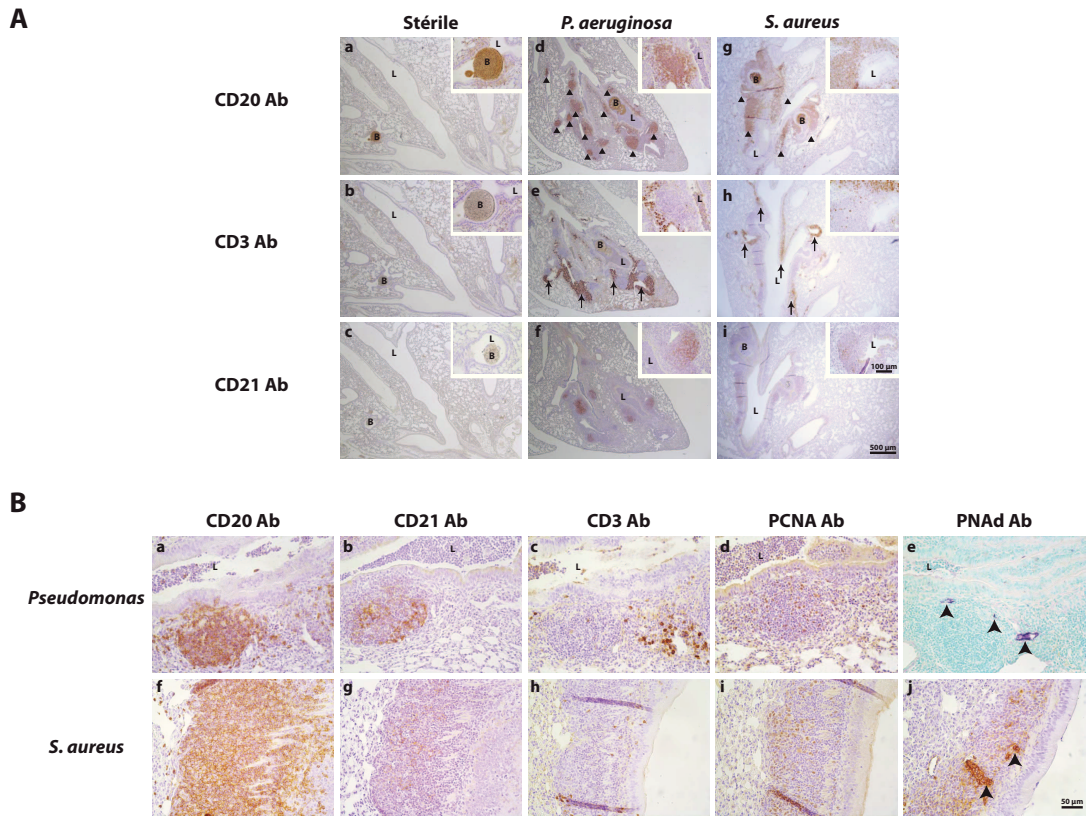


FIGURE 3.5 – Vues microphotographiques après 14 jours d'infection bactérienne bronchopulmonaire. A. Les tissus pulmonaires ont été obtenus chez des souris sacrifiées 14 jours après une instillation unique avec des billes stériles (a-c), des billes contenant du PAO1 (d-f) ou des billes contenant du *S. aureus* (g-i). Il existe chez les souris infectées des zones de lymphocytes B (CD20+, pointes de flèches) et T (CD3+, flèches) mutuellement exclusives et des cellules dendritiques folliculaires (c, f et i, marquage brun CD21+) sous l'épithélium des bronches dans les zones d'infection. Grossissement original : 25X ; inserts 200 X. B=bille, L=lumière bronchique. B. L'analyse par immunohistochimie de ces amas révèle des follicules lymphoïdes matures avec présence de cellules dendritiques folliculaires CD21+ (b, g), de centres germinatifs PCNA+ (d, i) et de high endothelial venules PNAd+ (e, j, pointes de flèches). Grossissement original 200X.

d'infection. Ces lymphocytes s'organisent progressivement en amas lymphoïdes arrondis ou ovalaires, sous-épithéliaux. A partir de J7, on note également l'apparition d'agrégats de lymphocytes T CD3 qui s'organisent dans des zones distinctes, mais au contact des zones CD20+. Chez les souris instillées avec des billes stériles, on n'observe pas de recrutement de cellules B ou T. De même, les amas lymphoïdes ne sont observés qu'à proximité des billes contenant du PAO1, le poumon à distance étant normal. Des microphotographies représentatives de la cinétique de recrutement des lymphocytes B et T en réponse à l'infection par PAO1 ou *S. aureus* sont présentées dans la **figure 3.6**.

L'analyse histomorphométrique retrouve une augmentation significative des amas lymphoïdes CD20+ et CD3+ de J7 à J14 pour les 2 bactéries (n=5 animaux au minimum pour chaque temps expérimental et chaque bactérie). Ces résultats sont illustrés par la **figure 3.7**.

3.6 Cinétique de l'expression des chimiokines homéostatiques CXCL13 et CXCL12 lors de l'infection bactérienne prolongée

Nous avons étudié l'expression des chimiokines CXCL12 et CXCL13 lors de l'infection bactérienne bronchopulmonaire prolongée chez la souris. Notre choix s'est porté sur ces chimiokines qui sont attractantes pour les lymphocytes B (CXCL12 et CXCL13), car elles avaient déjà été impliquées dans la néogenèse lymphoïde intrapulmonaire induite par des stimuli infectieux ou non infectieux.

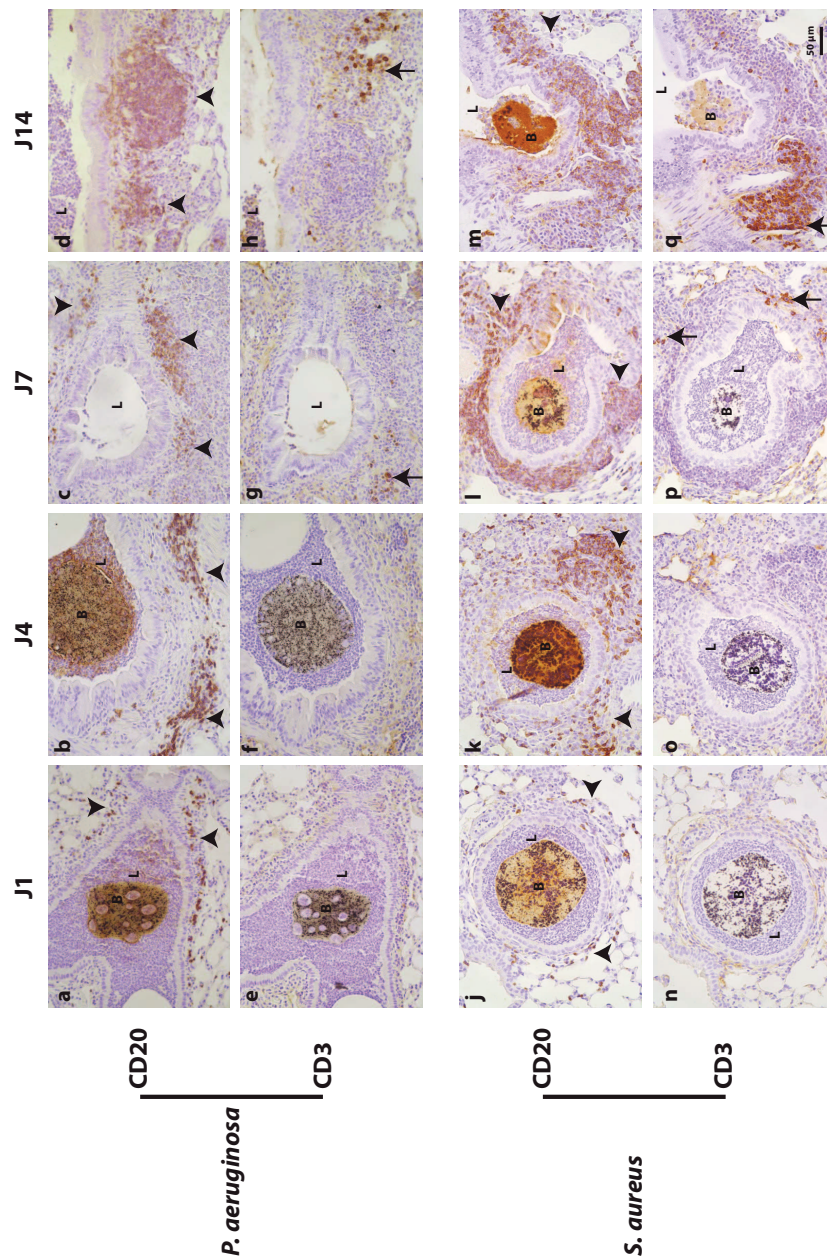


FIGURE 3.6 – Microphotographies de la cinétique de recrutement des lymphocytes B et T chez les souris instillées avec des billes contenant du PAO1 ou du *S. aureus*. Les photos représentent respectivement des immunomarquages pour les lymphocytes B (CD20+, a-d et j-m) et les lymphocytes T (CD3+, e-h et n-q) chez des souris sacrifiées à différents jours (J) après une instillation unique avec des billes contenant du PAO1 (a-h) ou du *S. aureus* (j-q). On observe un infiltrat de lymphocytes B dès J1 (pointes de flèches) mais de lymphocytes T uniquement à partir de J7 (flèches). Grossissement original 200X. B=bille, L=lumière bronchique.

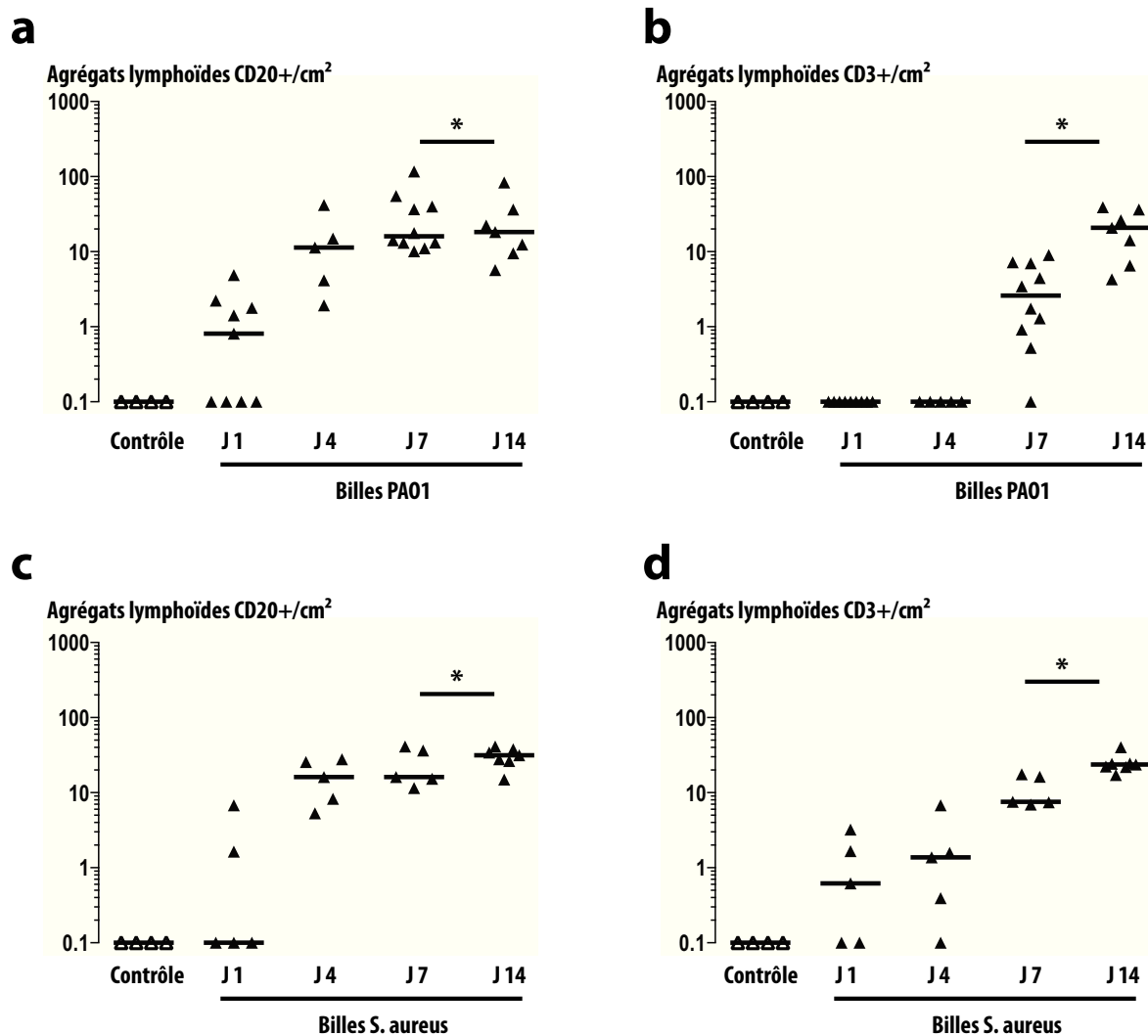


FIGURE 3.7 – Analyse histomorphométrique de la cinétique de recrutement des lymphocytes B (A, C) et T (B, D) chez les souris non instillées (Contrôle, triangles blancs) ou sacrifiées à différents jours (J) après une instillation unique par des billes contenant du PAO1 (A, B) ou du *S. aureus* (C, D) (triangles noirs). Chez les souris contrôles, il n'existe pas d'agrégats lymphoïdes B ou T. Chez les souris instillées, il existe des agrégats lymphoïdes B dès J1 et une apparition plus tardive d'agrégats lymphoïdes T (J7). Chaque triangle représente un animal, les barres horizontales représentent les médianes d'agrégats/cm²; * : p<0,05 par rapport à J1.

3.6.1 Expression de la chimiokine CXCL13

Nous avons comparé des souris non instillées et des souris instillées avec des billes stériles, avec des souris ayant reçu une dose unique de billes contenant du PAO1 et sacrifiées à différents jours (J) après instillation. Il existe une tendance à l'augmentation (non significative) de l'ARNm de CXCL13, associée à une augmentation significative de la protéine CXCL13 à J1 post instillation dans les poumons totaux (**figure 3.8, A**).

L'étude des poumons de souris en immunohistochimie ne retrouve pas de marquage épithélial pour CXCL13 chez les souris non instillées ou instillées avec des billes stériles, en revanche l'instillation avec des billes PAO1 induit un marquage épithélial pour CXCL13 dès J1 (**figure 3.9, B**). La quantification histomorphométrique montre que cette expression est significativement augmentée dès J1 par rapport aux souris non instillées et persiste jusqu'à J14 (**figure 3.9, A**). Après 14 jours d'infection par PAO1 ou *S. aureus*, c'est-à-dire lorsque les follicules sont formés, il existe un marquage pour la protéine CXCL13 au sein des follicules, réticulaire et superposable à celui des cellules dendritiques (**figure 3.8, C**). Enfin, l'infection par PAO1 induit un marquage endothélial pour CXCL13 (non représenté).

L'instillation de billes stériles ne provoquait jamais d'augmentation de la protéine ni de l'ARNm de CXCL13, ni d'expression significative dans l'épithélium, raison pour laquelle les résultats sont présentés groupés pour ces souris.

3.6.2 Expression de la chimiokine CXCL12

L'instillation de billes PAO1 n'induisait pas d'augmentation de la quantité d'ARNm ou de protéine CXCL12 dans le poumon total par rapport aux souris non instillées ou instillées avec des billes stériles (**figure 3.9, C**).

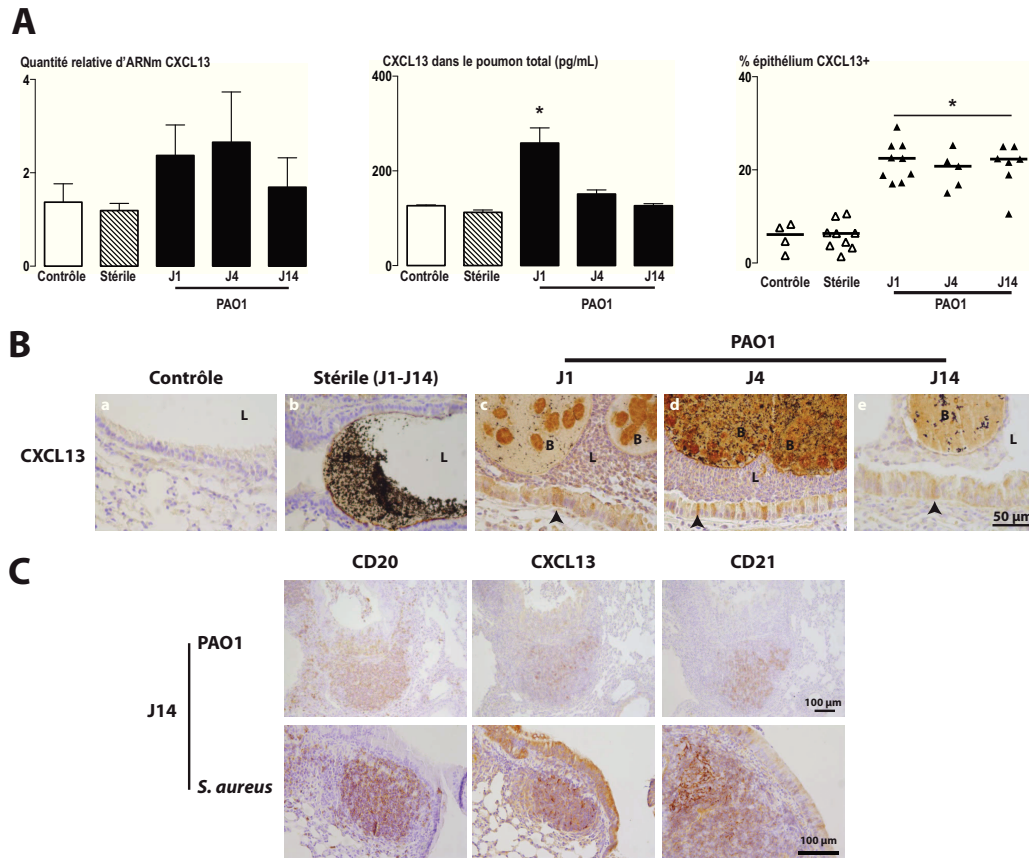


FIGURE 3.8 – Expression pulmonaire de CXCL13 après instillation de billes contenant du PAO1 ou du *S. aureus*. A) Expression de l'ARNm (gauche), de la protéine (milieu) et quantification histomorphométrique (droite) de l'expression épithéliale de CXCL13 dans le poumon total en réponse à l'infection à PAO1. Les souris non instillées (Contrôle, histogrammes et triangles blancs) ou instillées avec des billes stériles (histogrammes hachurés et triangles blancs) ont été comparées avec des souris ayant reçu une instillation unique de billes contenant du PAO1 et sacrifiées à différents jours (J) post instillation (histogrammes et triangles noirs). L'infection par PAO1 n'induit pas d'augmentation significative de l'ARNm de CXCL13, mais induit une augmentation significative de la protéine à J1 et expression épithéliale significative de CXCL13 de J1 à J14. Chaque triangle représente un animal, les barres horizontales représentent les médianes ; * : $p < 0,05$ par rapport aux souris contrôles. En l'absence de modification après instillation de billes stériles, les résultats sont présentés groupés pour les animaux instillés avec ces billes et sacrifiés à J1, J4 et J14 après instillation. B) Microphotographies illustrant l'absence d'expression épithéliale de CXCL13 chez les souris Contrôles (a) et instillées avec des billes stériles (b) et l'induction d'une expression épithéliale de CXCL13 de J1 à J14 chez les souris infectées avec du PAO1 (c-e). Grossissement original 400X. C) Microphotographies illustrant l'existence après 14 jours d'infection à PAO1 ou *S. aureus* d'un marquage folliculaire pour CXCL13 situé au sein de la zone B (CD20+) du follicule, et superposable avec le marquage des cellules dendritiques (CD21+). Grossissement original PAO1 : 100X, *S. aureus* : 200X. B=bille, L=lumière bronchique.

L'étude des poumons de souris en immunohistochimie après 14 jours d'infection, c'est-à-dire lorsque les follicules sont formés, montre l'existence d'un marquage pour CXCL12 au sein des follicules diffus au sein de la zone B du follicule chez les souris instillées avec des billes contenant du PAO1 ou du Staphylocoque (*cf. figure 3.9, A*). Il n'y avait pas d'augmentation significative de l'expression de CXCL12 par l'épithélium bronchique chez les souris infectées, ni à J14, ni à des temps plus précoces post instillation. En revanche, l'instillation avec des billes PAO1 induit un immunomarquage intense pour CXCL12, endobronchique et d'allure neutrophilique, dès le premier jour d'infection et se prolongeant jusqu'à J14 (*figure 3.9, B*).

3.7 Effets de l'inhibition de CXCL12 ou CXCL13 sur la néogenèse lymphoïde induite par l'infection bronchopulmonaire prolongée à *P. aeruginosa*

L'étude de Fleige et coll. a mis en évidence une inhibition de la néogenèse lymphoïde liée à un stimulus par du *Pseudomonas* inactivé en cas d'inhibition de CXCL12 par un anticorps monoclonal [37]. Par ailleurs, dans les modèles de néogenèse lymphoïde induite par un stimulus viral, par l'ovalbumine ou l'exposition à la fumée de cigarette, CXCL13 semble tenir un rôle important [7, 12, 37]. L'inhibition de CXCL13 par un anticorps monoclonal permet d'inhiber la néogenèse lymphoïde liée à l'exposition à la fumée de cigarette ou à l'ovalbumine [7, 12]. Nous avons donc étudié les effets de l'inhibition de CXCL12 ou CXCL13 sur la néogenèse lymphoïde dans notre modèle.

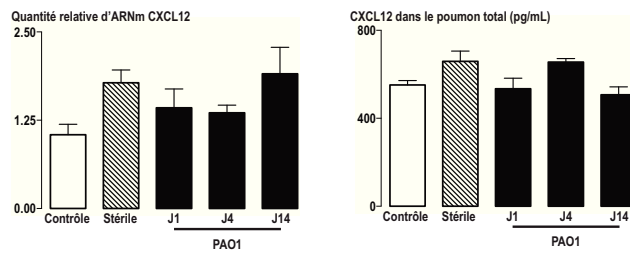
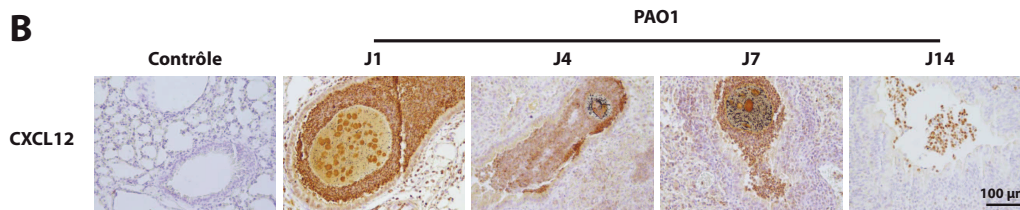
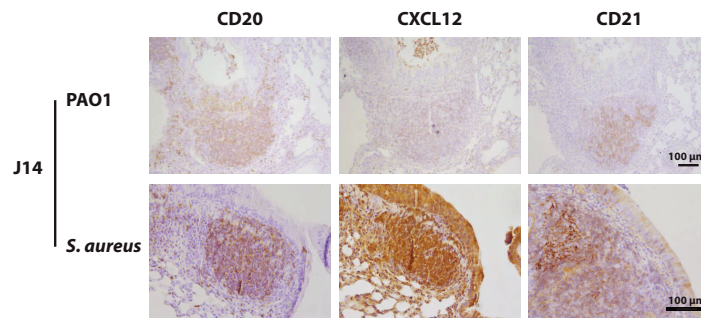
A**B****C**

FIGURE 3.9 – Expression pulmonaire de CXCL12 après instillation de billes contenant du PAO1 ou du *S. aureus*. A) Expression de l'ARNm (gauche) et de la protéine (droite) de CXCL12 dans le poumon total en réponse à l'infection à PAO1. Les souris non instillées (Contrôle, histogrammes et triangles blancs) ou instillées avec des billes stériles (histogrammes hachurés et triangles blancs) ont été comparées avec des souris ayant reçu une instillation unique de billes contenant du PAO1 et sacrifiées à différents jours (J) post instillation (histogrammes et triangles noirs). L'infection par PAO1 n'induit pas d'augmentation significative de l'ARNm ni de la protéine de CXCL12. B) Microphotographies illustrant l'absence d'expression de CXCL12 chez les souris Contrôles et l'induction d'un marquage endobronchique d'allure neutrophilique après une instillation unique avec des billes contenant du PAO1 et sacrifice 1 à 14 jours (J) plus tard. Grossissement original 200X. L=lumière bronchique. C) Microphotographies illustrant l'existence après 14 jours d'infection à PAO1 ou *S. aureus* d'un marquage folliculaire pour CXCL12 situé au sein de la zone B (CD20+) du follicule, sans colocalisation avec le marquage des cellules dendritiques (CD21+). Grossissement original PAO1 : 100X, *S. aureus* : 200X.

Nous avons traité les animaux par un isotype contrôle (animaux "Contrôles"), un anticorps monoclonal dirigé contre CXCL12 ou un anticorps monoclonal dirigé contre CXCL13, et les avons instillés avec des billes contenant du PAO1. L'administration d'un anticorps anti CXCL12 ou anti CXCL13 n'a pas provoqué de surmortalité ni de modification du poids ou du comportement des souris.

Les animaux traités par l'isotype contrôle présentent après 14 jours d'infection bactérienne des agrégats lymphoïdes matures, contenant des zones de lymphocytes B et T, des HEV, des centres germinatifs et des cellules dendritiques folliculaires. en nombre comparable à celui obtenu par l'instillation de billes contenant du PAO1 à des souris sauvages non traitées.

Le traitement par un anticorps monoclonal dirigé contre CXCL12 ou CXCL13 n'induit pas de diminution de la taille ni du nombre des agrégats lymphoïdes B et T (*cf.* **figure 3.10**). Par ailleurs, ces amas présentent les caractéristiques de follicules lymphoïdes matures, avec des cellules dendritiques follicules CD21+ en zone B et des HEV en zone T (non représenté).

3.8 Effet de l'inhibition de la voie de signalisation de l'EGFR sur la néogenèse lymphoïde induite par l'infection bronchopulmonaire prolongée à *P. aeruginosa*

La voie de l'EGFR peut être activée par l'activation des TLR2, 4 et 6, qui ont pour ligands des produits bactériens [72]. L'activation de cette voie induit diverses cascades de signalisation et d'activation cellulaire au sein de la cellule épithéliale, dont nous avons vu qu'elle peut induire la migration des cellules B et T de type Th1 et Th2. Nous avons donc décidé d'étudier le rôle de la voie de l'EGFR

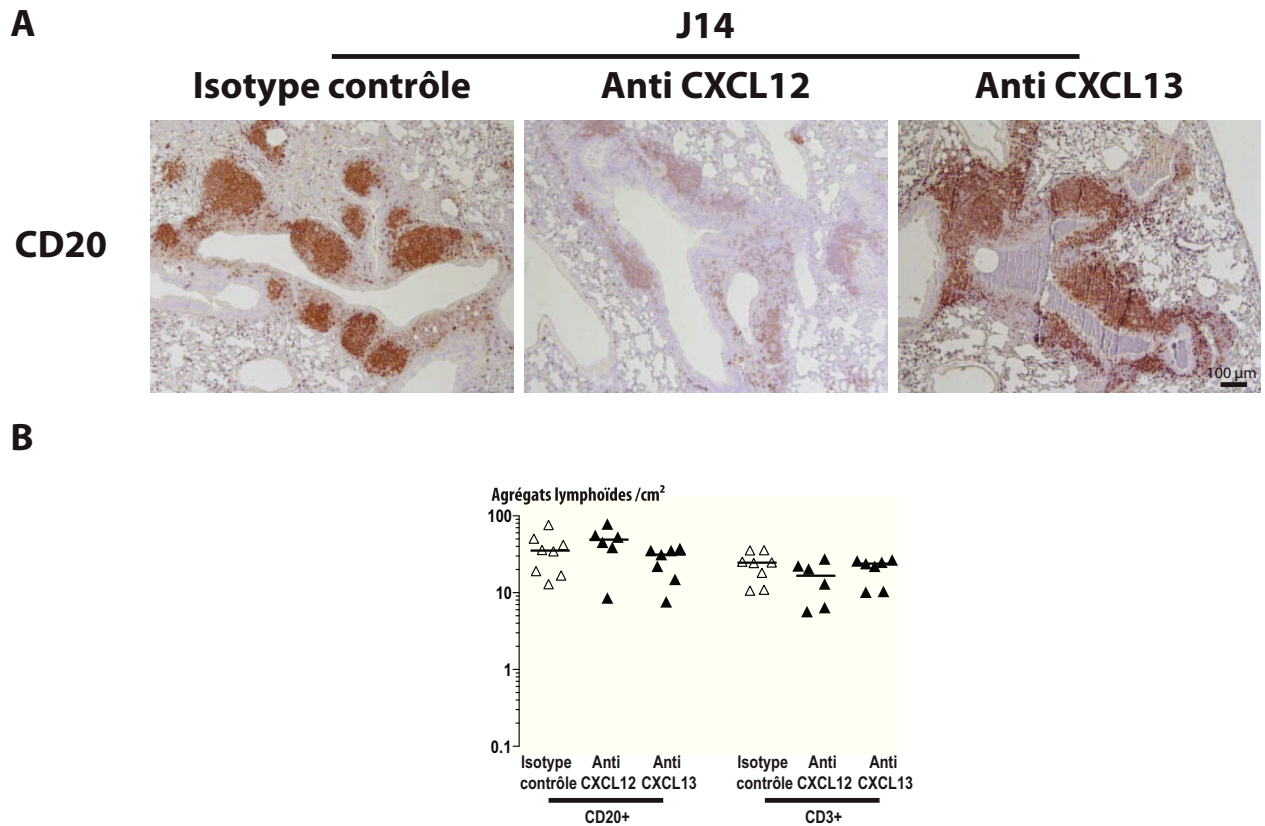


FIGURE 3.10 – Effet d’un anticorps anti-CXCL12 ou anti-CXCL13 sur la néogenèse lymphoïde chez des souris instillées avec des billes contenant du PAO1 et sacrifiées 10 jours (J, anticorps anti CXCL12) ou 14 jours (isotype contrôle et anticorps anti CXCL13) après instillation. A) Microphotographies représentatives du marquage CD20 (lymphocytes B) chez les souris traitées par un isotype contrôle (gauche), un anticorps monoclonal dirigé contre CXCL12 (milieu) ou contre CXCL13 (droite). Il persiste des agrégats de lymphocytes B CD20+ chez les animaux traités (marquage brun). Grossissement original 50 X. B) Quantification histomorphométrique des agrégats lymphoïdes B (CD20+) et T (CD3+) chez les animaux. L’administration d’un anticorps monoclonal dirigé contre CXCL12 ou CXCL13 à des souris infectées par PAO1 ne diminue pas significativement la quantité d’agrégats de lymphocytes B CD20+ ou de lymphocytes T CD3+ par rapport au traitement par un isotype contrôle. Chaque triangle représente un animal, les barres horizontales représentent les médianes d’agrégats/cm².

dans la néogenèse lymphoïde induite par l'infection bactérienne prolongée à PAO1.

3.8.1 Effets cliniques de l'administration de gefitinib

L'administration quotidienne de gefitinib à la dose de 150 mg/kg/j n'a pas provoqué de surmortalité ni de modification du comportement des souris. Il n'y a pas eu de variation de poids significativement différente entre le groupe traité et le groupe contrôle (*cf.* figure 3.11)

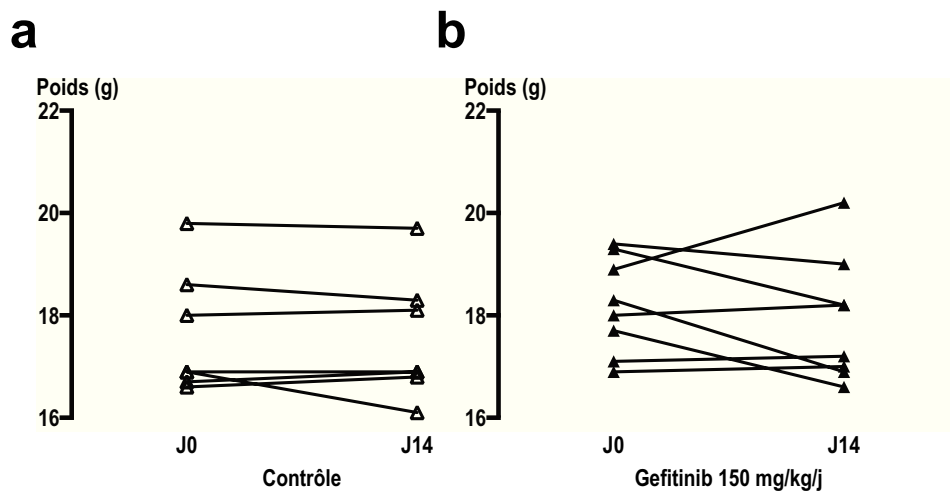


FIGURE 3.11 – **Evolution du poids sous gefitinib.** Chaque triangle représente un animal du groupe contrôle (a, triangles blancs) ou traité (b, triangles noirs) avec pour chaque animal un suivi individuel du poids entre J0 (début du traitement) et J14 (sacrifice).

3.8.2 Efficacité de l'inhibition de la phosphorylation de l'EGFR par le gefitinib

Afin d'évaluer l'efficacité du traitement par gefitinib, nous avons réalisé des immunomarquages pour la forme phosphorylée de l'EGFR (phospho-EGFR). L'ana-

lyse histomorphométrique de ces marquages a confirmé que l'expression épithéliale du phospho-EGFR était significativement diminuée dans le groupe traité par gefitinib par rapport au groupe contrôle ($p < 0,05$), comme illustré dans la **figure 3.12**.

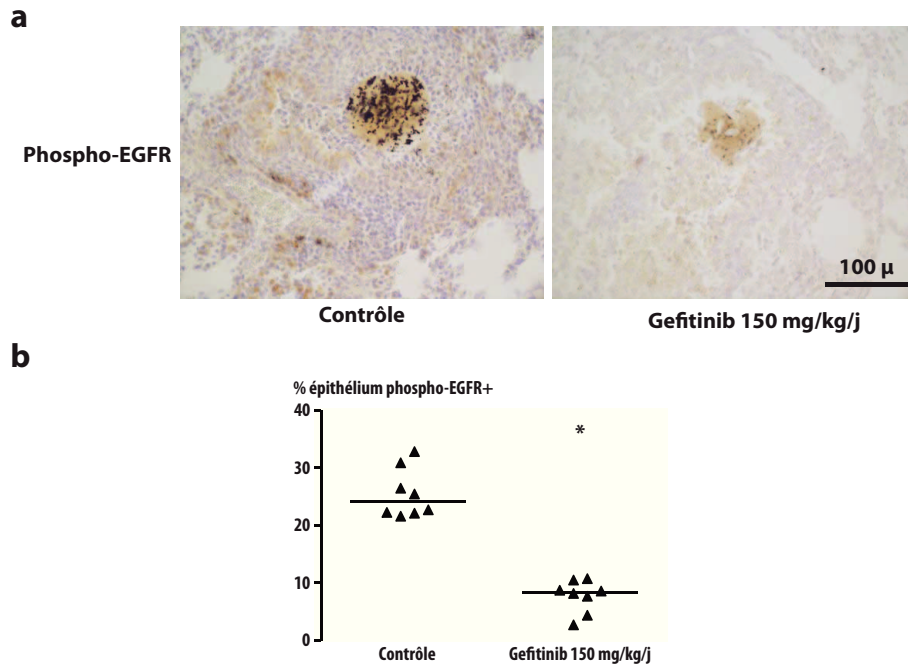


FIGURE 3.12 – Effet du gefitinib sur la phosphorylation de l'EGFR. L'administration de gefitinib pendant 14 jours à des souris infectées par PAO1 diminue significativement l'expression épithéliale de la forme phosphorylée de l'EGFR (phospho-EGFR) par rapport au diluant seul. a : Microphotographies représentatives de l'expression de phospho-EGFR chez les souris contrôles (gauche) et traitées par gefitinib (gauche) ; grossissement original 200X. b : Histomorphométrie quantitative de l'expression épithéliale de phospho-EGFR chez les souris contrôles (triangles blancs) et traitées par gefitinib (triangles noirs). Chaque triangle représente un animal, les barres horizontales représentent les médianes ; * : $p < 0,05$ par rapport au groupe contrôle.

3.8.3 Effets du gefitinib sur la néogenèse lymphoïde

Nous avons traité les animaux par du gefitinib ou bien le diluant du gefitinib (groupe "Contrôle") et les avons instillés avec des billes contenant du PAO1. Les animaux traités par le diluant présentent après 14 jours d'infection bactérienne

des agrégats lymphoïdes matures, contenant des zones de lymphocytes B et T, des HEV, des centres germinatifs et des cellules dendritiques folliculaires. en nombre comparable à celui obtenu par l'instillation de billes contenant du PAO1 à des souris sauvages non traitées.

L'analyse des poumons de souris sacrifiées après 14 jours de traitement par gefitinib et d'infection par PAO1 a montré la persistance de follicules lymphoïdes matures contenant des cellules dendritiques folliculaires et des HEV au sein de zones B et T séparées. Par ailleurs, il n'y avait pas de différence statistiquement significative dans le nombre d'agrégats de lymphocytes B et T par rapport aux souris ayant reçu le diluant du gefitinib (groupe contrôle), comme illustré sur la **figure 3.13**.

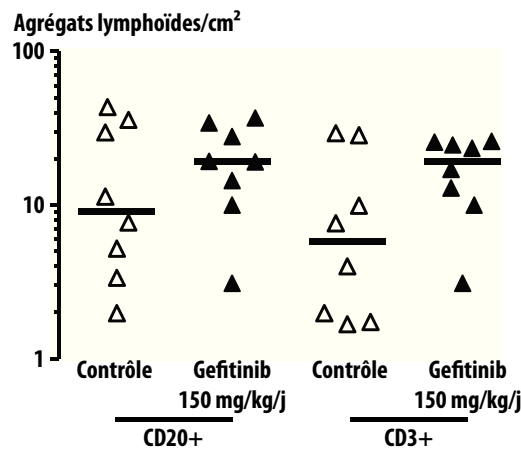


FIGURE 3.13 – Analyse histomorphométrique de l'effet de l'inhibition de l'EGFR sur la néogenèse lymphoïde. L'administration de gefitinib pendant 14 jours à des souris infectées par PAO1 ne diminue pas significativement la quantité d'agrégats de lymphocytes B CD20+ ou de lymphocytes T CD3+ par rapport au diluant seul. Chaque triangle représente un animal, les barres horizontales représentent les médianes d'agrégats/cm².

3.9 Données complémentaires

Nous avons également étudié les chimiokines CCL19 et IL17, qui sont impliquées dans la néogenèse lymphoïde.

3.9.1 Expression de la cytokine IL17

Les souris contrôles ou instillées avec des billes stériles expriment peu d'ARNm et de protéine de CCL19 et IL17. L'instillation avec des billes stériles n'entraîne pas d'augmentation significative, ni de l'ARNm, ni de la protéine de CCL19 et d'IL17.

L'instillation avec des billes contenant du PAO1 induit une augmentation significative précoce de la protéine IL17 (*cf. figure 3.14*), mais cette augmentation n'est liée à une augmentation de l'ARNm d'IL17 qu'à un temps plus tardif (J14). En revanche, cette infection n'induit pas d'augmentation significative de l'ARNm et de la protéine de CCL19.

L'étude par immunohistochimie montre que les souris non instillées présentent un marquage très faible, voire absent, pour IL17. L'infection par PAO1 induit un marquage épithélial et dans les cellules inflammatoires dès J1, et à J14 ce marquage est uniquement présent dans l'épithélium bronchique des souris infectées.

3.9.2 Expression de la chimiokine CCL19

Les souris contrôles ou instillées avec des billes stériles expriment peu d'ARNm et de protéine de CCL19. L'instillation avec des billes stériles ou des billes PAO1 n'entraîne pas d'augmentation significative, ni de l'ARNm, ni de la protéine de CCL19 (*cf. figure 3.15*).

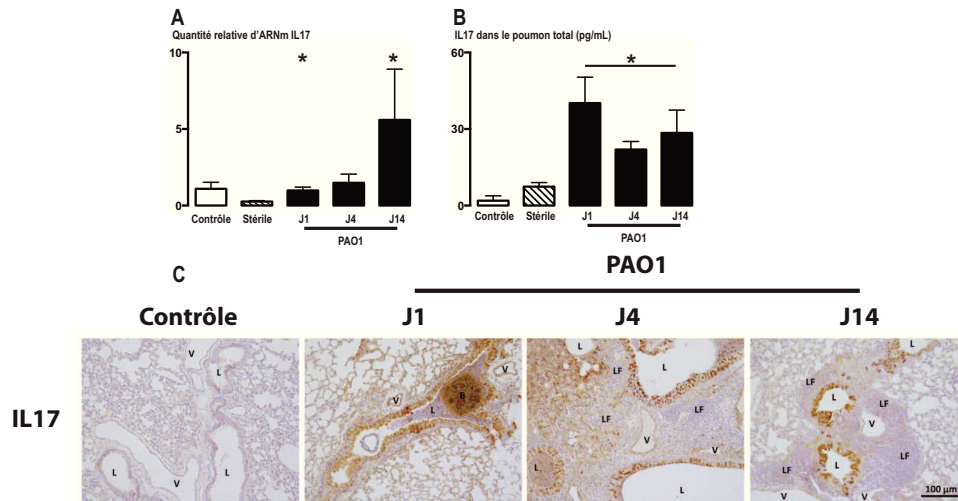


FIGURE 3.14 – **Expression d'IL17 dans le poumon total en réponse à l'infection prolongée à PAO1.** A) Expression de l'ARNm d'IL17 dans le poumon total en réponse à l'infection à PAO1. B) Expression de la protéine IL17 dans le poumon total en réponse à l'infection à PAO1. Les souris non instillées (Contrôle, histogrammes blancs) ou instillées avec des billes stériles (histogrammes hachurés) ont été comparées avec des souris ayant reçu une instillation unique de billes contenant du PAO1 et sacrifiées à différents jours (J) post instillation (histogrammes noirs). L'infection par PAO1 induit une augmentation précoce de la protéine d'IL17 et une augmentation plus tardive de l'ARNm d'IL17 par rapport aux souris non instillées ou instillées avec des billes stériles. * : $p < 0,05$ par rapport aux souris contrôles. C) Microphotographies représentatives de l'expression d'IL17 dans le poumon chez des non instillées (contrôle) et de souris instillées avec une dose unique de billes contenant du PAO1 et sacrifiées à différents jours (J) post instillation. Les souris contrôles présentent un marquage très faible voire absent pour IL17. L'infection à PAO1 s'accompagne d'un marquage précoce pour IL17, dans l'épithélium et les cellules inflammatoires dès J1, puis à J14 uniquement dans l'épithélium.

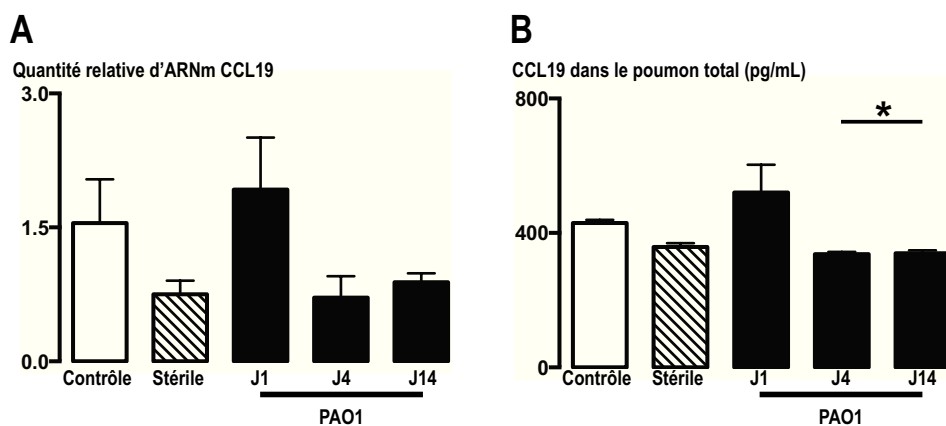


FIGURE 3.15 – Expression de CCL19 en réponse à l'infection prolongée à PAO1. Les souris non instillées (Contrôle, histogrammes blancs) ou instillées avec des billes stériles (histogrammes hachurés) ont été comparées avec des souris ayant reçu une instillation unique de billes contenant du PAO1 et sacrifiées à différents jours (J) post instillation (histogrammes noirs). L'infection par PAO1 n'entraîne pas d'augmentation significative de l'ARNm (A) ou la protéine (B) de CCL19 dans le poumon total.

Chapitre 4

Discussion

Les travaux effectués dans notre laboratoire indiquent qu'il existe une néogenèse lymphoïde intrapulmonaire chez les patients adultes atteints de mucoviscidose au stade de la transplantation pulmonaire. Cette néogenèse lymphoïde est aussi observée dans les poumons de patients atteints de DDB non mucoviscidosiques, suggérant que la néogenèse lymphoïde n'est pas directement liée à la dysfonction de la protéine CFTR. Nous avons émis l'hypothèse d'un rôle pour l'infection bactérienne chronique dans la néogenèse lymphoïde dans ces pathologies. Notre travail a permis de montrer que l'infection bronchique prolongée par le *Pseudomonas aeruginosa* (bactérie à Gram négatif) ou à *Staphylococcus aureus* (bactérie à Gram positif), induit en 14 jours une néogenèse lymphoïde sous-épithéliale caractérisée par la présence de follicules contenant des centres germinatifs. Ces follicules sont localisés en regard des zones d'infection, avec un poumon à distance qui reste normal ; ils sont associés à une expression épithéliale de chimiokines. L'infection bactérienne induit également l'expression des principales chimiokines impliquées dans la néogenèse lymphoïde (CXCL12, CXCL13, CCL19 et IL17) mais l'inhibition sélective de CXCL12 ou CXCL13 n'entraîne pas d'inhibition de la néogenèse lymphoïde. Néanmoins, nos modèles expérimentaux permettent l'étude des méca-

nismes de la néogenèse lymphoïde (formation des follicules lymphoïdes) et d'une éventuelle résolution de l'inflammation folliculaire lors de l'infection bactérienne chronique

4.1 Données humaines sur la néogenèse lymphoïde dans les bronchopathies chroniques

Le travail mené au sein du laboratoire a montré une augmentation significative du nombre de follicules lymphoïdes péribronchiques dans les poumons de patients atteints de dilatations de bronches, mucoviscidosiques ou non (Marie-Noëlle Lothe-Cartier, travail de master 2). Ces données ont été obtenues d'une part sur des explants pulmonaires de patients atteints de mucoviscidose, d'autre part sur des pièces de résection chirurgicale de dilatations de bronches. Dans la mucoviscidose, les amas de lymphocytes B CD20+ étaient présents sous l'épithélium des voies respiratoires. Jusqu'à présent, les cellules de l'immunité innée ont été peu étudiées dans la mucoviscidose et les DDB, et ce sont plutôt les cellules de l'immunité innée (macrophages et neutrophiles) qui ont été impliquées dans ces pathologies [20, 30]. Gaga a montré la présence de lymphocytes T dans les biopsies bronchiques de certains patients adultes atteints de DDB non mucoviscidosiques mais les prélèvements dans cette étude étaient des biopsies bronchiques de petite taille et il n'était pas fait état d'un infiltrat significatif de lymphocytes B [40]. Dans l'étude de Regamey ayant porté chez l'enfant atteint de mucoviscidose, des lymphocytes sous-épithéliaux ont été retrouvés, dont 82% étaient des lymphocytes T [112]; le nombre de lymphocytes T était augmenté en cas d'infection à *Pseudomonas aeruginosa*, mais pas celui des lymphocytes B. L'existence d'amas de lymphocytes B dans la mucoviscidose a été montrée uniquement au stade de la transplantation pulmonaire, alors que les poumons fœtaux ne contiennent pas de

follicules lymphoïdes [52, 53]. Ces données, bien que parcellaires, suggèrent l'implication de l'immunité acquise dans l'inflammation de la mucoviscidose et des DDB. Nos résultats constituent la première description de follicules lymphoïdes fonctionnels, avec des zones B et T distinctes, des cellules dendritiques folliculaires (FDC) et des centres germinatifs dans la mucoviscidose et les DDB. Les patients atteints de mucoviscidose présentaient toutefois une maladie sévère, avec un VEMS moyen à 22% de la valeur prédite. Nos données confirment les résultats de Whitwell qui retrouvaient des follicules lymphoïdes à l'autopsie chez certains patients atteints de DDB (bronchiolite folliculaire) [144]; dans la description de Whitwell, les amas lymphoïdes étaient situés au niveau des bronches et bronchioles, mais également au niveau des alvéoles. Nos données permettent également de montrer pour la première fois que ces follicules lymphoïdes comportent les éléments caractéristiques des organes lymphoïdes tertiaires, qui indiquent leur fonctionnalité immunologique. Compte tenu de données comparables chez les patients atteints de mucoviscidose et ceux atteints de DDB, nous avons émis l'hypothèse d'un rôle de l'infection bactérienne chronique dans la néogenèse lymphoïde. Cette hypothèse a été testée en analysant l'effet de l'infection bactérienne chronique à *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* chez la souris.

4.2 Modèles animaux

Nous avons étudié deux types de bactéries vivantes, à Gram positif et à Gram négatif. Ces bactéries présentent des différences structurales au niveau de l'enveloppe bactérienne, avec la présence d'une membrane externe chez les bactéries à Gram négatif, membrane contenant du lipopolysaccharide; chez les bactéries à Gram positif, il n'y a pas de membrane externe mais du peptidoglycane en grande

quantité au niveau de la paroi. Ces deux types de bactéries induisent donc des réactions immunitaires différentes, notamment au niveau de l'immunité innée, du fait de la présence de motifs de reconnaissance différents. Malgré ces différences structurelles, nous avons montré pour la première fois que l'infection prolongée par PAO1 ou *S. aureus* induit une néogenèse lymphoïde en 14 jours, avec dans les deux cas un marquage épithélial pour la protéine CXCL13 et un marquage neutrophilique pour la protéine CXCL12.

Une publication ancienne rapporte l'existence la présence de tissu lymphoïde hyperplasique autour des bronches dans un modèle d'infection bronchique prolongée à *Pseudomonas aeruginosa* [60]. L'étude a été réalisée avec une suspension de billes d'agarose contenant une souche clinique mucoïde de *P. aeruginosa*, instillée directement dans la trachée après mise à nu de celle-ci, à raison de 10^6 CFU par animal. Les auteurs constatent également la présence de centres germinatifs et d'HEV. Cette étude a toutefois été menée chez le rat, espèce dont le poumon présente des follicules lymphoïdes à l'état basal [100] et n'a pas, probablement pour des raisons techniques, déterminé avec certitude la présence de zones séparées de lymphocytes B et T. Jusqu'à présent, les autres données concernant la néogenèse lymphoïde intrapulmonaire induite par des stimuli infectieux ont utilisé des stimuli viraux (virus grippal, virus MVA), *Mycobacterium tuberculosis*, ou du lipopolysaccharide (LPS, produit issu de bactéries pyogènes) [37,65,109,141]. Une étude récente a utilisé du *P. aeruginosa* inactivé (deux instillations à une semaine d'intervalle) [37]. L'avantage de notre modèle est, outre l'utilisation de bactéries vivantes, l'instillation unique de billes d'agarose infectées. Cela permet un suivi cinétique de l'inflammation induite par l'infection et permet d'obtenir une infection endobronchique focale, dans les billes ; les follicules sont localisés autour des billes avec un poumon plus à distance normal.

Nos données indiquent un recrutement très précoce des lymphocytes B lors du début

l'infection bactérienne (dès J1), qui s'accroît lors des deux premières semaines de l'infection, et qui est suivi à partir de J4 d'un recrutement de lymphocytes T avec une organisation en follicules lymphoïdes entre le 7^{ème} et le 14^{ème} jour. Cet afflux très précoce et important de lymphocytes B observé en réponse à l'infection bactérienne suggère que le *primum movens* de la néogenèse lymphoïde est le recrutement de lymphocytes B.

4.3 Possible rôle de l'épithélium bronchique dans la néogenèse lymphoïde

Dans nos études animales, les follicules lymphoïdes sont localisés autour des bronches infectées (contenant des billes d'agarose). Ces données suggèrent une reconnaissance des produits bactériens situés dans la lumière bronchique, par l'épithélium respiratoire, possiblement via les récepteurs Toll-like (TLR). Elles suggèrent que la cellule épithéliale joue un rôle prépondérant dans le recrutement des lymphocytes B et T et la néogenèse lymphoïde. Jusqu'à présent, les études utilisant des stimuli microbiens (virus, bactéries inactivées. . .) décrivaient la présence de follicules lymphoïdes intrapulmonaires, sans définir précisément leur localisation. Il restait, en particulier, impossible de lier la localisation de l'agent infectieux et du follicule lymphoïde. L'expression précoce et persistante de CXCL13 par l'épithélium bronchique en réponse à l'infection chronique à *P. aeruginosa* et *S. aureus* est également en faveur d'un rôle de l'épithélium. Ces données sont concordantes avec celles de l'étude de Baay-Gunzman, où il était également retrouvé, outre l'absence d'expression de CXCL13 par l'épithélium à l'état basal, une induction de l'expression de CXCL13 par l'épithélium bronchique suivie d'une néogenèse lymphoïde en réponse à un challenge à l'ovalbumine (modèle d'asthme) [7]. En revanche, les auteurs ne fournissent de données dans cette étude qu'à un seul temps d'étude (J26)

correspondant au temps auquel les follicules lymphoïdes sont observés dans ce modèle. Ces données sont également concordantes avec celles montrant l'expression de CXCL13 dans l'épithélium cornéen en réponse à l'infection par le virus *Herpes simplex* [6]. Dans le modèle d'exposition à la fumée de cigarette, les auteurs ne présentent pas de données se rapportant spécifiquement à l'expression épithéliale de CXCL13 mais les photos disponibles dans l'article ne semblent pas en montrer [12]. En pathologie humaine, CXCL13 est aussi retrouvé dans l'épithélium des patients atteints de mucoviscidose (Marie-Noëlle Lothe-Cartier, travail de Master 2). Bien évidemment, d'autres chimiokines peuvent sans doute contribuer au recrutement des lymphocytes, produites par l'épithélium respiratoire ou par d'autres structures.

4.4 Mécanismes de la formation des follicules lymphoïdes

Compte tenu du rôle de CXCL13 et/ou de CXCL12 dans la néogenèse lymphoïde induite par des stimuli infectieux [37], par la fumée de cigarette [12], ou par l'ovalbumine [7], nous avons étudié le rôle de ces deux chimiokines dans la néogenèse lymphoïde induite par l'infection bactérienne chronique. Le prétraitement de souris par un anticorps anti CXCL13 suivi d'une infection chronique à *Pseudomonas aeruginosa* n'a pas empêché l'apparition de follicules lymphoïdes. Ces données diffèrent de celles obtenues avec une stimulation par la fumée de cigarette, ou par l'ovalbumine, dans lesquelles le prétraitement des animaux par un anticorps anti CXCL13 prévenait l'apparition des follicules lymphoïdes [7, 12]. Elles sont cependant en accord avec le fait que les souris déficientes (knock-out) pour CXCL13 présentent des follicules lymphoïdes normaux en réponse à l'infection par le virus grippal [93, 111].

Fleige a suggéré dans un article récent que la néogenèse lymphoïde induite par l'infection virale (virus MVA) soit dépendante de CXCL13, alors que celle induite par l'instillation répétée de *Pseudomonas aeruginosa* inactivé soit indépendante de CXCL13. Cette affirmation était liée à l'absence d'identification de CXCL13 et de cellules dendritiques folliculaires (FDC) dans les follicules induits par le *Pseudomonas aeruginosa* inactivé. Nos résultats confirment que l'inhibition de CXCL13 est insuffisante à empêcher la néogenèse lymphoïde induite par *Pseudomonas aeruginosa*, néanmoins une différence majeure entre notre étude et celle de Fleige est la constatation d'une expression importante de CXCL13 dans l'épithélium bronchique et les follicules lymphoïdes, et un recrutement de FDC. Il semble donc qu'il existe des différences importantes de structure des follicules lymphoïdes en fonction des caractéristiques du stimulus bactérien utilisé (*Pseudomonas aeruginosa* vivant versus *Pseudomonas aeruginosa* inactivé). Par ailleurs, il existe des différences de phénotype bactérien, notamment de virulence, entre les souches de *Pseudomonas*, pouvant expliquer les différences observées en termes de réaction inflammatoire et de chimiokines mises en jeu. Les études de Baay-Gunzman et Bracke, quant à elles, utilisaient des stimuli non infectieux (fumée de cigarette et ovalbumine).

Dans notre étude, le prétraitement des animaux par un anticorps anti CXCL12 n'a pas non plus empêché l'apparition des follicules lymphoïdes induits par *Pseudomonas aeruginosa*, alors que Fleige et coll. avaient rapporté que le prétraitement des souris par un anticorps anti CXCL12, administré aux mêmes doses, avait inhibé la néogenèse lymphoïde induite par du *Pseudomonas aeruginosa* inactivé. Les différences entre ces deux études pourraient être liées soit à des différences méthodologiques, soit à des mécanismes différents de la néogenèse lymphoïde en fonction du stimulus utilisé. Il serait donc intéressant d'inhiber de façon simultanée CXCL12 et CXCL13 dans notre modèle et de voir si cela permet d'inhiber efficacement la néogenèse lymphoïde. Des études complémentaires seront donc né-

cessaires pour conclure sur ce point.

Compte tenu du rôle important du récepteur de l'EGF dans la réponse à l'infection à *Pseudomonas aeruginosa* [18], nous avons testé l'effet du gefitinib, un inhibiteur de la tyrosine kinase de l'EGFR sur la néogenèse lymphoïde induite par *Pseudomonas aeruginosa*. Malgré l'utilisation d'une dose de 150 mg/kg/j, dont il a été montré qu'elle permet d'inhiber efficacement la voie de l'EGFR [46], et l'existence dans notre d'une inhibition de la phosphorylation du récepteur de l'EGF, le pré-traitement des souris n'a pas empêché l'apparition de follicules lymphoïdes induite par l'infection à *Pseudomonas aeruginosa*.

A ce stade, nos données ne permettent donc pas d'identifier les mécanismes moléculaires de formation des follicules lymphoïdes en réponse à l'infection bactérienne. Néanmoins, nos modèles expérimentaux offrent l'opportunité de l'étude des mécanismes de la formation des follicules lymphoïdes, soit en utilisant des souris modifiées génétiquement, soit par une modulation pharmacologique à l'aide d'anticorps ou de petites molécules. Les principaux candidats potentiellement impliqués dans la néogenèse lymphoïde sont IL17, impliqué dans la néogenèse lymphoïde dans l'étude de Fleige [37], le B-cell Activating Factor (BAFF), et son corollaire a proliferation-inducing ligand (APRIL), ces deux derniers étant possiblement impliqués dans la néogenèse lymphoïde de la BPCO [106] et ayant également une action de costimulation sur les lymphocytes T [77]. Là encore, des études complémentaires seront nécessaires pour évaluer le rôle potentiel de ces molécules dans la néogenèse lymphoïde induite par l'infection bactérienne chronique. Lors de nos études, l'ins-tillation unique de bactéries vivantes enrobées dans des billes d'agarose a permis le développement de follicules lymphoïdes en 14 jours. Nos données indiquent que ces follicules lymphoïdes persistent pendant au moins un mois après l'infection initiale, avec un nombre d'amas lymphoïdes B et T statistiquement stable entre J14 et J28. Les mécanismes de la persistance des follicules lymphoïdes restent à

ce jour non étudiés. Ces modèles offrent la possibilité de proposer une modulation pharmacologique de la persistance des follicules lymphoïdes dans les poumons. Par exemple, des expériences proposant l'administration de petites molécules ou d'anticorps monoclonaux après l'apparition des follicules lymphoïdes pourraient permettre de mieux comprendre le rôle de ces follicules lymphoïdes dans l'immunité anti-infectieuse.

La néogenèse lymphoïde dans notre modèle s'associe à une inflammation endoluminale importante et évolutive au cours du temps. Ainsi, dans les premiers temps, on observe un recrutement de cellules de l'immunité innée, puis progressivement l'apparition de cellules de l'immunité acquise. Cette modification du type de cellules immunitaires, avec par la suite la persistance de cellules de l'immunité adaptative associée aux follicules lymphoïdes matures est en faveur de la persistance d'une réaction active à l'infection bactérienne, et non de l'acquisition d'une tolérance immunitaire.

Il serait également intéressant d'étudier l'effet d'autres traitements fréquemment utilisés dans la mucoviscidose et les DDB non mucoviscidosiques et plus particulièrement :

- des antibiotiques, qui sont administrés à ces malades sous forme de cures itératives par voie générale, mais également au long cours sous forme inhalée chez 38,9% des patients atteints de mucoviscidose en France [142]. Cette administration au long cours pourrait avoir un impact sur la néogenèse lymphoïde induite par l'infection bactérienne chronique.
- des corticoïdes, qui sont administrés en France par voie orale chez environ 10% des patients atteints de mucoviscidose, et par voie inhalée chez presque 40% d'entre eux [142]. Dans la BPCO, il existe des données suggérant un excès de risque de pneumopathies infectieuses chez les patients sous corti-

coïdes inhalés, sans que ce risque soit clairement quantifié [35].

- des macrolides, qui permettent de diminuer le nombre d'exacerbations de la bronchopathie sous-jacente, avec ou sans colonisation à *Pseudomonas aeruginosa* [4, 24, 119, 120, 126, 146], et dont l'effet pourrait passer par une action immunomodulatrice et antiinflammatoire [33, 51, 58, 59, 61, 64, 121, 134, 148]. Une étude a évalué l'effet de l'azithromycine sur l'inflammation dans un modèle d'infection bronchique utilisant des billes d'agarose contenant du *Pseudomonas*, mais l'étude n'a pas été menée au delà de trois jours d'infection et ne permet donc pas de juger de l'effet de l'azithromycine sur la néogenèse lymphoïde [135].

4.5 Forces et faiblesses de l'étude

Nos données ont porté sur l'analyse de poumons humains de patients atteints de mucoviscidose au stade de la greffe, comparés à des patients ayant des dilatations de bronches non mucoviscidiques ou des témoins non fumeurs. La présence de follicules lymphoïdes chez les patients est un élément majeur confirmant la pertinence d'étudier les mécanismes de la néogenèse lymphoïde dans le contexte infectieux chronique caractéristique de la mucoviscidose et des dilatations de bronches. Une limitation évidente de ces études humaines, outre le nombre relativement faible de prélèvements disponibles, est liée aux caractéristiques des malades qui présentent une maladie très évoluée. Pour des raisons éthiques, il est néanmoins impossible d'obtenir des prélèvements pulmonaires chez des patients atteints de mucoviscidose ou de dilatations de bronches moins évoluées : ces patients ne font pas l'objet de résections pulmonaires et l'étude de biopsies bronchiques est consi-

dérée comme dangereuse du fait du risque d'hémoptysie massive [17]. Concernant les études animales, nos données se sont focalisées sur une bactérie à Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa*) et une bactérie à Gram positif (*Staphylococcus aureus*), qui sont les deux principales bactéries en cause dans la mucoviscidose. Le rôle des autres bactéries fréquemment en cause dans ces pathologies (notamment *Haemophilus influenzae* ou *Streptococcus pneumoniae*) et de la virulence propre à chaque souche bactérienne reste à ce jour non étudié. Par ailleurs, l'utilisation de billes d'agarose comme vecteur de prolongation de l'infection nécessite de toujours comparer les animaux à des animaux instillés avec des billes stériles.

Les données obtenues lors des tentatives de modulation pharmacologique de la néogenèse lymphoïde induite par *Pseudomonas aeruginosa* sont d'interprétation non univoque. Lors du traitement par gefitinib, nous avons montré une inhibition de la phosphorylation du récepteur de l'EGF, confirmant la neutralisation de la cible thérapeutique. Néanmoins l'obtention de données comparables n'a pas été possible lors de l'utilisation des anticorps anti CXCL12 et anti CXCL13, pour lesquels aucun marqueur de neutralisation de la cible thérapeutique n'était disponible. Néanmoins, les doses utilisées ont été choisies comme égales ou plus élevées à celles inhibant la néogenèse lymphoïde intrapulmonaire dans d'autres modèles expérimentaux [7, 12]. Il ne semble toutefois pas possible d'administrer des doses plus importantes aux souris, pour des raisons de tolérance (volume administrable en intrapéritonéal) et de coût. Notons par ailleurs que dans l'étude de Baay-Gunzman, l'anticorps anti CXCL13 était administré par voie intratrachéale, ce qui ne permet pas de comparer de façon effective les doses d'anticorps utilisées. L'absence d'effet des anticorps anti CXCL12 et CXCL13 sur la néogenèse lymphoïde induite par *Pseudomonas aeruginosa* peut donc être interprétée soit comme une inhibition insuffisante de la cible thérapeutique, soit comme l'absence d'implication de ces molécules dans la néogenèse lymphoïde, soit comme l'existence de mécanismes

redondants dans lesquels l'inhibition d'une seule chimiokine ne suffit pas à inhiber le recrutement des lymphocytes et la néogenèse lymphoïde. Des données récentes obtenues dans notre laboratoire indiquent que le prétraitement des souris par des anticorps anti CD20 spécifiques de la souris inhibe complètement la formation des follicules lymphoïdes sans surmortalité, suggérant un rôle important pour les lymphocytes B dans la néogenèse lymphoïde.

Ces données indiquent que l'infection bactérienne chronique est suffisante pour induire une néogenèse lymphoïde et sont pertinentes dans la mucoviscidose, les DDB non mucoviscidosiques, la BPCO (maladie dans laquelle les patients les plus sévères sont ceux ayant le plus de follicules lymphoïdes mais également le plus fréquemment une infection bactérienne chronique), mais aussi chez les malades ayant un déficit immunitaire commun variable (DICV), et chez les malades ayant une polyarthrite rhumatoïde, qui ont fréquemment une bronchopathie avec une infection bactérienne chronique. Une limite de notre étude est toutefois l'absence d'élucloration du rôle de ces follicules dans l'infection bactérienne prolongée : sont-ils uniquement anti infectieux, protecteurs ou peuvent-ils être délétères à long terme ? Il semble en effet que leur rôle ne soit pas univoque selon les maladies. Ainsi, les patients atteints de cancer bronchique non à petites cellules et présentant des follicules lymphoïdes en quantité augmentée présentent une meilleure survie [29] et les souris déficientes pour CCR7 présentent des follicules lymphoïdes et une atteinte moins sévère de fibrose pulmonaire en réponse à la bléomycine [133]. La constatation de follicules lymphoïdes dans le DICV et la polyarthrite rhumatoïde a souvent été considérée comme un mécanisme immunologique propre à la maladie, alors qu'ils pourraient être simplement la conséquence de l'exposition aux agents infectieux. Dans la BPCO, leur rôle n'est pas clair car des phénomènes auto-immuns ont déjà été suggérés dans cette maladie et les follicules lymphoïdes pourraient ainsi contribuer à l'aggravation des lésions [16]. Ces hypothèses sont cependant étudiables

dans notre modèle en inhibant la formation des follicules lors d'une infection par un anticorps anti CD20, ou en modulant la persistance des follicules lymphoïdes, et en regardant les effets sur le remodelage bronchique.

4.6 Perspectives

Comme nous l'avons plus haut, notre modèle permet l'étude des mécanismes de formation et de maintenance des follicules lymphoïdes intrapulmonaires, et pourrait permettre de contribuer à élucider leur rôle dans les bronchopathies chroniques. Ainsi, il serait intéressant d'étudier la spécificité des anticorps et des lymphocytes B et T produits en réponse à cette infection bactérienne, pour rechercher l'apparition de phénomènes autoimmuns pouvant contribuer au remodelage bronchique. Ceci pourrait être réalisé soit par des techniques de microdissection laser, permettant d'isoler les follicules, soit en utilisant le poumon total prélevé au moment du sacrifice de l'animal, et en isolant les lymphocytes B et T par triage cellulaire. Ces lymphocytes pourraient ensuite être mis en présence d'antigènes, bactériens ou non, afin de déterminer leur spécificité.

Par ailleurs, la localisation des follicules en regard des zones d'infection, et systématiquement sous l'épithélium, rappelle les données de l'étude de Salmon et coll., qui a montré que la migration des lymphocytes T dans le stroma des tumeurs pulmonaires humaines était influencée par l'architecture de la matrice extracellulaire [122]. Il serait intéressant d'étudier les remaniements de la matrice extracellulaire induits par l'infection bactérienne, et leur rôle dans la néogenèse lymphoïde.

Chapitre 5

Conclusion

Notre travail indique que l'infection bactérienne chronique par *P. aeruginosa* ou *S. aureus* suffit à induire une néogenèse lymphoïde intrapulmonaire en 14 jours. La localisation péribronchique des follicules lymphoïdes, ainsi que l'expression épithéliale des chimiokines lymphocytaires suggèrent un rôle pour l'épithélium respiratoire dans la néogenèse lymphoïde en réponse à l'infection bactérienne. Si les mécanismes de la formation et de la persistance des follicules lymphoïdes dans le poumon lors de l'infection bactérienne chronique restent non identifiés, les modèles expérimentaux mis au point dans ces études permettent d'envisager l'étude de ces mécanismes et de disséquer le rôle des follicules lymphoïdes dans la pathogénie des bronchopathies chroniques. Ces données contribueront à une meilleure compréhension de la physiopathologie des dilatations de bronches, de la mucoviscidose et des autres bronchopathies chroniques (asthme et BPCO). La poursuite de l'étude des mécanismes de la néogenèse lymphoïde liée à l'infection bactérienne chronique pourrait permettre à terme de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques de modulation de cette néogenèse dans les bronchopathies chroniques.

Chapitre 6

Annexes

6.1 Avis du comité d'éthique animale



Paris, le 7 Février 2013

Pierre-Régis BURGEL

UPRES EA 2511

Faculté de médecine Cochin-Port Royal

24 rue Faubourg Saint-Jacques

75014 PARIS

AVIS SUR LE DOCUMENT DE SAISINE DU CEEA DEPOSE PAR PIERRE-REGIS BURGEL

Saisine : **12-87**

Date de saisine : **07/11/2012**

Titre du projet : « **Immunopathologie de l'infection bactérienne bronchopulmonaire chronique chez la souris** »

L'objectif du projet est de **contribuer à élucider les mécanismes des relations hôte-pathogène, au cours de l'infection chronique des voies aériennes inférieures par des bactéries fréquemment isolées dans les sécrétions respiratoires, chez les patients atteints de maladies bronchopulmonaires chroniques**, afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Un modèle d'infection bronchopulmonaire chronique, par instillation intratrachéale de billes d'agarose (300-400µm) contenant la souche de *Pseudomonas aeruginosa* O1 (5.10^5 CFU par souris), a pour cela été développé chez la souris.

- La taille des billes a été choisie pour qu'elles se localisent préférentiellement dans les bronches. Des études antérieures ont permis de déterminer la quantité de bactéries à inoculer pour obtenir une infection chronique, sans surmortalité précoce. 150µl d'une solution de billes d'agarose à 20% dans du PBS (stériles ou contenant la souche bactérienne) sont injectées directement dans la trachée de souris anesthésiées par l'injection intrapéritonéale de 0,1 ml/10g d'un mélange de Kétamine (15 mg/ml) et Xylazine (2 mg/ml) à l'aide d'une canule à pointe arrondie, introduite à l'entrée de la trachée.
- La souris anesthésiée est observée attentivement, une augmentation de sa fréquence respiratoire témoignant du succès de l'instillation intratrachéale.
- Les souris sont ensuite placées dans une chambre contenant un air enrichi en oxygène et surveillées jusqu'aux premiers signes de réveil (mouvements spontanés).
- Les souris sont alors placées dans des cages propres sur des portoirs ventilés à raison de 4 à 5 animaux par cage selon leur taille. Les animaux sont observés quotidiennement.
- Compte tenu de l'infection par un pathogène de groupe 2 classe 2, les animaux sont hébergés au sein de la zone « A2 » de l'animalerie du site Cochin, sur portoir ventilé, et manipulés sous Poste de Sécurité Microbiologique (PSM) de type 2.

Président : Daniel ZYTNICKI

Adresse : Laboratoire de Neurophysique et Physiologie (UMR 8119)

Université Paris Descartes - 45, rue des Saints-Pères

75270 Paris Cedex 06

Tel : 01 42 86 22 85

Email : daniel.zytnicki@parisdescartes.fr

- Les animaux seront sacrifiés 1, 4, 7, 14 ou 28 jours plus tard, par injection intra-péritonéale d'une forte dose d'anesthésiant (mélange Xylazine-Kétamine, 0,3 ml/10g de poids), afin de prélever les poumons pour analyse bactériologique et histologique, ainsi que pour l'extraction d'ARN et de protéines.

Plusieurs axes de recherche seront développés, nécessitant l'utilisation de différentes souches de souris.

1. Le premier axe consistera à caractériser les cellules impliquées dans l'immunité innée et adaptative, ainsi que l'interaction hôte-pathogène par analyse histologique et immunomarquage de coupes de poumons.
2. Le deuxième axe aura pour but d'identifier les chimiokines impliquées dans la formation des organes lymphoïdes tertiaires, observés dans les poumons infectés chroniquement par RT-PCR après microdissection laser des zones d'intérêt. Ces études seront réalisées sur 2 groupes de 100 souris C57Bl/6, obtenues auprès d'un fournisseur agréé (Harlan France).
3. Le troisième axe aura pour but de déterminer le rôle du récepteur de l'Epidermal Growth Factor (EGFR) dans la formation de ces organes lymphoïdes. Pour cela, l'inhibiteur de l'EGFR (erlotinib ou gefitinib), ou l'excipient seul, sera administré quotidiennement per os à des souris C57BL/6 infectées par *Pseudomonas aeruginosa* (50 souris par groupe).
4. Le quatrième axe consistera à étudier le développement de l'immunité innée dans un modèle de mucoviscidose, chez lequel a été décrit un défaut d'apoptose des neutrophiles pulmonaires. Seront pour cela utilisées 100 souris porteuses d'une invalidation du gène CFTR.
5. Le cinquième axe aura pour but de déterminer l'importance des gènes de survie du neutrophile en utilisant des souris invalidées pour le gène codant la protéine PR3 ou la protéine P21 (100 souris chacun).
6. Le sixième et dernier axe portera sur l'étude de l'interaction entre l'épithélium pulmonaire et les cellules inflammatoires. 100 souris porteuses d'une invalidation du gène codant le récepteur TOLL seront pour cela utilisées.

Le nombre total d'animaux est donc de 700.


L'estimation de la souffrance est "faible".

Les procédures expérimentales sont réalisées dans de bonnes conditions, sans souffrance pour l'animal. Les modes d'anesthésie, d'euthanasie et de prélèvement sont bien décrits et sont adaptés au protocole. Les animaux infectés sont surveillés quotidiennement. Les animaux présentant des signes de détresse respiratoire seront sacrifiés.

Le nombre important d'animaux est justifié par la durée du projet et le nombre des souches utilisées et permettra l'obtention de résultats statistiquement significatifs.

En conclusion, le comité estime que ce projet et ses procédures expérimentales ne soulève pas de problème d'ordre éthique. Le présent avis est enregistré sous le n° **CEEA34.PRB.135.12**. Cet avis est valable jusqu'au **6 février 2016**.

The work entitled "**Immunopathologie de l'infection bactérienne bronchopulmonaire chronique chez la souris**" has been submitted for ethical evaluation to the Paris-Descartes Ethics Committee for Animal Research by **PIERRE-REGIS BURGEL**. It was approved by the Committee and its registered number is **CEEA34.PRB.135.12**. This decision is valid until **February 6, 2016**.



Daniel Zytnecki, Président du Comité

6.2 Article soumis à l'European Respiratory Journal



Bacteria-driven peribronchial lymphoid neogenesis in bronchiectasis and cystic fibrosis

Journal:	<i>European Respiratory Journal</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Frija-Masson, Justine; Cochin Hospital, APHP, Pulmonary Department and Adult CF Centre Martin, Clémence Regard, Lucile Lothe, Marie-Noelle Touqui, Lhousseine; Institut Pasteur, Durand, Aurelie Lucas, Bruno Damotte, Diane Alifano, Marco Fajac, Isabelle BURGEL, Pierre-Régis; Cochin Hospital, APHP, Pulmonary Department and Adult CF Centre
Key Words:	B lymphocytes, T lymphocytes, inducible bronchus-associated lymphoid tissue (iBALT), airway epithelium, CXCL12, CXCL13

**SITE COCHIN**

27, rue du Fg Saint-Jacques
75679 PARIS Cedex 14
Standard : 01 58 41 41 41

SERVICE DE PNEUMO-PHTISIOLOGIE
Centre de Mucoviscidose (CRCM)
Chef de Service :

Pr. Daniel DUSSER
Secrétariat : 01 58 41 23 71
Télécopie : 01 46 33 82 53

Adjoint au Chef de Service

Pr. Pierre-Régis BURGEL
Secrétariat : 01 58 41 23 67

Praticiens Hospitaliers :

Dr. Isabelle HONORÉ
Secrétariat : 01 58 41 23 74
Dr. Dominique HUBERT
Secrétariat : 01 58 41 23 63
Dr. Reem KANAAN
Secrétariat : 01 58 41 23 95
Dr. Jacques LACRONIQUE
Secrétariat : 01 58 41 23 67

Chef de Clinique Assistants :

Dr. Jeanne CHAPRON
Dr. Nathalie COOLEN
Dr. Julie MACEY

Hôpital de jour :

Dr. Claire BOFFA
Secrétariat : 01 58 41 23 95
Poste infirmier : 01 58 41 23 79
Télécopie : 01 58 41 23 85

Hôpital de semaine :

Dr. Thach BUI-QUANG
Secrétariat : 01 58 41 23 74
Poste infirmier : 01 58 41 23 66
Télécopie : 01 58 41 29 77

Consultants :

Dr. Frédérique AUBOURG
(Consultation anti-tabac)
Dr. Jacqueline DARSE
Dr. Laurent LUCHON
Dr. Alain LURIE
Dr. Hugues SCHLEGEL

Centre de Mucoviscidose (CRCM)

Secrétariat : 01 58 41 23 63
Télécopie : 01 58 41 23 62
Infirmiers coordinateurs :
01 58 41 23 92 ou 90 ou 96
e-mail : muco.cochin@cch.aphp.fr

Allergologie :

Dr. Béatrice BIDET
Dr. Florina CARAT

Attachés d'Endoscopie :

Dr. Michel BOUNIOUX
Dr. Clémence MARTIN
Accueil – RV : 01 58 41 23 81
Télécopie : 01 58 41 23 75

Cadre Supérieur Infirmier : 01 58 41 23 76

Hospitalisation conventionnelle :

Accueil : 01 58 41 23 77
Télécopie : 01 58 41 23 65

Consultation :

Accueil – RV : 01 58 41 23 72
e-mail : consultation.pneumologie@cch.aphp.fr

Paris, Sep 22th 2016

Dear Sirs,

We are submitting a manuscript entitled “**Bacteria-driven peribronchial lymphoid neogenesis in bronchiectasis and cystic fibrosis**” by Frija-Masson et al. to be considered for publication in the European Respiratory Journal. This original manuscript contains novel findings and hasn't been submitted for publication elsewhere.

Although bronchiectasis and CF are usually characterized by chronic airway infection and exacerbated innate immune responses, studies have suggested that adaptive immune responses could contribute to the pathophysiology of these diseases. Tertiary lymphoid organs have been found in several airway diseases (e.g., severe asthma, COPD) but have not been reported in bronchiectasis or in CF.

In the present study, lymphocytic infiltration was characterized in the lungs of patients with bronchiectasis or with CF, as compared with control nonsmokers. Peribronchial lymphoid aggregates exhibiting the characteristics of tertiary lymphoid organs were present in patients with bronchiectasis and in those with CF. We then examined the effects of persistent airway infection by Gram-negative (*P. aeruginosa*) or Gram-positive (*S. aureus*) bacteria on lymphocyte recruitment and lymphoid neogenesis in mouse airways. Persistent bacterial infection with *P. aeruginosa* or *S. aureus* induced rapid recruitment of B lymphocytes followed by T lymphocytes around the infected airways. Within 14 days of infection, peribronchial lymphoid aggregates showed structural features that were characteristic of tertiary lymphoid organs. These data suggest that persistent bacterial infection contributes to the lymphoid neogenesis observed in chronic airway diseases. Localization of lymphoid aggregates adjacent to bead-containing airways suggested a role for airway epithelium in lymphoid neogenesis. This suggestion was further reinforced by the immunolocalization of CXCL12, CXCL13, and IL17A in airway epithelium. Our animal model provide a unique model for studying cellular and molecular mechanisms involved in the development of lymphoid aggregates and their persistence in the airways. Future studies should particularly focus on possible roles of airway epithelium in these processes.

It is our hope that this manuscript will be of interest to the readers of the Journal.

Sincerely yours,
Pierre-Régis Burgel, MD. PhD

1
2
3 **Title: Bacteria-driven peribronchial lymphoid neogenesis in bronchiectasis and cystic**
4
5 **fibrosis**

6
7 **Authors:** Justine Frija-Masson^{1,2,3}, Clémence Martin^{1,2,3}, Lucile Regard^{1,2,3}, Marie-Noëlle
8
9 Lothe^{1,2,3}, Lhousseine Touqui³, Aurélie Durand^{1,4,5}, Bruno Lucas^{1,4,5}, Diane Damotte^{1,6}, Marco
10
11 Alifano^{1,7}, Isabelle Fajac^{1,8}, Pierre-Régis Burgel^{1,2}
12
13
14

15 **Affiliations:**

16 ¹ Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France.

17 ² Service de Pneumologie, Hôpital Cochin, AP-HP, Paris, France.

18 ³ Paris Descartes University/Pasteur Institute Joint Research Unit. Pathobiology of cystic
19 fibrosis and chronic airway diseases. UPRES EA2511

20 ⁴ INSERM U1016, Institut Cochin, 75014 Paris, France;

21 ⁵ Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 8104, 75014 Paris,
22 France

23 ⁶ Service d'Anatomie Pathologique, Hôpital Cochin, AP-HP, Paris, France

24 ⁷ Service de Chirurgie Thoracique, Hôpital Cochin, AP-HP, Paris, France

25 ⁸ Service de Physiologie et Explorations Fonctionnelles, Hôpital Cochin, AP-HP, Paris,
26 France.
27
28

29
30
31 **Corresponding author:** Pierre-Régis Burgel MD, PhD
32 27, rue du Faubourg Saint Jacques
33 75014 Paris, France.
34 Tel : + 33 1 58 41 23 67
35 Fax : +33 1 46 33 82 53
36 E-mail: pierre-regis.burgel@aphp.fr
37
38

39
40 **Take home message:** Bacterial infection-induced peribronchial lymphoid neogenesis in
41 bronchiectasis and in CF may involve airway epithelium.
42
43
44
45

46 **Keywords:** B lymphocytes, T lymphocytes, inducible bronchus-associated lymphoid tissue
47 (iBALT), airway epithelium, CXCL12, CXCL13
48
49

50
51 **Word count:** 2829

52
53 **Figures and Tables:** 6
54
55
56
57
58
59
60

Abstract

We aimed to characterize lymphoid neogenesis in bronchiectasis and cystic fibrosis (CF) lungs and to examine the role of bacterial infection.

Lymphoid aggregates were examined using immunohistochemical staining and morphometric analysis in surgical lung sections obtained from nonsmokers, and patients with bronchiectasis or CF. Sterile, *P. aeruginosa* (PA)- or *S. aureus* (SA)-coated agarose beads were instilled intratracheally in mice. Kinetics of lymphoid neogenesis and chemokine expression were examined over 14 days.

Lymphoid aggregates were scarce in human lungs of nonsmokers, but numerous peribronchial lymphoid aggregates containing B lymphocytes, T lymphocytes, germinal centers and high endothelial venules were found in bronchiectasis and CF. Mouse lungs contained no lymphoid aggregate at baseline. During persistent PA- or SA-airway infection peribronchial lymphoid neogenesis occurred. At day 14 after instillation, lymphoid aggregates expressed markers of tertiary lymphoid organs and the chemokines CXCL12 and CXCL13. The airway epithelium was an important site of CXCL12, CXCL13 and IL17A expression, which began at day 1 after instillation.

Peribronchial tertiary lymphoid organs are present in bronchiectasis and in CF, and persistent bacterial infection triggered peribronchial lymphoid neogenesis in mice. Peribronchial localization of tertiary lymphoid organs and epithelial expression of chemokines suggest roles for airway epithelium in lymphoid neogenesis.

Introduction

Chronic bacterial infection is the hallmark of lung disease in patients with bronchiectasis¹ and in those with cystic fibrosis (CF)². Bacterial infection by Gram-negative (e.g., *P. aeruginosa*) and/or Gram-positive (e.g., *S. aureus*) promotes airway inflammation and structural damage, contributing to disease progression in both diseases^{3, 4}. Host-pathogen interaction studies in these diseases have often focused on innate immune responses, involving airway epithelial responses and recruitment of phagocytes (e.g., neutrophils and macrophages)^{3, 5}. However, bronchial biopsies obtained in patients with bronchiectasis showed a subepithelial infiltrate that was mostly composed of mononuclear cells, which were characterized as being predominantly T lymphocytes^{6, 7}. Moreover, a study of bronchial biopsies in CF children has shown that in contrast to the neutrophil-dominated inflammation present in the airway lumen, lymphocytes accumulate in the bronchial mucosa⁸. These data suggest that the adaptive immune response also contributes to the pathophysiology of bronchiectasis and CF.

The adaptive immune response is initiated in secondary lymphoid organs, such as lymph nodes and the spleen, in which T and B lymphocytes clonally expand and are then recruited to the site of inflammation⁹. Secondary lymphoid organs develop during embryogenesis, but ectopic lymphoid structures, exhibiting structural similarities with secondary lymphoid organs (and called tertiary lymphoid organs) can develop at the mucosal surface after birth⁹⁻¹¹. Tertiary lymphoid organs are not present in normal lungs¹² but have been described in the lungs of subjects with chronic airway diseases including asthma¹³ and chronic obstructive pulmonary disease¹⁴, and in lung cancer^{15, 16}. Although lymphoid aggregates have long been described in some patients with bronchiectasis¹⁷ and in patients with severe CF¹⁸, it remains unknown whether these aggregates are organized into tertiary lymphoid organs, containing

1
2
3 distinct B and T cell areas, and germinal centers in which antigen-specific adaptive immune
4 responses can be initiated ^{10, 19}.

5
6
7 Animal studies have shown that pulmonary tertiary lymphoid organs can be induced by
8 stimuli relevant to chronic airway diseases, including allergen ²⁰, cigarette smoke ²¹, viral
9 infection ²² and repeated airway challenges with bacterial products ^{23, 24} or heat-inactivated
10 bacteria ²⁵. However, it remains unclear whether chronic bacterial infection results in the
11 development of tertiary lymphoid organs, a process called lymphoid neogenesis. Mechanisms
12 leading to lymphoid neogenesis appear to differ among stimuli: antigen-²⁰, cigarette smoke-²⁶
13 and virus-induced²⁵ lymphoid neogenesis appeared dependent on the chemokine CXCL13,
14 whereas heat-inactivated *P. aeruginosa*-induced lymphoid neogenesis occurred in the absence
15 of CXCL13 and required the chemokine CXCL12 ²⁵. Finally, the development of tertiary
16 lymphoid organs in the lung depends on IL17A produced by T cells. ^{25, 27}

17
18
19 In the present study, lymphocytic infiltration was characterized in the lungs of patients with
20 bronchiectasis or with CF, as compared with control nonsmokers. Peribronchial lymphoid
21 aggregates exhibiting the characteristics of tertiary lymphoid organs were present in patients
22 with bronchiectasis and in those with CF. Because bronchiectasis and CF are characterized by
23 chronic airway infection, we hypothesized a role for infection in lymphoid neogenesis.
24 Therefore, we examined the effects of persistent airway infection by Gram-negative (*P.*
25 *aeruginosa*) or Gram-positive (*S. aureus*) bacteria on lymphocyte recruitment and lymphoid
26 neogenesis in mouse airways.
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Methods

Human lung specimens

Human lung specimens were obtained at surgery from 17 patients who underwent lung resection for solitary lung cancer (Controls), from 8 patients who underwent lobar resection for localized bronchiectasis and from 17 adult CF patients at transplantation (CF). All patients were nonsmokers and no bacteria was identified in cultures of bronchial aspirates obtained in Control patients. Clinical characteristics of patients are shown in **Supplementary Table 1**. In Controls, only one block of tissue removed in a macroscopically normal area at a distance from the cancer was available. In patients with bronchiectasis or CF, tissues were obtained from two to three different tissue blocks, whose locations were chosen randomly, to reduce the potential sampling bias related to irregular distribution of tissue remodeling. The study obtained agreement (# 1072) of the local ethic committee CPP Ile de France II for the use of samples of human origin.

Animal studies

Agarose bead model of persistent airway infection

All animal experiments received approval (#CEEA34.PRB.135.12) from the ethical review board of Paris Descartes University. Female C57BL/6N mice aged 10 weeks were purchased from Harlan (Gannat, France) and housed in conventional conditions. Persistent airway infection was obtained by intratracheal instillation of agarose beads containing *Pseudomonas aeruginosa* O1 (PAO1; 5×10^5 CFU/mice) or *Staphylococcus aureus* (SA; a methicillin-sensitive clinical strain isolated from the sputum of a CF patient; 10^7 CFU/mice), following the method described by Martin et al. ²⁸. Mice were instilled with sterile, PAO1- or SA-coated beads and sacrificed at day 1, 4, 7 and 14 after instillation.

Immunohistochemical staining

Lungs were removed after flushing 4% paraformaldehyde through the right heart and fixed in 4% paraformaldehyde. Five- μ m paraffin sections obtained in human or in mouse lungs were immunostained as described previously²⁹ for detecting B lymphocytes (CD20+), T lymphocytes (CD3+), high endothelial venules (peripheral node addressin, PNAd+), follicular dendritic cells, proliferating cell nuclear antigen (PCNA, for the identification of germinal centers³⁰), and for CXCL12, CXCL13 and IL17A. Detailed description of the sources of primary antibodies, dilutions and unmasking techniques is provided in **Supplementary Table 2**. Biotinylated anti-mouse, anti-rabbit, anti-rat or anti-goat Abs (dilution 1:200; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) were used for secondary Abs and bound Abs were visualized according to standard protocols for avidin-biotin-peroxidase complex method (Elite ABC kit; Vector Laboratories). Tissue sections were counterstained with hematoxylin or methyl-green (Vector Laboratories).

Morphometric analyses

In both human and animal studies, quantitative morphometric analysis was performed by two independent observers using a light microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) connected to a computer²⁹. A lymphoid aggregate was defined as a CD20+ or CD3+ cell aggregate that could be detected using low-power field (16X). The number of lymphoid aggregates was expressed by square centimeter of lung. Volume ratios of epithelium stained for CXCL12, CXCL13 and IL17A were determined by point counting, as previously described^{29,31}.

Flow cytometry

1
2
3 Bronchoalveolar lavage (BAL) was performed by flushing 2 ml of saline in mouse lungs and
4
5 BAL fluids (BALFs) were filtered through a 40µm-nylon membrane to eliminate agarose
6
7 beads. BALFs were centrifuged at 1600 rpm during 6 minutes at 4°C. Cell pellet was
8
9 suspended in 200µL of phosphate buffered saline containing fetal calf serum and separated in
10
11 two equal parts for assessment of myeloid and lymphoid staining by flow cytometry as
12
13 described previously ³². Characterization of hematopoietic cell subsets was performed as
14
15 described in a previous report ³³ (also see **Supplementary Table 3**) and description of
16
17 primary antibodies is provided in **Supplementary Table 4**.
18
19
20
21
22

23 **Measurement of CXCL12, CXCL13 and IL17A protein in lung homogenates**

24
25 CXCL12, CXCL13 and IL17A protein concentrations in mouse lung homogenates were
26
27 determined using ELISA kits (R&D Systems), according to the manufacturer's
28
29 recommendations.
30
31

32 **Statistics**

33
34 Data obtained from morphometric analysis were analyzed using the non-parametric Kruskal–
35
36 Wallis test followed by the post-hoc Dunn's test. The interobserver coefficients of variation
37
38 for morphometric measurements were less than 15%. Data obtained from measurements of
39
40 protein concentrations in lung homogenates were analyzed using one-way analysis of variance
41
42 (ANOVA) for repeated measurements followed by the post-hoc Student-Neuman-Keuls test
43
44 for multiple comparisons. All analyses were performed by using the Prism 5 software
45
46 (GraphPad Inc., USA). Values of $P \leq 0.05$ were considered to indicate statistical significance.
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Results

Peribronchial lymphoid aggregates in human lungs

In the lungs of Control nonsmokers, CD20+ lymphoid aggregates were scarce and small, and did not contain germinal centers; they were localized in perivascular or in alveolar space at a distance from the bronchi. In the lungs of patients with bronchiectasis or with CF, numerous large CD20+ lymphoid aggregates were present, and were predominantly localized adjacent to bronchi. In the lungs of patients with bronchiectasis or CF many lymphoid aggregates showed characteristics of tertiary lymphoid organs with distinct B cell and T cell areas, high endothelial venules and germinal centers (characterized by positive staining for follicular dendritic cells -FDC- and PCNA). Representative photomicrographs are shown in **Figure 1A and 1B**. Quantitative morphometric analysis confirmed markedly increased numbers of CD20+, FDC+, and PCNA+ lymphoid aggregates in the lung of patients with bronchiectasis or with CF (see **Figure 1C, 1D, 1E; respectively**).

Expression of the chemokines CXCL12 and CXCL13 in human lungs

In the lungs of Control nonsmokers, immunostaining for CXCL12 and CXCL13 was weak and localized in the airway epithelium. In bronchiectasis and in CF lungs, CXCL12 and CXCL13 immunostaining were present in peribronchial lymphoid aggregates. Additionally, airway epithelium strongly stained for CXCL12 and CXCL13 in ciliated, but not in goblet cells. Representative photomicrographs are shown in **Figure 2A** and morphometric analysis of CXCL12 and CXCL13 staining in airway epithelium in **Figure 2B and 2C**.

Persistent airway infection induces peribronchial lymphoid neogenesis in mice

Next, we examined the effect of persistent bacterial infection on lymphoid neogenesis in mice. A single intratracheal instillation of agarose beads containing PAO1 or SA resulted in

1
2
3 bacterial infection that persisted for 14 days (see **supplementary figure S1**). At day 14 after
4 instillation of PAO1- or SA-coated beads, lymphoid aggregates containing CD20+ B cells and
5 CD3+ T cells, CD21+ follicular dendritic cells, PNAd+ high endothelial venules and PCNA+
6 proliferating B cells were found adjacent to bead-containing (infected) airways. However, no
7 lymphoid aggregate was found in morphologically normal lung at a distance from these
8 airways. Similarly, no lymphoid aggregate was found in the airways of mice instilled with
9 sterile beads or in those of Control (no instillation) mice. Representative photomicrographs
10 are shown in **Figure 3**.
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22

23 **Kinetics of bacteria-induced pulmonary lymphoid neogenesis in mice**

24 Recruitment of myeloid and lymphoid cells in airways during persistent bacterial infection
25 were first assessed by flow cytometry in BALF of mice instilled with PAO1-coated beads (see
26 **Figure 4**). Early response to PAO1 infection involved massive recruitment of granulocytes
27 within 24h after instillation, but persistent infection was associated with a subsequent
28 decrease in total number of cells in BALF. At day 4 post-instillation, decrease in the number
29 of neutrophils was associated with recruitment of other innate immune cells, including
30 macrophages, monocytes and NK cells. Airway recruitment of myeloid dendritic cells and
31 adaptive immune cells, i.e. B and T lymphocytes began between day 4 and 7 and was
32 increased at day 14 after instillation.
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44

45 Tissue recruitment of lymphocytes was then analyzed by immunohistochemical staining.
46 Within 24h after instillation of PAO1- or SA-coated beads, CD20+ B cells were recruited
47 adjacent to the epithelium of bead-containing airways; during the first week of infection,
48 elongated CD20+ lymphoid aggregates were found adjacent to bead-containing airways.
49 Infection-induced recruitment of CD3+ T cells was delayed: CD3+ lymphoid aggregates were
50 first identified at day 7 after instillation of PAO1- or SA-coated beads and peaked at day 14.
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Morphometric analysis of the numbers of CD20+ and CD3+ lymphoid aggregates over 14
4 days after intratracheal instillation of PAO1- or SA-coated beads are presented in **Figure 5**.
5
6 Representative photomicrographs are shown in **Supplementary Figure 2**. Tertiary lymphoid
7
8 organs persisted at least 28 days after instillation (*not shown*).
9
10

11 12 13 14 **Kinetics of bacteria-induced pulmonary expression of CXCL12, CXCL13 and IL17A in** 15 16 **mice**

17
18 In Control (no instillation) mice, CXCL12, CXCL13 and IL17A protein were detectable in
19 lung homogenates (see **Figure 6A, 6B, 6C**); only weak immunohistochemical staining was
20 found in airway epithelium (*not shown*).
21
22

23
24 At day 1 after instillation of PAO1-coated beads, CXCL13 and IL17A, but not CXCL12,
25 protein contents were increased in total lung homogenates. Immunohistochemical staining
26 showed that airway epithelium was an important site of CXCL12, CXCL13 and IL17A
27 expression. Morphometric analysis showed that CXCL12, CXCL13 and IL17A were
28 significantly increased in epithelium at day 1 after infection (see **Figures 6D, 6E, 6F**).
29
30 Although epithelial CXCL13 and IL17A remained increased over the 14 days of infection,
31 epithelial CXCL12 decreased during persistent infection. CXCL12 and CXCL13, but not
32 IL17A, were also expressed in lymphoid aggregates at day 14 after PAO1- or SA-infection
33 (see representative photomicrographs in **Figure 6G**).
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Discussion

Peribronchial lymphoid aggregates exhibiting characteristics of tertiary lymphoid organs were found in patients with bronchiectasis or with severe CF, while none was observed in Control nonsmokers. In mice, persistent bacterial infection with *P. aeruginosa* or *S. aureus* induced rapid recruitment of B lymphocytes followed by T lymphocytes around the infected airways. Within 14 days of infection, peribronchial lymphoid aggregates showed structural features that were characteristic of tertiary lymphoid organs. These data suggest that persistent bacterial infection contributes to the lymphoid neogenesis observed in chronic airway diseases.

Lymphoid aggregates containing large amount of B cells were found underneath the airway epithelium in all patients with severe CF and in most patients with bronchiectasis. Hubeau et al. studied inflammatory cells infiltrating the airway mucosa in 9 CF patients at transplantation compared with 3 non-CF organ donors and also reported large clusters of B cells in the airway wall in CF patients; T cells were also increased in distal airways¹⁸. It was not determined whether these aggregates exhibited the characteristics of tertiary lymphoid organs. Whitwell performed a histochemical study of surgical specimens obtained in patients with bronchiectasis and described lymphoid aggregates underneath the airway epithelium¹⁷, without further characterization. Studies based on bronchial biopsies from CF children⁸ or patients with non-CF bronchiectasis^{6,7} reported increased numbers of T cells^{7,21} with only occasional clusters of B cells just beneath the airway epithelium²⁴. We suggest that the small numbers of B cells in these studies could have been related to a sampling bias as B cells tend to cluster in specific subepithelial areas, whereas we found that T cells were more diffusely present underneath the epithelium. Our study confirm that large aggregates of B cells are present beneath the airway epithelium in patients with bronchiectasis or CF and extend previous findings by demonstrating that these lymphoid aggregates contained distinct B and T

1
2
3 cells areas, germinal centers, follicular dendritic cells, and high endothelial venules. These
4
5 features are the hallmark of tertiary lymphoid organs, in which local adaptive immune
6
7 response is initiated ^{10,11}.

8
9 Using an animal model, we found that persistent airway infection induced peribronchial
10
11 lymphoid aggregates characterized as tertiary lymphoid organs comparable to that observed in
12
13 patients with bronchiectasis or CF. Indeed both *P. aeruginosa* and *S. aureus*-triggered
14
15 lymphoid aggregates contained germinal centers, follicular dendritic cells and expressed both
16
17 CXCL12 and CXCL13. These findings differ from those of a recent study by Fleige et al. who
18
19 reported that repetitive inhalations of heat-inactivated *P. aeruginosa* induced lymphoid
20
21 aggregates, which were characterized by the absence of follicular dendritic cells or other
22
23 CXCL13 expressing cells in C57BL/6 mice ²⁵. These differences are likely explained by
24
25 differences in experimental stimuli and suggest that different stimuli may trigger lymphoid
26
27 neogenesis via distinct mechanisms. Importantly, our model of infection-induced lymphoid
28
29 neogenesis largely mimicked expression of CXCL12 and CXCL13 that was found in humans
30
31 with bronchiectasis or CF. Further we found that IL17A, an important player in lymphoid
32
33 neogenesis²⁷, was expressed in airway epithelium during persistent bacterial infection in mice.
34
35 Interestingly, IL17A overexpression has been reported in the airway epithelium of CF patients
36
37
38
39
40
41
42

43 Strengths of the present study rely on the use of human tissues that allowed description of
44
45 human pathology and mouse models that allowed exploring possible role of persistent
46
47 bacterial infection in the peribronchial lymphoid neogenesis that was found in humans.
48
49 Embedding bacteria in agarose beads that were localized within the airway lumen mimicked
50
51 airway infection in CF airways in which bacteria were localized in mucous plugs within the
52
53 airway lumens ³⁵. Localization of the stimulus in the beads allowed studies of the spatial
54
55 relationship between stimulus and lymphoid aggregates, and localization of lymphoid
56
57
58
59
60

1
2
3 aggregates adjacent to bead-containing airways suggested a role for airway epithelium in
4
5 lymphoid neogenesis. This suggestion was further reinforced by the immunolocalization of
6
7 CXCL12, CXCL13, and IL17A in airway epithelium that occurred within 24h after bacterial
8
9 infection. Because infection was triggered using a single intratracheal instillation of bacteria-
10
11 coated agarose beads, it was possible to examine the kinetics of lymphoid aggregate
12
13 formation, which is impossible in models that use repetitive inhalation of stimuli ²³⁻²⁵. We
14
15 also recognize limitations to the present studies. Human surgical tissues were available only
16
17 in patients with severe CF at lung transplantation and the presence of peribronchial lymphoid
18
19 aggregates could not be examined in patients with less severe disease. Similarly, only the
20
21 subset of patients with localized bronchiectasis undergoing lung resection could be examined.
22
23 Finally our study described kinetics of bacteria-induced lymphoid neogenesis but did not
24
25 examine the roles of homeostatic chemokines (e.g. CXCL12, CXCL13), IL17A or other
26
27 molecules (e.g., B cell-activating factor, BAFF) ^{36,37}, which have been previously implicated
28
29 in lymphoid neogenesis.
30
31
32

33
34 In summary, our data clearly indicate the presence of a local adaptive immune response
35
36 involving peribronchial lymphoid neogenesis in bronchiectasis and CF. Importantly,
37
38 persistent bacterial infection that is also observed in other chronic airway inflammatory
39
40 diseases (e.g., chronic obstructive pulmonary disease)³⁸ was sufficient to trigger peribronchial
41
42 lymphoid neogenesis in mice. Although the present study did not examine the role of
43
44 lymphoid aggregates in airway defense against pathogens and/or in disease
45
46 immunopathology⁹, our animal model provide a unique model for studying cellular and
47
48 molecular mechanisms involved in the development of lymphoid aggregates and their
49
50 persistence in the airways. Future studies should particularly focus on possible roles of airway
51
52 epithelium in these processes.
53
54
55
56
57
58
59
60

Acknowledgments

We acknowledge the technical contribution of Guiti Thévenot, Mélanie Bigeat, Abdelhouab Bouaboud and Claire Toustou.

Funding

The research leading to these results has received funding from the European Union's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement n°603038 (CFMATTERS), from the Chancellerie de l'Université de Paris (Legs Poix) and the French cystic fibrosis association (Vaincre la Mucoviscidose). Justine Frija-Masson was the recipient of a fellowship grant provided by "Fondation Groupama" for rare diseases.

Bibliography

1. Pasteur MC, Bilton D, Hill AT. British Thoracic Society guideline for non-CF bronchiectasis. *Thorax*. 2010;65 Suppl 1:i1-58.
2. Stoltz DA, Meyerholz DK, Welsh MJ. Origins of cystic fibrosis lung disease. *N Engl J Med*. 2015;372:351-62.
3. Tang AC, Turvey SE, Alves MP, Regamey N, Tummler B, Hartl D. Current concepts: host-pathogen interactions in cystic fibrosis airways disease. *Eur Respir Rev*. 2014;23:320-32.
4. Chalmers JD, Aliberti S, Blasi F. Management of bronchiectasis in adults. *Eur Respir J*. 2015;45:1446-62.
5. Whitters D, Stockley R. Immunity and bacterial colonisation in bronchiectasis. *Thorax*. 2012;67:1006-13.
6. Silva JR, Jones JA, Cole PJ, Poulter LW. The immunological component of the cellular inflammatory infiltrate in bronchiectasis. *Thorax*. 1989;44:668-73.
7. Gaga M, Bentley AM, Humbert M, et al. Increases in CD4+ T lymphocytes, macrophages, neutrophils and interleukin 8 positive cells in the airways of patients with bronchiectasis. *Thorax*. 1998;53:685-91.
8. Regamey N, Tsartsali L, Hilliard TN, et al. Distinct patterns of inflammation in the airway lumen and bronchial mucosa of children with cystic fibrosis. *Thorax*. 2012;67:164-70.
9. Yadava K, Marsland BJ. Lymphoid follicles in chronic lung diseases. *Thorax*. 2013;68:597-8.
10. Pitzalis C, Jones GW, Bombardieri M, Jones SA. Ectopic lymphoid-like structures in infection, cancer and autoimmunity. *Nat Rev Immunol*. 2014;14:447-62.
11. Randall TD. Bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) structure and function. *Adv Immunol*. 2010;107:187-241.
12. Pabst R, Gehrke I. Is the bronchus-associated lymphoid-tissue (balt) an integral structure of the lung in normal mammals, including humans. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1990;3:131-5.
13. Elliot JG, Jensen CM, Mutavdzic S, Lamb JP, Carroll NG, James AL. Aggregations of lymphoid cells in the airways of nonsmokers, smokers, and subjects with asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;169:712-8.
14. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, et al. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2004;350:2645-53.
15. Germain C, Gnjatic S, Tamzalit F, et al. Presence of B cells in tertiary lymphoid structures is associated with a protective immunity in patients with lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;189:832-44.
16. Mansuet-Lupo A, Alifano M, Pecuchet N, et al. Intra-tumoral Immune Cell Densities are Associated with Lung Adenocarcinoma Gene Alterations. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016.
17. Whitwell F. A study of the pathology and pathogenesis of bronchiectasis. *Thorax*. 1952;7:213-39.
18. Hubeau C, Lorenzato M, Couetil JP, et al. Quantitative analysis of inflammatory cells infiltrating the cystic fibrosis airway mucosa. *Clin Exp Immunol*. 2001;124:69-76.
19. Hwang JY, Randall TD, Silva-Sanchez A. Inducible Bronchus-Associated Lymphoid Tissue: Taming Inflammation in the Lung. *Front Immunol*. 2016;7:258.
20. Baay-Guzman GJ, Huerta-Yepez S, Vega MI, et al. Role of CXCL13 in asthma: novel therapeutic target. *Chest*. 2012;141:886-94.
21. van der Strate BWA, Postma DS, Brandsma CA, et al. Cigarette smoke-induced emphysema - A role for the B cell? *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173:751-8.

- 1
2
3 22. Moyron-Quiroz JE, Rangel-Moreno J, Kusser KR, et al. Role of inducible bronchus
4 associated lymphoid tissue (iBALT) in respiratory immunity. *Nat Med.* 2004;10:927-34.
5 23. Huvenne W, Lanckacker EA, Krysko O, et al. Exacerbation of cigarette smoke-
6 induced pulmonary inflammation by Staphylococcus aureus enterotoxin B in mice. *Respir*
7 *Res.* 2011;12:69.
8 24. Moghaddam SJ, Clement CG, De la Garza MM, et al. Haemophilus influenzae lysate
9 induces aspects of the chronic obstructive pulmonary disease phenotype. *Am J Respir Cell*
10 *Mol Biol.* 2008;38:629-38.
11 25. Fleige H, Ravens S, Moschovakis GL, et al. IL-17-induced CXCL12 recruits B cells
12 and induces follicle formation in BALT in the absence of differentiated FDCs. *J Exp Med.*
13 2014;211:643-51.
14 26. Bracke KR, Verhamme FM, Seys LJ, et al. Role of CXCL13 in cigarette smoke-
15 induced lymphoid follicle formation and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir*
16 *Crit Care Med.* 2013;188:343-55.
17 27. Rangel-Moreno J, Carragher DM, de la Luz Garcia-Hernandez M, et al. The
18 development of inducible bronchus-associated lymphoid tissue depends on IL-17. *Nat*
19 *Immunol.* 2011;12:639-46.
20 28. Martin C, Thevenot G, Danel S, et al. Pseudomonas aeruginosa induces vascular
21 endothelial growth factor synthesis in airway epithelium in vitro and in vivo. *Eur Respir J.*
22 2011;38:939-46.
23 29. Burgel PR, Montani D, Danel C, Dusser DJ, Nadel JA. A morphometric study of
24 mucins and small airway plugging in cystic fibrosis. *Thorax.* 2007;62:153-61.
25 30. Rangel-Moreno J, Hartson L, Navarro C, Gaxiola M, Selman M, Randall TD.
26 Inducible bronchus-associated lymphoid tissue (iBALT) in patients with pulmonary
27 complications of rheumatoid arthritis. *J Clin Invest.* 2006;116:3183-94.
28 31. Hsia CC, Hyde DM, Ochs M, Weibel ER. An official research policy statement of the
29 American Thoracic Society/European Respiratory Society: standards for quantitative
30 assessment of lung structure. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;181:394-418.
31 32. Martin B, Auffray C, Delpoux A, et al. Highly self-reactive naive CD4 T cells are
32 prone to differentiate into regulatory T cells. *Nat Commun.* 2013;4:2209.
33 33. Pommier A, Audemard A, Durand A, et al. Inflammatory monocytes are potent
34 antitumor effectors controlled by regulatory CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.*
35 2013;110:13085-90.
36 34. Brodlić M, McKean MC, Johnson GE, et al. Raised interleukin-17 is immunolocalised
37 to neutrophils in cystic fibrosis lung disease. *Eur Respir J.* 2011;37:1378-85.
38 35. Worlitzsch D, Tarran R, Ulrich M, et al. Effects of reduced mucus oxygen
39 concentration in airway Pseudomonas infections of cystic fibrosis patients. *J Clin Invest.*
40 2002;109:317-25.
41 36. Polverino F, Cosio BG, Pons J, et al. B Cell-Activating Factor. An Orchestrator of
42 Lymphoid Follicles in Severe Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care*
43 *Med.* 2015;192:695-705.
44 37. Seys LJ, Verhamme FM, Schinwald A, et al. Role of B Cell-Activating Factor in
45 Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2015;192:706-18.
46 38. Sethi S. Infection as a comorbidity of COPD. *Eur Respir J.* 2010;35:1209-15.
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Legends of figures

Figure 1. Peribronchial lymphoid aggregates in human lungs

A: Representative photomicrographs of CD20 immunostainings. In Control subjects, only small and scarce CD20+ lymphoid aggregates (LF, brown color) were found and localized at a distance from the bronchi (B), often close to blood vessels (V). In patients with bronchiectasis (BCE) and in patients with cystic fibrosis (CF), numerous large CD20+ lymphoid aggregates were present and were localized immediately adjacent to bronchi (B), underneath the airway epithelium. Original magnification 50X, bar 200 μm . **B: Representative photomicrographs of the characterization of a CD20+ lymphoid aggregate as a tertiary lymphoid organ in the lung of a CF patient.** Tissue sections were double-stained for B lymphocytes (CD20, red color) and T lymphocytes (CD3, brown color) and adjacent sections were stained for follicular dendritic cells (FDC, brown color), germinal centers (PCNA, brown color), and high endothelial venules (PNAd, brown color). Original magnification 200X, Bar 50 μm . **C, D and E: Morphometric quantification of CD20+, FDC+ and PCNA+ lymphoid aggregates.** Adjacent tissue sections were immunostained for CD20, FDC and PCNA. Lymphoid aggregates with positive staining for CD20, FDC and PCNA were counted and total lung surface was measured as described in Methods. Results are shown as number of positive lymphoid aggregates per square centimeter of lung surface. The number of CD20+ (C), FDC+ (D) and PCNA+ (E) lymphoid aggregates was significantly higher in subjects with bronchiectasis (BCE, grey symbols) and CF (solid symbols) as compared with Controls (open symbols). Each symbol represents data obtained in one patient; Horizontal bars represent medians. *: $P < 0.05$ compared with Controls.

Figure 2. Immunostaining for the chemokines CXCL12 and CXCL13 in human lungs.

A: Representative photomicrographs. Adjacent tissue sections were immunostained for CD20, CXCL12 and CXCL13. In Controls, only weak staining for CXCL12 and CXCL13 was observed in the airway epithelium. In subjects with bronchiectasis (BCE) or with cystic fibrosis (CF), staining for CXCL12 and CXCL13 was strong and localized in CD20+lymphoid aggregates and in the airway epithelium. Original magnification 200X. Bar 200 μ m. **B and C: Morphometric quantification of epithelial staining for CXCL12 and CXCL13.** . Tissue sections were immunostained for CXCL12 and CXCL13. Epithelial volume positively stained for CXCL12 (**B**) and CXCL13 (**C**) and total epithelial volume were measured as described in Methods. Results are shown as percentage of positive epithelium/total epithelium. CXCL12 and CXCL13 staining percent were significantly higher in subjects with bronchiectasis (BEC, grey symbols) compared with Controls (open symbols), whereas only CXCL13 immunostaining (**C**) was significantly higher in CF patients (solid symbols) compared with Controls. Each symbol represents data obtained one patient; Horizontal bars represent medians. *, $P < 0.05$ compared with Controls.

Figure 3. Representative photomicrographs depicting the effects of persistent airway infection with *P. aeruginosa* or *S. aureus* on peribronchial lymphoid neogenesis: Tissue sections were obtained 14 days after intratracheal instillation of sterile (left), PAO1-coated (middle) or SA-coated (right) agarose beads. Sections were immunostained (brown color) with Ab to B lymphocytes (CD20), T lymphocytes (CD3), follicular dendritic cells (FDC), germinal centers (PCNA) or high endothelial venules (PNAd). In mice infected with PAO1 or with SA, large CD20+ lymphoid aggregates were found in the subepithelial area of bead-containing airways; CD20+ lymphoid aggregates were surrounded by CD3+ cells and contained FDC, germinal centers and high endothelial venules confirming their organization

1
2
3 into tertiary lymphoid organs. By contrast, no lymphoid aggregate was observed at a distance
4
5 from bead-containing airways in these infected animals. Similarly, no lymphoid aggregate
6
7 was observed in the lung of mice instilled with sterile beads. Original magnification 50X,
8
9 inserts 400X. Arrowheads identify beads within the airways.
10
11
12
13

14 **Figure 4. Kinetics of airway inflammatory cell recruitment during persistent *P.***
15 ***aeruginosa* infection in mice.**
16
17

18 Mice were infected with PAO1-coated beads and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was
19
20 collected at 1, 4, 7 and 14 days after instillation. Flow cytometry was performed in BALF
21
22 using markers (see methods and Supplementary Table 3) for leucocytes (CD45+) cells (A),
23
24 granulocytes (B), monocytes/macrophages (C), CD4+ T cells (D), CD8+ T cells (E), $\gamma\delta$ T
25
26 cells (F), natural killer (NK) cells (G), myeloid dendritic cells (H) and B cells (I). Although
27
28 the initial response to PAO1 infection (solid symbols) involved massive recruitment of
29
30 granulocytes, persistence of infection was associated with a decrease in total number of
31
32 leucocytes in BALF with concomitant increase in the numbers of B and T lymphocytes in the
33
34 airways as compared with Control (no instillation, open symbols) mice. Each symbol
35
36 represents data obtained in one animal; Horizontal bars represent medians. *, $P < 0.05$
37
38 compared to Controls.
39
40
41
42
43
44

45 **Figure 5. Morphometric analysis of CD20+ and CD3+ lymphoid aggregates during**
46 **persistent airway infection with *P. aeruginosa* or *S. aureus* in mice**
47
48

49 Mice were infected with PAO1- or SA-coated beads and were sacrificed at 1, 4, 7 and 14 days
50
51 after instillation. Lung sections were immunostained for B lymphocytes (CD20+) and T
52
53 lymphocytes (CD3+). Lymphoid aggregates were counted using morphometric analysis as
54
55 described in Methods. No lymphoid aggregate was observed in Control (no instillation, open
56
57
58
59
60

1
2
3 symbols) mice. Instillation of PAO1- or SA-coated beads (solid symbols) resulted in an
4
5 increase in both CD20+ (A, B) and CD3+ (C, D) lymphoid aggregates. Each symbol
6
7 represents data obtained in one animal; horizontal bars correspond to median; *, $P < 0.05$
8
9 compared to Controls.
10

11
12
13
14 **Figure 6. Expression of CXCL12, CXCL13 and IL17A during persistent bacterial**
15
16 **infection in mice.**

17
18 Mice infected with PAO1-coated beads (solid bars) were sacrificed at 1, 4 and 14 days after
19
20 instillation and compared with Control (no instillation, open bars) mice. (A, B, C) ELISA
21
22 measurement of CXCL12 (A), CXCL13 (B) and IL17A (C) proteins in lung homogenates.
23
24 Data are presented as mean \pm SEM (n=5 animals per group). *, $P < 0.05$ compared with
25
26 Controls. (D, E, F) **Morphometric analysis of CXCL12, CXCL13, and IL17A in airway**
27
28 **epithelium.** Lung sections were immunostained using Abs directed against CXCL12,
29
30 CXCL13 or IL17A and morphometric analysis was performed in epithelium as described in
31
32 Methods. Each symbol represents data for one mouse; Horizontal bars represent medians. *,
33
34 $P < 0.05$ as compared with Controls. **G: Representative photomicrographs of chemokine**
35
36 **expression in lymphoid aggregate after 14 days of infection by PA or SA:** Adjacent lung
37
38 sections were immunostained using Abs directed against CD20, follicular dendritic cells
39
40 (FDC), CXCL12, CXCL13 and IL17A. Immunostainings (brown color) showed that CXCL12
41
42 and CXCL13, but not IL17A, were expressed in lymphoid aggregates at day 14 after PAO1-
43
44 or SA-infection. IL17A was strongly expressed by airway epithelium, but not by lymphoid
45
46 aggregates in both PA and SA infection. Original magnification 100X, Bar 200 μ m.
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

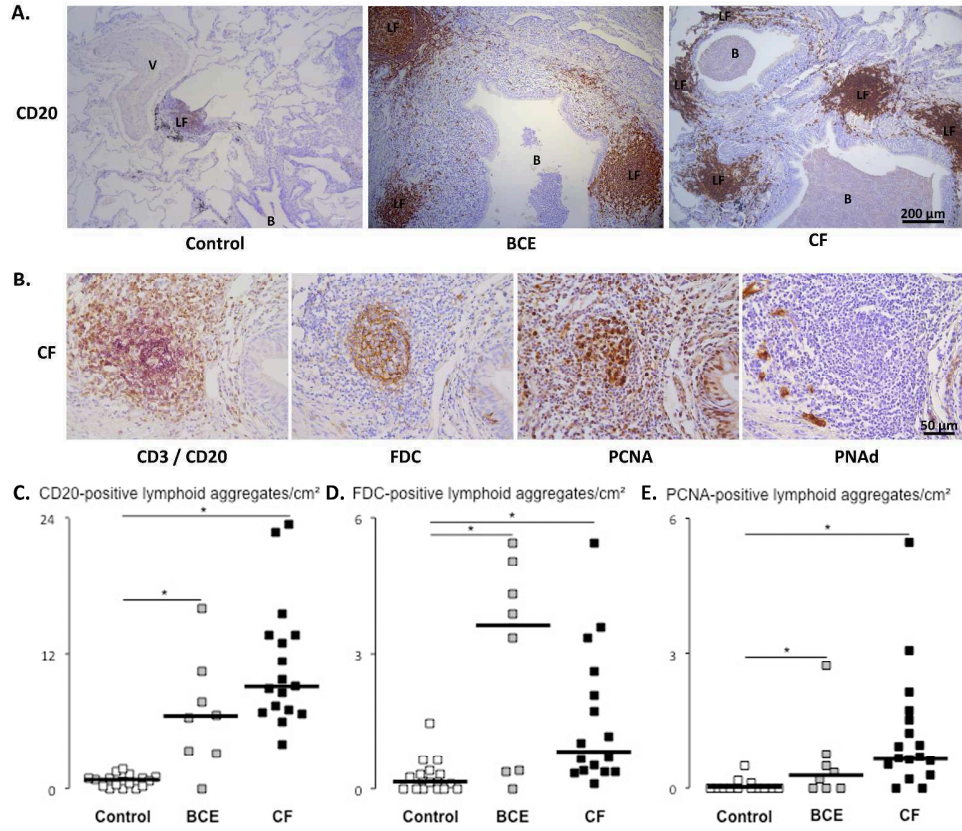


Figure 1. Peribronchial lymphoid aggregates in human lungs

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

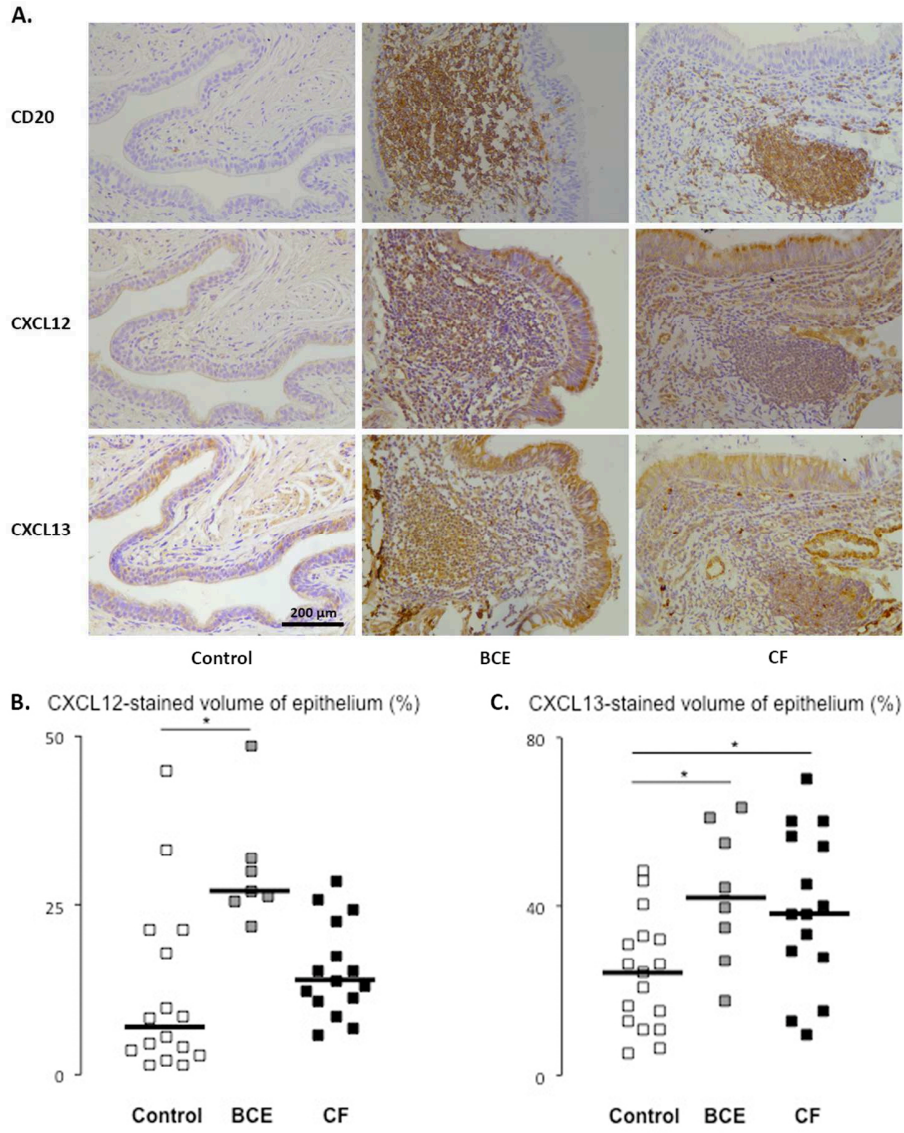
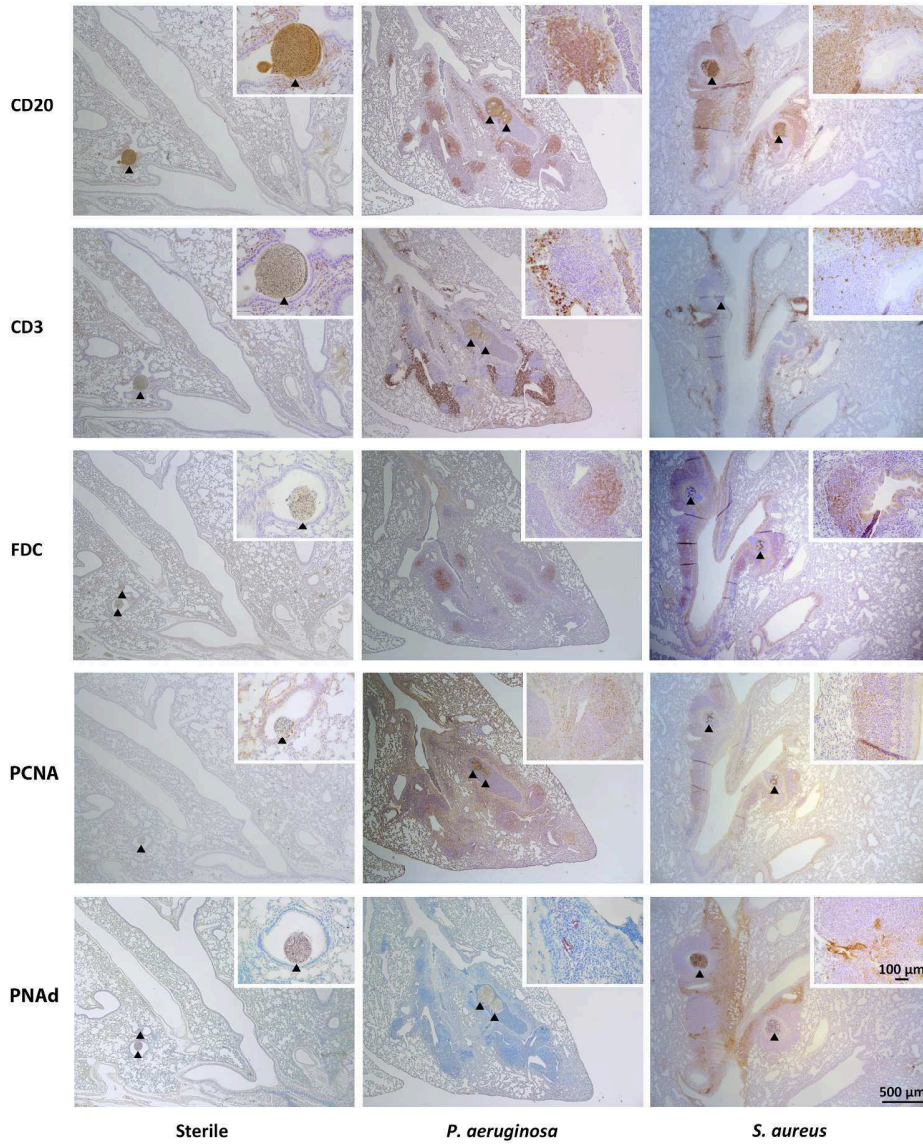


Figure 2. Immunostaining for the chemokines CXCL12 and CXCL13 in human lungs

388x493mm (72 x 72 DPI)



Representative photomicrographs depicting the effects of persistent airway infection with *P. aeruginosa* or *S. aureus* on peribronchial lymphoid neogenesis

200x250mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

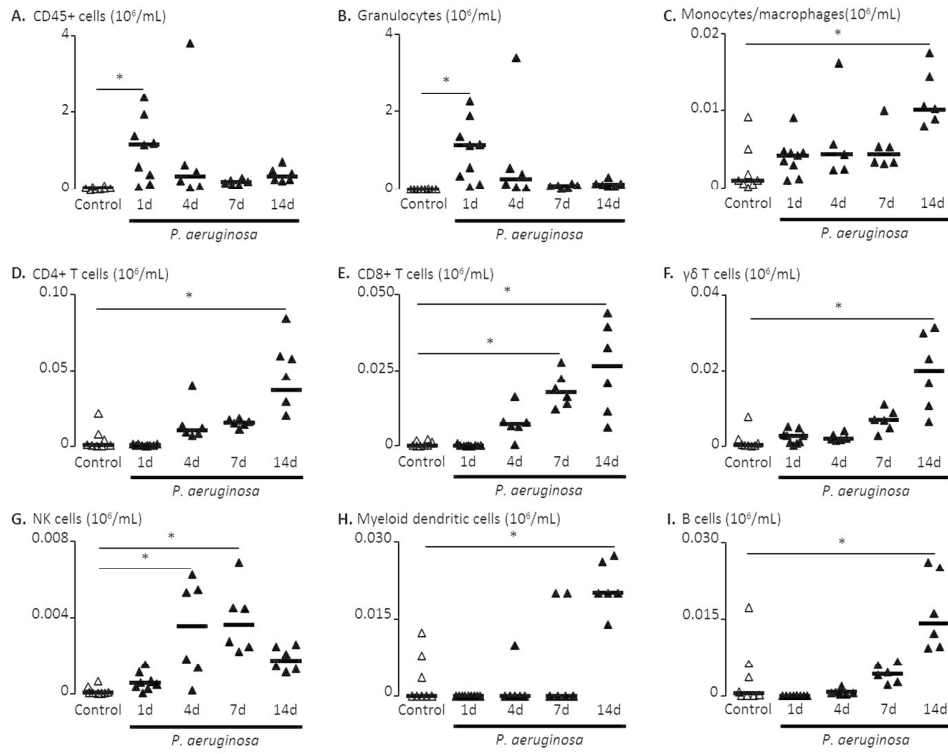


Figure 4. Kinetics of airway inflammatory cell recruitment during persistent *P. aeruginosa* infection in mice

239x187mm (150 x 150 DPI)

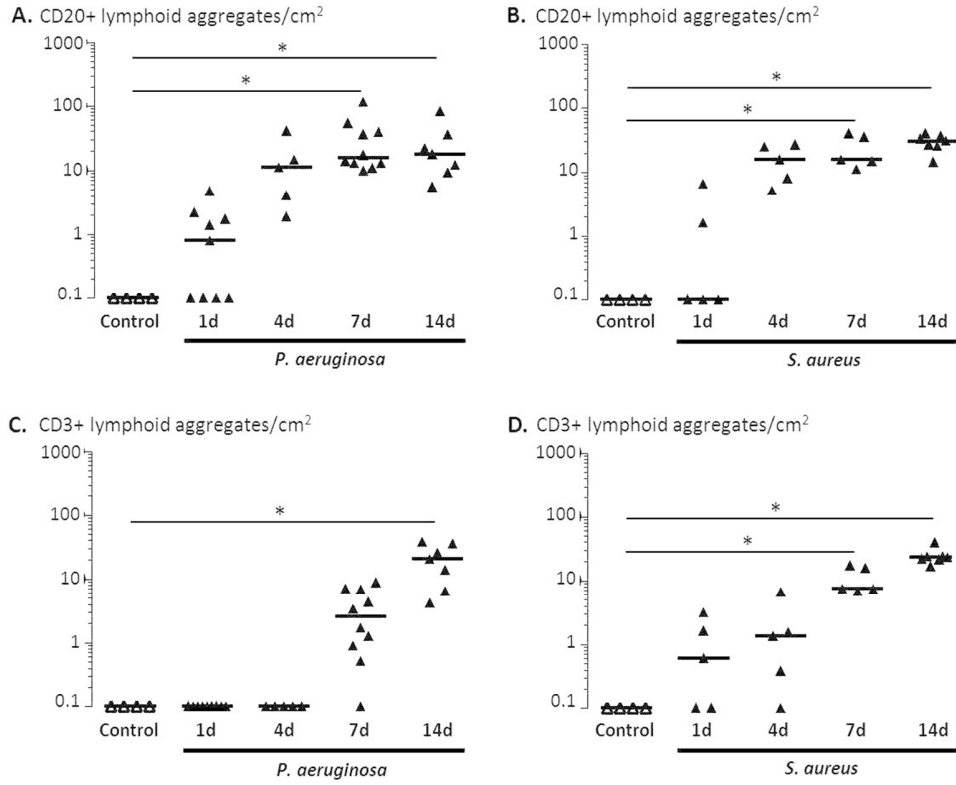


Figure 5. Morphometric analysis of CD20+ and CD3+ lymphoid aggregates during persistent airway inflammation with *P. aeruginosa* or *S. aureus* in mice

193x159mm (150 x 150 DPI)

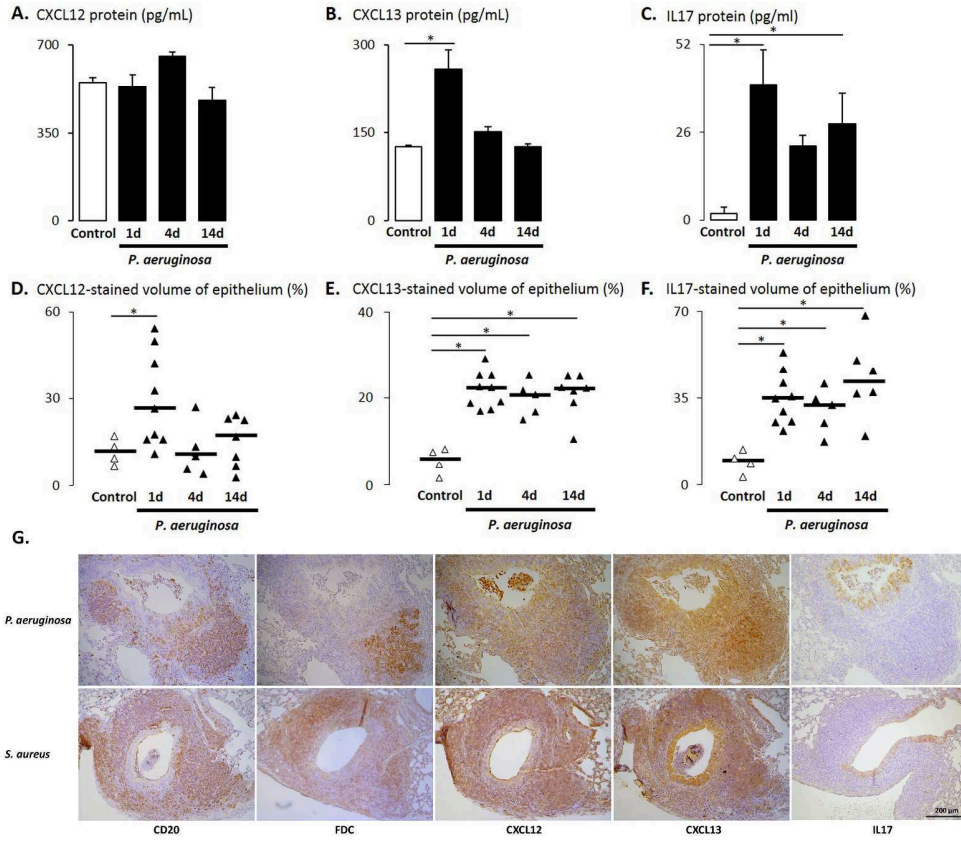


Figure 6. Expression of CXCL12, CXCL13 and IL17A during persistent bacterial infection in mice

1382x1200mm (72 x 72 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 **Online supplementary data**
4
5
6

7 **Title: Bacteria-driven peribronchial lymphoid neogenesis in bronchiectasis and cystic**
8 **fibrosis**
9

10 **Authors:** Justine Frija-Masson^{1,2,3}, Clémence Martin^{1,2,3}, Lucile Regard^{1,2,3}, Marie-Noëlle
11 Lothe^{1,2,3}, Lhousseine Touqui³, Aurélie Durand^{1,4,5}, Bruno Lucas^{1,4,5}, Diane Damotte^{1,6}, Marco
12 Alifano^{1,7}, Isabelle Fajac^{1,8}, Pierre-Régis Burgel^{1,2}
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Supplementary Table 1. Clinical characteristics of patients

	Control (n=17)	Bronchiectasis (n=8)	Cystic fibrosis (n=17)
Female, n (%)	11 (65%)	6 (75%)	8 (47%)
Age, years (mean \pm SD)	67 \pm 10	55 \pm 16	34 \pm 9
FEV ₁ , % predicted	100 \pm 18	78 \pm 35	22 \pm 6
CFTR genotype, n			
Phe508del / Phe508del	Unknown	Unknown	10
Phe508del / Other	Unknown	Unknown	5
Other	Unknown	Unknown	2
Bronchial colonization*, n			
<i>P. aeruginosa</i>	0	4	16
<i>S. aureus</i>	0	2	16
<i>H. influenzae</i>	0	0	0
<i>S. maltophilia</i>	0	2	0
<i>A. xylosoxydans</i>	0	1	1

*, Some patients displayed colonization with two or more pathogens; FEV₁: Forced expiratory volume in one second, CFTR: Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

Supplementary Table 2. Primary antibodies used for immunohistochemical staining in human and in mouse lung sections

Antigen	Source	Manufacturer	Reference	Dilution	Unmasking
Human sections					
Human CD20	Mouse monoclonal	Dako	M0755	1:200	Citrate microwave
Human CD3	Rabbit polyclonal	Dako	A0452	1:200	Citrate microwave
Human FDC	Mouse monoclonal	Dako	M7157	1:50	Citrate microwave
Human PNAd	Rat monoclonal	Santa Cruz	sc19602	1:50	None
Human PCNA	Rabbit polyclonal	Calbiochem	PC474	1:200	None
Human CXCL12	Rabbit polyclonal	Santa Cruz	Sc28876	1:50	Citrate microwave
Human CXCL13	Goat polyclonal	R&D	AF801	1:50	Citrate microwave
Mouse sections					
Mouse CD20	Goat polyclonal	Santa Cruz	sc7735	1:250	None
Mouse CD3	Rat monoclonal	Santa Cruz	sc101442	1:200	Protease
Mouse FDC	Rat monoclonal	BD Pharmingen	Antigen M1	1:50	Protease
Mouse PNAd	Rat monoclonal	BD Pharmingen	553863	1:50	None
Mouse PCNA	Rabbit polyclonal	Calbiochem	PC474	1:200	Protease
Mouse CXCL12	Rabbit polyclonal	Santa Cruz	sc28876	1:50	Citrate microwave
Mouse CXCL13	Goat polyclonal	R&D	AF470	1:20	Citrate microwave
Mouse IL-17A	Rabbit polyclonal	Santa Cruz	sc7927	1:50	None

Supplementary Table 3. Identification of lymphoid and myeloid cell populations by flow cytometry in the bronchoalveolar lavage.

Cell Subset	Phenotype
Granulocytes	CD45 ⁺ CD11b ⁺ CD11c ⁺ NK1.1 ⁻ Ly-6G ⁺
Monocytes/Macrophages	CD45 ⁺ CD11b ⁺ CD11c ⁻ NK1.1 ⁻ Ly-6G ⁻ Ly-6C ⁻
CD4 ⁺ Tcells	CD45 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻ TCRβ ⁺
CD8 ⁺ Tcells	CD45 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁺ TCRβ ⁺
γδ T cells	CD45 ⁺ CD4 ⁻ TCRγδ ⁺
Myeloid dendritic cells	CD45 ⁺ CD11b ⁺ CD11c ⁺ Ly-6C ⁻
B cells	CD45 ⁺ CD19 ⁺

Supplementary Table 4. Antibodies used for detection of myeloid and lymphoid cells by flow cytometry in the bronchoalveolar lavage

Antibodies used for detection of myeloid cells			
Antigen	Manufacturer	Reference	Dilution
Ly6C biotinylated	BD Pharmingen	557359	1:100
SAV PB	Invitrogen	S11222	1:600
CD11b APC	eBioscience	170112832	1:200
CD11c PE Cy7	BD Pharmingen	558079	1:100
NK1.1 PE	BD Pharmingen	557391	1:100
Ly6G FITC	BD Pharmingen	551460	1:100
CD45 Pcp Cy5.5	BD Pharmingen	550994	1:100
Antibodies used for detection of lymphoid cells			
Antigen	Manufacturer	Reference	Dilution
TCRβ biotinylated	BD Pharmingen	553169	1:100
SAV PE Cy7	BD Pharmingen	557598	1:100
CD4 PB	BD Pharmingen	558107	1:100
CD8 APC H7	MACS	130096602	1:50
CD19 FITC	BD Pharmingen	553785	1:100
NK1.1 Pcp Cy5.5	BD Pharmingen	551114	1:100
TCRgd PE	BD Pharmingen	553178	1:100
CD45 APC	BD Pharmingen	559864	1:100

Figure Legends**Supplementary Figure 1. Bacterial counts over 14 days in mice instilled with PAO1 or with SA**

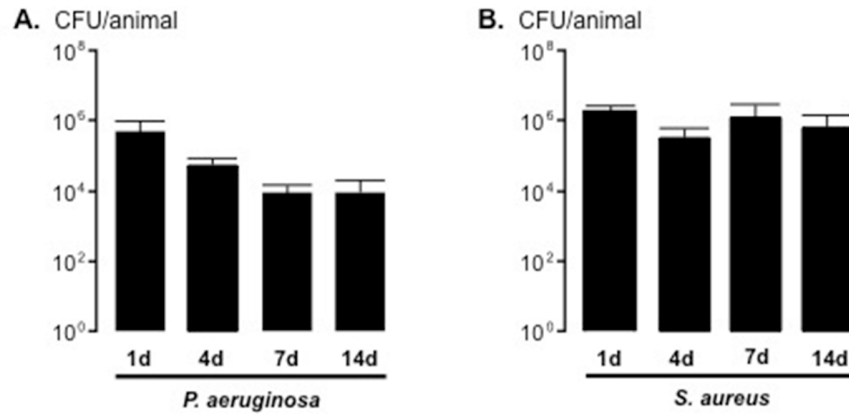
Mice were instilled with PAO1- or SA-coated agarose beads (as described in Methods) and sacrificed at day 1, 4, 7 and 14 after instillation. After sacrifice lungs were removed under sterile conditions, homogenized in 0.5 ml of saline, and ten-fold dilutions of lung homogenates were plated on ampicilline-free lysogeny broth culture medium for 24 hours at 37°C before bacterial count. N≥5 animals/experimental condition. Bars shows SEM.

Supplementary Figure 2. Representative photomicrographs of B and T lymphocytes recruitment during persistent airway infection with PAO1 or SA

Mice were instilled with PAO1- or SA-coated agarose beads (as described in Methods) and sacrificed at day 1, 4, 7 and 14 after instillation. Section were stained (brown color) with Abs to CD20 to identify B lymphocytes or to CD3 to identify T lymphocytes. B and T

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

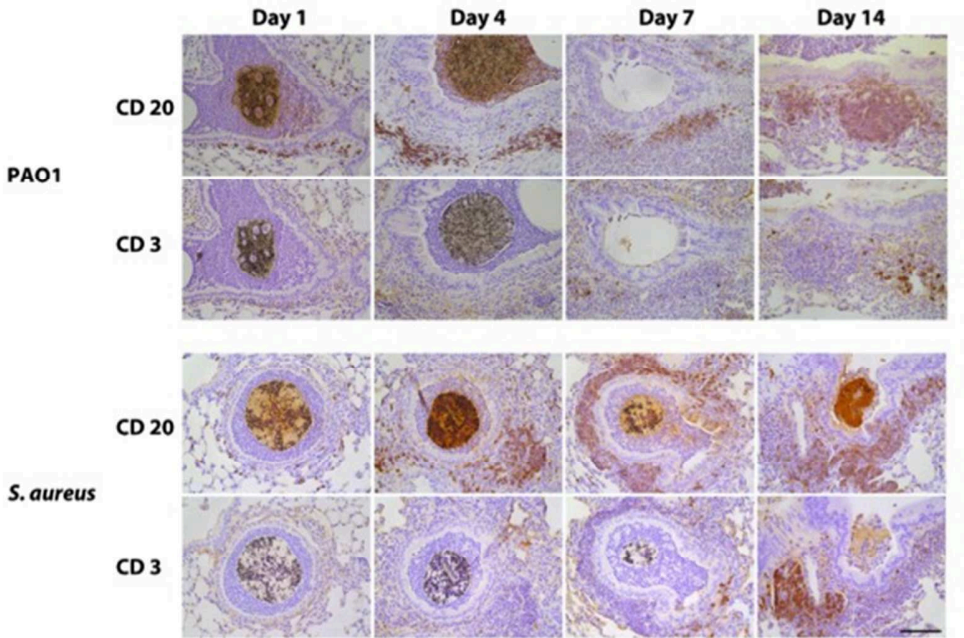
lymphocytes were recruited in the peribronchial space during bacterial infection.
Interestingly, B lymphocytes were recruited earlier than T lymphocytes.



Supplementary figure 1. Bacterial counts over 14 days in mice instilled with PAO1 or with SA

156x77mm (72 x 72 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



Supplementary Figure 2. Representative photomicrographs of B and T lymphocytes recruitment during persistent airway infection with PAO1 or SA

203x137mm (72 x 72 DPI)

Bibliographie

- [1] ABM. Bilan de données 2012. disponible sur <http://www.agence-biomedecine.fr/annexes/bilan2012/donnees/organes/04-coeur-poumon/pdf/cardio-pulmonaire.pdf>. 2013.
- [2] A. C. Adiko, J. Babdor, E. Gutiérrez-Martínez, P. Guermonprez, and L. Saveanu. Intracellular transport routes for MHC I and their relevance for antigen cross-presentation. *Front Immunol*, 6 :335, 2015.
- [3] F. Aloisi and R. Pujol-Borrell. Lymphoid neogenesis in chronic inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol*, 6(3) :205–17, Mar 2006.
- [4] J. Altenburg, C. S. de Graaff, Y. Stienstra, J. H. Sloos, E. H. J. van Haren, R. J. H. Koppers, T. S. van der Werf, and W. G. Boersma. Effect of azithromycin maintenance treatment on infectious exacerbations among patients with non-cystic fibrosis bronchiectasis : the BAT randomized controlled trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 309(12) :1251–1259, Mar. 2013.
- [5] M. D. Amaral. Novel personalized therapies for cystic fibrosis : treating the basic defect in all patients. *J Intern Med*, 277(2) :155–66, Feb 2015.
- [6] K. Araki-Sasaki, T. Tanaka, Y. Ebisuno, H. Kanda, E. Umemoto, K. Hayashi, and M. Miyasaka. Dynamic expression of chemokines and the infiltration of inflammatory cells in the HSV-infected cornea and its associated tissues. *Ocul Immunol Inflamm*, 14(5) :257–66, Oct 2006.

- [7] G. J. Baay-Guzman, S. Huerta-Yepez, M. I. Vega, D. Aguilar-Leon, M. Campillos, J. Blake, V. Benes, R. Hernandez-Pando, and L. M. Teran. Role of CXCL13 in asthma : novel therapeutic target. *Chest*, 141(4) :886–94, Apr 2012.
- [8] F. Bachelierie, A. Ben-Baruch, A. M. Burkhardt, C. Combadiere, J. M. Farber, G. J. Graham, R. Horuk, A. H. Sparre-Ulrich, M. Locati, A. D. Luster, A. Mantovani, K. Matsushima, P. M. Murphy, R. Nibbs, H. Nomiya, C. A. Power, A. E. I. Proudfoot, M. M. Rosenkilde, A. Rot, S. Sozzani, M. Thelen, O. Yoshie, and A. Zlotnik. International union of basic and clinical pharmacology. [corrected]. LXXXIX. update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors. *Pharmacol Rev*, 66(1) :1–79, 2014.
- [9] K. Balabanian, B. Lagane, S. Infantino, K. Y. C. Chow, J. Harriague, B. Moepps, F. Arenzana-Seisdedos, M. Thelen, and F. Bachelierie. The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in t lymphocytes. *J Biol Chem*, 280(42) :35760–6, Oct 2005.
- [10] P. Baluk, A. Adams, K. Phillips, J. Feng, Y.-K. Hong, M. B. Brown, and D. M. McDonald. Preferential lymphatic growth in bronchus-associated lymphoid tissue in sustained lung inflammation. *Am J Pathol*, 184(5) :1577–92, May 2014.
- [11] I. Bianconi, A. Milani, C. Cigana, M. Paroni, R. C. Levesque, G. Bertoni, and A. Bragonzi. Positive Signature-Tagged Mutagenesis in *Pseudomonas aeruginosa* : Tracking Patho-Adaptive Mutations Promoting Airways Chronic Infection. *PLoS Pathogens*, 7(2) :e1001270, Feb. 2011.
- [12] K. R. Bracke, F. M. Verhamme, L. J. M. Seys, C. Bantsimba-Malanda, D. M. Cunoosamy, R. Herbst, H. Hammad, B. N. Lambrecht, G. F. Joos, and G. G.

- Brusselle. Role of CXCL13 in Cigarette Smoke induced Lymphoid Follicle Formation and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 188(3) :343–355, Aug. 2013.
- [13] A. Bragonzi. Murine models of acute and chronic lung infection with cystic fibrosis pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(8) :584–593, Dec. 2010.
- [14] A. Bragonzi, M. Paroni, A. Nonis, N. Cramer, S. Montanari, J. Rejman, C. Di Serio, G. Döring, and B. Tümmler. Pseudomonas aeruginosa Microevolution during Cystic Fibrosis Lung Infection Establishes Clones with Adapted Virulence. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 180(2) :138–145, July 2009.
- [15] A. Bragonzi, D. Worlitzsch, G. B. Pier, P. Timpert, M. Ulrich, M. Hentzer, J. B. Andersen, M. Givskov, M. Conese, and G. Döring, Gerd. Nonmucoid Pseudomonas aeruginosa expresses alginate in the lungs of patients with cystic fibrosis and in a mouse model. *J Infect Dis*, 192(3) :410–9, Aug 2005.
- [16] G. G. Brusselle, T. Demoor, K. R. Bracke, C.-A. Brandsma, and W. Timens. Lymphoid follicles in (very) severe COPD : beneficial or harmful? *The European respiratory journal*, 34(1) :219–230, June 2009.
- [17] P.-R. Burgel, C. Martin, I. Fajac, and D. J. Dusser. Should bronchoscopy be advocated to study airway remodelling and inflammation in adults with cystic fibrosis? *Thorax*, 67(2) :177; author reply 177, Feb 2012.
- [18] P. R. Burgel and J. A. Nadel. Epidermal growth factor receptor-mediated innate immune responses and their roles in airway diseases. *European Respiratory Journal*, 32(4) :1068–1081, May 2008.
- [19] M. T. Cabeen. Stationary phase-specific virulence factor overproduction by a lasR mutant of Pseudomonas aeruginosa. *PLoS One*, 9(2) :e88743, 2014.

- [20] A. M. Cantin, D. Hartl, M. W. Konstan, and J. F. Chmiel. Inflammation in cystic fibrosis lung disease : Pathogenesis and therapy. *J Cyst Fibros*, Mar 2015.
- [21] H. A. Cash, D. E. Woods, B. McCullough, W. G. Johanson, and J. A. Bass. A rat model of chronic respiratory infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *The American review of respiratory disease*, 119(3) :453–459, Mar. 1979.
- [22] K. Chen, D. A. Pociask, J. P. McAleer, Y. R. Chan, J. F. Alcorn, J. L. Kreindler, M. R. Keyser, S. D. Shapiro, A. M. Houghton, J. K. Kolls, and M. Zheng. IL-17RA is required for CCL2 expression, macrophage recruitment, and emphysema in response to cigarette smoke. *PLoS One*, 6(5) :e20333, 2011.
- [23] J. F. Chmiel and P. B. Davis. State of the art : why do the lungs of patients with cystic fibrosis become infected and why can't they clear the infection? *Respir Res*, 4 :8, 2003.
- [24] A. Clement, A. Tamalet, E. Leroux, S. Ravilly, B. Fauroux, and J.-P. Jais. Long term effects of azithromycin in patients with cystic fibrosis : A double blind, placebo controlled trial. *Thorax*, 61(10) :895–902, Oct. 2006.
- [25] V. Cottin, B. Crestani, D. Valeyre, B. Wallaert, J. Cadranel, J. C. Dalphin, P. Delaval, D. Israel-Biet, R. Kessler, M. Reynaud-Gaubert, J. F. Cordier, B. Aguilaniu, B. Bouquillon, P. Carré, C. Danel, J.-B. Faivre, G. Ferreti, N. Just, S. Kouzan, F. Lebargy, S. Marchand Adam, B. Philippe, G. Prévot, B. Stach, F. Thivolet-Béjui, French National Reference and Competence Centers for Rare Diseases, and Societe de Pneumologies de Langue Francaise. [french practical guidelines for the diagnosis and management of idiopathic pulmonary fibrosis. from the national reference and the competence centers for rare diseases and the société de pneumologie de langue française]. *Rev*

- Mal Respir*, 30(10) :879–902, Dec 2013.
- [26] F. J. Culley. Natural killer cells in infection and inflammation of the lung. *Immunology*, 128(2) :151–63, Oct 2009.
- [27] D. De Nardo. Toll-like receptors : Activation, signalling and transcriptional modulation. *Cytokine*, Apr 2015.
- [28] T. Demoor, K. R. Bracke, T. Maes, B. Vandooren, D. Elewaut, C. Pilette, G. F. Joos, and G. G. Brusselle. Role of lymphotoxin- in cigarette smoke-induced inflammation and lymphoid neogenesis. *The European respiratory journal*, 34(2) :405–416, July 2009.
- [29] M. C. Dieu-Nosjean, M. Antoine, C. Danel, D. Heudes, M. Wislez, V. Poulot, N. Rabbe, L. Laurans, E. Tartour, L. de Chaisemartin, S. Lebecque, W. H. Fridman, and J. Cadranel. Long-Term Survival for Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer With Intratumoral Lymphoid Structures. *Journal of Clinical Oncology*, 26(27) :4410–4417, Sept. 2008.
- [30] D. G. Downey, S. C. Bell, and J. S. Elborn. Neutrophils in cystic fibrosis. *Thorax*, 64(1) :81–88, Jan. 2009.
- [31] J. G. Elliot, C. M. Jensen, S. Mutavdzic, J. P. Lamb, N. G. Carroll, and A. L. James. Aggregations of lymphoid cells in the airways of nonsmokers, smokers, and subjects with asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 169(6) :712–8, Mar 2004.
- [32] A. Eustace, L. J. C. Smyth, L. Mitchell, K. Williamson, J. Plumb, and D. Singh. Identification of cells expressing IL-17A and IL-17F in the lungs of patients with COPD. *Chest*, 139(5) :1089–100, May 2011.
- [33] D. J. Feola, B. A. Garvy, T. J. Cory, S. E. Birket, H. Hoy, D. Hayes, Jr, and B. S. Murphy. Azithromycin alters macrophage phenotype and pulmonary

- compartmentalization during lung infection with *Pseudomonas*. *Antimicrob Agents Chemother*, 54(6) :2437–47, Jun 2010.
- [34] D. K. Finch, R. Ettinger, J. L. Karnell, R. Herbst, and M. A. Sleeman. Effects of CXCL13 inhibition on lymphoid follicles in models of autoimmune disease. *Eur J Clin Invest*, 43(5) :501–9, May 2013.
- [35] L. Finney, M. Berry, A. Singanayagam, S. L. Elkin, S. L. Johnston, and P. Mallia. Inhaled corticosteroids and pneumonia in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet Respir Med*, 2(11) :919–32, Nov 2014.
- [36] H. Fleige, J. D. Haas, F. R. Stahl, S. Willenzon, I. Prinz, and R. Förster. Induction of BALT in the absence of IL-17. *Nat Immunol*, 13(1) :1; author reply 2, Jan 2012.
- [37] H. Fleige, S. Ravens, G. L. Moschovakis, J. Bolter, S. Willenzon, G. Sutter, S. Haussler, U. Kalinke, I. Prinz, and R. Forster. IL-17-induced CXCL12 recruits B cells and induces follicle formation in BALT in the absence of differentiated FDCs. *Journal of Experimental Medicine*, 211(4) :643–651, Apr. 2014.
- [38] S. Y. Foo and S. Phipps. Regulation of inducible BALT formation and contribution to immunity and pathology. *Mucosal Immunology*, 3(6) :537–544, Sept. 2010.
- [39] C. F. Foundation. Patient registry annual date report, 2013. disponible sur <http://www.cff.org/livingwithcf/qualityimprovement/patientregistryreport/>.
- [40] M. Gaga, A. M. Bentley, M. Humbert, J. Barkans, F. O’Brien, C. G. Wathen, A. B. Kay, and S. R. Durham. Increases in CD4+ T lymphocytes, macrophages, neutrophils and interleukin 8 positive cells in the airways of patients with bronchiectasis. *Thorax*, 53(8) :685–91, Aug 1998.

- [41] C. H. GeurtsvanKessel, M. A. M. Willart, I. M. Bergen, L. S. van Rijt, F. Muskens, D. Elewaut, A. D. M. E. Osterhaus, R. Hendriks, G. F. Rimmelzwaan, and B. N. Lambrecht. Dendritic cells are crucial for maintenance of tertiary lymphoid structures in the lung of influenza virus-infected mice. *J Exp Med*, 206(11) :2339–49, Oct 2009.
- [42] P. C. Goeminne, T. S. Nawrot, D. Ruttens, S. Seys, and L. J. Dupont. Mortality in non-cystic fibrosis bronchiectasis : a prospective cohort analysis. *Respir Med*, 108(2) :287–96, Feb 2014.
- [43] R. Gopal, L. Monin, S. Slight, U. Uche, E. Blanchard, B. A. Fallert Junecko, R. Ramos-Payan, C. L. Stallings, T. A. Reinhart, J. K. Kolls, D. Kaushal, U. Nagarajan, J. Rangel-Moreno, and S. A. Khader. Unexpected role for il-17 in protective immunity against hypervirulent mycobacterium tuberculosis hn878 infection. *PLoS Pathog*, 10(5) :e1004099, May 2014.
- [44] J. L. Grogan and W. Ouyang. A role for th17 cells in the regulation of tertiary lymphoid follicles. *Eur J Immunol*, 42(9) :2255–62, Sep 2012.
- [45] S. Halle, H. C. Dujardin, N. Bakocevic, H. Fleige, H. Danzer, S. Willenzon, Y. Suezzer, G. Hämmerling, N. Garbi, G. Sutter, T. Worbs, and R. Förster. Induced bronchus-associated lymphoid tissue serves as a general priming site for T cells and is maintained by dendritic cells. *J Exp Med*, 206(12) :2593–601, Nov 2009.
- [46] C. Harada, T. Kawaguchi, S. Ogata-Suetsugu, M. Yamada, N. Hamada, T. Maeyama, R. Souzaki, T. Tajiri, T. Taguchi, K. Kuwano, and Y. Nakanishi. EGFR tyrosine kinase inhibition worsens acute lung injury in mice with repairing airway epithelium. *Am J Respir Crit Care Med*, 183(6) :743–51, Mar 2011.
- [47] D. Hartl, A. Gaggar, E. Bruscia, A. Hector, V. Marcos, A. Jung, C. Greene,

- G. McElvaney, M. Mall, and G. Döring. Innate immunity in cystic fibrosis lung disease. *J Cyst Fibros*, 11(5) :363–82, Sep 2012.
- [48] K. Hiramatsu, A. Azuma, S. Kudoh, M. Desaki, H. Takizawa, and I. Sugawara. Inhalation of diesel exhaust for three months affects major cytokine expression and induces bronchus-associated lymphoid tissue formation in murine lungs. *Exp Lung Res*, 29(8) :607–22, Dec 2003.
- [49] K. Hiramatsu, Y. Katayama, M. Matsuo, T. Sasaki, Y. Morimoto, A. Sekiguchi, and T. Baba. Multi-drug-resistant *Staphylococcus aureus* and future chemotherapy. *J Infect Chemother*, 20(10) :593–601, Oct 2014.
- [50] J. C. Hogg, F. Chu, S. Utokaparch, R. Woods, W. M. Elliott, L. Buzatu, R. M. Cherniack, R. M. Rogers, F. C. Sciurba, and H. O. Coxson. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *New England Journal of Medicine*, 350(26) :2645–2653, 2004.
- [51] J. C. Hoyt and R. A. Robbins. Macrolide antibiotics and pulmonary inflammation. *FEMS Microbiol Lett*, 205(1) :1–7, Nov 2001.
- [52] C. Hubeau, M. Lorenzato, J. P. Couetil, D. Hubert, D. Dusser, E. Puchelle, and D. Gaillard. Quantitative analysis of inflammatory cells infiltrating the cystic fibrosis airway mucosa. *Clin Exp Immunol*, 124(1) :69–76, Apr 2001.
- [53] C. Hubeau, E. Puchelle, and D. Gaillard. Distinct pattern of immune cell population in the lung of human fetuses with cystic fibrosis. *J Allergy Clin Immunol*, 108(4) :524–9, Oct 2001.
- [54] M.-L. Humpert, M. Tzouros, S. Thelen, A. Bignon, A. Levoye, F. Arenzana-Seisdedos, K. Balabanian, F. Bachelierie, H. Langen, and M. Thelen. Complementary methods provide evidence for the expression of CXCR7 on human B cells. *Proteomics*, 12(12) :1938–48, Jun 2012.

- [55] G. Y. Hur, S. Y. Lee, S. H. Lee, S. J. Kim, K. J. Lee, J. Y. Jung, E. J. Lee, E. H. Kang, K. H. Jung, S. Y. Lee, J. H. Kim, C. Shin, J. J. Shim, K. H. In, K. H. Kang, and S. H. Yoo. Potential use of an anticancer drug gefinitib, an EGFR inhibitor, on allergic airway inflammation. *Exp Mol Med*, 39(3) :367–75, Jun 2007.
- [56] W. Huvenne, E. A. Lanckacker, O. Krysko, K. R. Bracke, T. Demoor, P. W. Hellings, G. G. Brusselle, G. F. Joos, C. Bachert, and T. Maes. Exacerbation of cigarette smoke-induced pulmonary inflammation by *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B in mice. *Respiratory Research*, 12(1) :69, May 2011.
- [57] D. M. Hyde, Q. Hamid, and C. G. Irvin. Anatomy, pathology, and physiology of the tracheobronchial tree : Emphasis on the distal airways. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 124(S) :S72–S77, Dec. 2009.
- [58] Y. Ichikawa, H. Koga, M. Tanaka, M. Nakamura, N. Tokunaga, and M. Kaji. Neutrophilia in bronchoalveolar lavage fluid of diffuse panbronchiolitis. *Chest*, 98(4) :917–23, Oct 1990.
- [59] Y. Ichikawa, H. Ninomiya, H. Koga, M. Tanaka, M. Kinoshita, N. Tokunaga, T. Yano, and K. Oizumi. Erythromycin reduces neutrophils and neutrophil-derived elastolytic-like activity in the lower respiratory tract of bronchiolitis patients. *Am Rev Respir Dis*, 146(1) :196–203, Jul 1992.
- [60] M. Iwata and A. Sato. Morphological and immunohistochemical studies of the lungs and bronchus-associated lymphoid tissue in a rat model of chronic pulmonary infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*, 59(4) :1514–20, Apr 1991.
- [61] A. Jaffé and A. Bush. Anti-inflammatory effects of macrolides in lung disease. *Pediatr Pulmonol*, 31(6) :464–73, Jun 2001.

- [62] C. E. Jones and K. Chan. Interleukin-17 stimulates the expression of interleukin-8, growth-related oncogene-alpha, and granulocyte-colony-stimulating factor by human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 26(6) :748–53, Jun 2002.
- [63] J. A. Juno, Y. Keynan, and K. R. Fowke. Invariant NKT cells : regulation and function during viral infection. *PLoS Pathog*, 8(8) :e1002838, 2012.
- [64] J.-I. Kadota, S. Mizunoe, K. Kishi, I. Tokimatsu, H. Nagai, and M. Nasu. Antibiotic-induced apoptosis in human activated peripheral lymphocytes. *Int J Antimicrob Agents*, 25(3) :216–20, Mar 2005.
- [65] A. Kahnert, U. E. Höpken, M. Stein, S. Bandermann, M. Lipp, and S. H. E. Kaufmann. Mycobacterium tuberculosis triggers formation of lymphoid structure in murine lungs. *J Infect Dis*, 195(1) :46–54, Jan 2007.
- [66] A. Kato and R. P. Schleimer. Beyond inflammation : airway epithelial cells are at the interface of innate and adaptive immunity. *Current Opinion in Immunology*, 19(6) :711–720, Dec. 2007.
- [67] J. A. Katznel, M. P. Fanucchi, and Z. Li. Recent advances of novel targeted therapy in non-small cell lung cancer. *J Hematol Oncol*, 2 :2, 2009.
- [68] S. A. Khader, L. Guglani, J. Rangel-Moreno, R. Gopal, B. A. Fallert Junecko, J. J. Fountain, C. Martino, J. E. Pearl, M. Tighe, Y. y. Lin, S. Slight, J. K. Kolls, T. A. Reinhart, T. D. Randall, and A. M. Cooper. IL-23 Is Required for Long-Term Control of Mycobacterium tuberculosis and B Cell Follicle Formation in the Infected Lung. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 187(10) :5402–5407, Nov. 2011.
- [69] S. Kim, C. Lewis, and J. A. Nadel. CCL20/CCR6 Feedback Exaggerates Epidermal Growth Factor Receptor-Dependent MUC5AC Mucin Production

- in Human Airway Epithelial (NCI-H292) Cells. *The Journal of Immunology*, 186(6) :3392–3400, Feb. 2011.
- [70] H. Kitano and K. Oda. Robustness trade-offs and host-microbial symbiosis in the immune system. *Mol Syst Biol*, 2 :2006.0022, 2006.
- [71] J. R. Kocks, A. C. M. Davalos-Misslitz, G. Hintzen, L. Ohl, and R. Förster. Regulatory T cells interfere with the development of bronchus-associated lymphoid tissue. *J Exp Med*, 204(4) :723–34, Apr 2007.
- [72] J. L. Koff, M. X. G. Shao, I. F. Ueki, and J. A. Nadel. Multiple TLRs activate EGFR via a signaling cascade to produce innate immune responses in airway epithelium. *AJP : Lung Cellular and Molecular Physiology*, 294(6) :L1068–L1075, Mar. 2008.
- [73] M. Kopf, C. Schneider, and S. P. Nobs. The development and function of lung-resident macrophages and dendritic cells. *Nat Immunol*, 16(1) :36–44, Jan 2015.
- [74] I. Kukavica-Ibrulj, A. Bragonzi, M. Paroni, C. Winstanley, F. Sanschagrín, G. A. O’Toole, and R. C. Levesque. In Vivo Growth of *Pseudomonas aeruginosa* Strains PAO1 and PA14 and the Hypervirulent Strain LESB58 in a Rat Model of Chronic Lung Infection. *Journal of Bacteriology*, 190(8) :2804–2813, Apr. 2008.
- [75] B. N. Lambrecht and H. Hammad. The airway epithelium in asthma. *Nat Med*, 18(5) :684–92, May 2012.
- [76] S. A. Luther, A. Bidgol, D. C. Hargreaves, A. Schmidt, Y. Xu, J. Paniyadi, M. Matloubian, and J. G. Cyster. Differing activities of homeostatic chemokines CCL19, CCL21, and CXCL12 in lymphocyte and dendritic cell recruitment and lymphoid neogenesis. *J Immunol*, 169(1) :424–33, Jul 2002.

- [77] F. Mackay and H. Leung. The role of the BAFF/APRIL system on T cell function. *Seminars in Immunology*, 18(5) :284–289, Oct. 2006.
- [78] P. J. Maglione, H. M. Ko, M. B. Beasley, J. A. Strauchen, and C. Cunningham-Rundles. Tertiary lymphoid neogenesis is a component of pulmonary lymphoid hyperplasia in patients with common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol*, 133(2) :535–42, Feb 2014.
- [79] J. Marchal-Sommé, Y. Uzunhan, S. Marchand-Adam, D. Valeyre, V. Soumelis, B. Crestani, and P. Soler. Cutting edge : nonproliferating mature immune cells form a novel type of organized lymphoid structure in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Immunol*, 176(10) :5735–9, May 2006.
- [80] B. Martin, C. Auffray, A. Delpoux, A. Pommier, A. Durand, C. Charvet, P. Yakonowsky, H. de Boysson, N. Bonilla, A. Audemard, T. Sparwasser, B. L. Salomon, B. Malissen, and B. Lucas. Highly self-reactive naive CD4 T cells are prone to differentiate into regulatory T cells cells. *Nat Commun*, 4 :2209, 2013.
- [81] C. Martin, J. Frija, and P.-R. Burgel. Dysfunctional lung anatomy and small airways degeneration in copd. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 8 :7–13, 2013.
- [82] C. Martin, J. Frija-Masson, and P.-R. Burgel. Targeting mucus hypersecretion : new therapeutic opportunities for COPD? *Drugs*, 74(10) :1073–89, Jul 2014.
- [83] C. Martin, G. Thévenot, S. Danel, J. Chapron, A. Tazi, J. Macey, D. J. Dusser, I. Fajac, and P.-R. Burgel. Pseudomonas aeruginosa induces vascular endothelial growth factor synthesis in airway epithelium in vitro and in vivo. *Eur Respir J*, 38(4) :939–46, Oct 2011.

- [84] D. McKillop, E. A. Partridge, J. V. Kemp, M. P. Spence, J. Kendrew, S. Barnett, P. G. Wood, P. B. Giles, A. B. Patterson, F. Bichat, N. Guilbaud, and T. C. Stephens. Tumor penetration of gefitinib (Iressa), an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor. *Mol Cancer Ther*, 4(4) :641–9, Apr 2005.
- [85] R. E. Mebius. Organogenesis of lymphoid tissues. *Nat Rev Immunol*, 3(4) :292–303, Apr 2003.
- [86] N. S. Merle, S. E. Church, V. Fremeaux-Bacchi, and L. T. Roumenina. Complement system part I - molecular mechanisms of activation and regulation. *Front Immunol*, 6 :262, 2015.
- [87] N. S. Merle, R. Noe, L. Halbwachs-Mecarelli, V. Fremeaux-Bacchi, and L. T. Roumenina. Complement system part II : Role in immunity. *Front Immunol*, 6 :257, 2015.
- [88] L. Millares, R. Ferrari, M. Gallego, M. Garcia-Nuñez, V. Pérez-Brocal, M. Espasa, X. Pomares, C. Monton, A. Moya, and E. Monsó. Bronchial microbiome of severe COPD patients colonised by *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 33(7) :1101–11, Jul 2014.
- [89] M. Miravittles, C. Espinosa, E. Fernández-Laso, J. A. Martos, J. A. Maldonado, and M. Gallego. Relationship between bacterial flora in sputum and functional impairment in patients with acute exacerbations of COPD. Study Group of Bacterial Infection in COPD. *Chest*, 116(1) :40–6, Jul 1999.
- [90] D. Montani, X. Jaïs, O. Sitbon, F. Capron, G. Simonneau, and M. Humbert. [pulmonary arterial hypertension]. *Rev Mal Respir*, 22(4) :651–66, Sep 2005.
- [91] C. Morissette, E. Skamene, and F. Gervais. Endobronchial inflammation following *pseudomonas aeruginosa* infection in resistant and susceptible strains of mice. *Infect Immun*, 63(5) :1718–24, May 1995.

- [92] J. E. Moyron-Quiroz, J. Rangel-Moreno, L. Hartson, K. Kusser, M. P. Tighe, K. D. Klonowski, L. Lefrançois, L. S. Cauley, A. G. Harmsen, F. E. Lund, and T. D. Randall. Persistence and Responsiveness of Immunologic Memory in the Absence of Secondary Lymphoid Organs. *Immunity*, 25(4) :643–654, Oct. 2006.
- [93] J. E. Moyron-Quiroz, J. Rangel-Moreno, K. Kusser, L. Hartson, F. Sprague, S. Goodrich, D. L. Woodland, F. E. Lund, and T. D. Randall. Role of inducible bronchus associated lymphoid tissue (iBALT) in respiratory immunity. *Nature medicine*, 10(9) :927–934, Aug. 2004.
- [94] G. Müller, U. E. Höpken, and M. Lipp. The impact of CCR7 and CXCR5 on lymphoid organ development and systemic immunity. *Immunol Rev*, 195 :117–35, Oct 2003.
- [95] T. F. Murphy, A. L. Brauer, K. Eschberger, P. Lobbins, L. Grove, X. Cai, and S. Sethi. *Pseudomonas aeruginosa* in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 177(8) :853–60, Apr 2008.
- [96] E. B. Norton, J. D. Clements, T. G. Voss, and L. Cárdenas-Freytag. Prophylactic administration of bacterially derived immunomodulators improves the outcome of influenza virus infection in a murine model. *J Virol*, 84(6) :2983–95, Mar 2010.
- [97] A. E. O’Donnell. Bronchiectasis. *Chest*, 134(4) :815–23, Oct 2008.
- [98] OMS. Bronchopneumopathie chronique obstructive. disponible sur <http://www.who.int/respiratory/copd/fr/>.
- [99] T. C. O’Shaughnessy, T. W. Ansari, N. C. Barnes, and P. K. Jeffery. Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis : inverse relationship of CD8+ T lymphocytes with FEV1. *Am J Respir Crit Care Med*, 155(3) :852–7, Mar 1997.

- [100] R. Pabst and I. Gehrke. Is the bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) an integral structure of the lung in normal mammals, including humans? *Am J Respir Cell Mol Biol*, 3(2) :131–5, Aug 1990.
- [101] T. A. Packard, Q. Z. Li, G. P. Cosgrove, R. P. Bowler, and J. C. Cambier. COPD is associated with production of autoantibodies to a broad spectrum of self-antigens, correlative with disease phenotype. *Immunol Res*, 55(1-3) :48–57, Mar 2013.
- [102] E. L. Palavecino. Clinical, epidemiologic, and laboratory aspects of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Methods Mol Biol*, 1085 :1–24, 2014.
- [103] M. C. Pasteur, D. Bilton, A. T. Hill, and British Thoracic Society Non-CF Bronchiectasis Guideline Group. British Thoracic Society guideline for non-CF bronchiectasis. *Thorax*, 65(7) :577, Jul 2010.
- [104] F. Perros, P. Dorfmueller, D. Montani, H. Hammad, W. Waelput, B. Girerd, N. Raymond, O. Mercier, S. Mussot, S. Cohen-Kaminsky, M. Humbert, and B. N. Lambrecht. Pulmonary Lymphoid Neogenesis in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 185(3) :311–321, Feb. 2012.
- [105] S. Peters, S. Zimmermann, and A. A. Adjei. Oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors for the treatment of non-small cell lung cancer : Comparative pharmacokinetics and drug-drug interactions. *Cancer Treat Rev*, 40(8) :917–926, Sep 2014.
- [106] F. Polverino, B. G. Cosio, J. Pons, M. Laicho-Contreras, P. Tejera, A. Iglesias, A. Rios, A. Jahn, J. Sauleda, M. Divo, V. Pinto-Plata, L. Sholl, I. O. Rosas, A. Agusti, B. R. Celli, and C. A. Owen. B-cell Activating Factor : An

- orchestrator of lymphoid follicles in severe COPD. *Am J Respir Crit Care Med*, Jun 2015.
- [107] T. D. Randall. Bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) structure and function. *Adv Immunol*, 107 :187–241, 2010.
- [108] T. D. Randall, D. M. Carragher, and J. Rangel-Moreno. Development of Secondary Lymphoid Organs. *Annual Review of Immunology*, 26(1) :627–650, Apr. 2008.
- [109] J. Rangel-Moreno, D. M. Carragher, M. de la Luz Garcia-Hernandez, J. Y. Hwang, K. Kusser, L. Hartson, J. K. Kolls, S. A. Khader, and T. D. Randall. The development of inducible bronchus-associated lymphoid tissue depends on IL-17. *Nat Immunol*, 12(7) :639–46, Jul 2011.
- [110] J. Rangel-Moreno, L. Hartson, C. Navarro, M. Gaxiola, M. Selman, and T. D. Randall. Inducible bronchus-associated lymphoid tissue (iBALT) in patients with pulmonary complications of rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*, 116(12) :3183–94, Dec 2006.
- [111] J. Rangel-Moreno, J. E. Moyron-Quiroz, L. Hartson, K. Kusser, and T. D. Randall. Pulmonary expression of CXC chemokine ligand 13, CC chemokine ligand 19, and CC chemokine ligand 21 is essential for local immunity to influenza. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(25) :10577–82, Jun 2007.
- [112] N. Regamey, L. Tsartsali, T. N. Hilliard, O. Fuchs, H.-L. Tan, J. Zhu, Y.-S. Qiu, E. W. F. W. Alton, P. K. Jeffery, A. Bush, and J. C. Davies. Distinct patterns of inflammation in the airway lumen and bronchial mucosa of children with cystic fibrosis. *Thorax*, 67(2) :164–70, Feb 2012.
- [113] P. A. Roche and K. Furuta. The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Nat Rev Immunol*, 15(4) :203–16, Apr 2015.

- [114] S. Romagnani. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol*, 85(1) :9–18 ; quiz 18, 21, Jul 2000.
- [115] E. C. Rosser and C. Mauri. Regulatory B cells : origin, phenotype, and function. *Immunity*, 42(4) :607–12, Apr 2015.
- [116] N. H. Ruddle. Lymphatic vessels and tertiary lymphoid organs. *J Clin Invest*, 124(3) :953–9, Mar 2014.
- [117] M. Saetta. Airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 160(5 Pt 2) :S17–20, Nov 1999.
- [118] M. Saetta, S. Baraldo, L. Corbino, G. Turato, F. Braccioni, F. Rea, G. Cavallero, G. Tropeano, C. E. Mapp, P. Maestrelli, A. Ciaccia, and L. M. Fabbri. CD8+ve cells in the lungs of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 160(2) :711–7, Aug 1999.
- [119] L. Saiman, M. Anstead, N. Mayer-Hamblett, L. C. Lands, M. Kloster, J. Hocevar-Trnka, C. H. Goss, L. M. Rose, J. L. Burns, B. C. Marshall, and F. Ratjen. Effect of azithromycin on pulmonary function in patients with cystic fibrosis uninfected with *Pseudomonas aeruginosa* : a randomized controlled trial. *JAMA*, 303(17) :1707–1715, May 2010.
- [120] L. Saiman, B. C. Marshall, N. Mayer-Hamblett, J. L. Burns, A. L. Quittner, D. A. Cibene, S. Coquillet, A. Y. Fieberg, F. J. Accurso, and P. W. r. Campbell. Azithromycin in patients with cystic fibrosis chronically infected with *Pseudomonas aeruginosa* : a randomized controlled trial. *JAMA*, 290(13) :1749–1756, Oct. 2003.
- [121] O. Sakito, J. Kadota, S. Kohno, K. Abe, R. Shirai, and K. Hara. Interleukin 1 beta, tumor necrosis factor alpha, and interleukin 8 in bronchoalveolar lavage fluid of patients with diffuse panbronchiolitis : a potential mechanism of macrolide therapy. *Respiration*, 63(1) :42–8, 1996.

- [122] H. Salmon, K. Franciszkiewicz, D. Damotte, M.-C. Dieu-Nosjean, P. Validire, A. Trautmann, F. Mami-Chouaib, and E. Donnadieu. Matrix architecture defines the preferential localization and migration of t cells into the stroma of human lung tumors. *J Clin Invest*, 122(3) :899–910, Mar 2012.
- [123] M. Sato, S. Hirayama, D. M. Hwang, H. Lara-Guerra, D. Wagnetz, T. K. Waddell, M. Liu, and S. Keshavjee. The role of intrapulmonary de novo lymphoid tissue in obliterative bronchiolitis after lung transplantation. *J Immunol*, 182(11) :7307–16, Jun 2009.
- [124] M. Sato, S. Hirayama, Y. Matsuda, D. Wagnetz, D. M. Hwang, Z. Guan, M. Liu, and S. Keshavjee. Stromal activation and formation of lymphoid-like stroma in chronic lung allograft dysfunction. *Transplantation*, 91(12) :1398–405, Jun 2011.
- [125] S. Sell, I. Guest, K. Kai McKinstry, T. M. Strutt, J. E. Kohlmeier, E. Brincks, M. Tighe, M. A. Blackman, D. L. Woodland, R. W. Dutton, and S. L. Swain. Intraepithelial T-cell cytotoxicity, induced bronchus-associated lymphoid tissue, and proliferation of pneumocytes in experimental mouse models of influenza. *Viral Immunol*, 27(10) :484–96, Dec 2014.
- [126] D. J. Serisier, M. L. Martin, M. A. McGuckin, R. Lourie, A. C. Chen, B. Brain, S. Biga, S. Schlebusch, P. Dash, and S. D. Bowler. Effect of Long-term, Low-Dose Erythromycin on Pulmonary Exacerbations Among Patients With Non-Cystic Fibrosis Bronchiectasis : The BLESS Randomized Controlled Trial Low-Dose Erythromycin for Pulmonary Exacerbations. *JAMA*, 309(12) :1260–1267, 2013.
- [127] S. Sethi and T. F. Murphy. Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*, 359(22) :2355–65, Nov 2008.

- [128] R. A. Shilling, J. W. Williams, J. Perera, E. Berry, Q. Wu, O. W. Cummings, A. I. Sperling, and H. Huang. Autoreactive T and B cells induce the development of bronchus-associated lymphoid tissue in the lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 48(4) :406–14, Apr 2013.
- [129] A. Sica and A. Mantovani. Macrophage plasticity and polarization : in vivo veritas. *J Clin Invest*, 122(3) :787–95, Mar 2012.
- [130] P. K. Stotland, D. Radzioch, and M. M. Stevenson. Mouse models of chronic lung infection with *Pseudomonas aeruginosa* : models for the study of cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*, 30(5) :413–24, Nov 2000.
- [131] A. Takashima and Y. Yao. Neutrophil plasticity : acquisition of phenotype and functionality of antigen-presenting cell. *J Leukoc Biol*, Jan 2015.
- [132] E. Torres-González, M. Bueno, A. Tanaka, L. T. Krug, D.-S. Cheng, V. V. Polosukhin, D. Sorescu, W. E. Lawson, T. S. Blackwell, M. Rojas, and A. L. Mora. Role of endoplasmic reticulum stress in age-related susceptibility to lung fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 46(6) :748–56, Jun 2012.
- [133] G. Trujillo, A. J. Hartigan, and C. M. Hogaboam. T regulatory cells and attenuated bleomycin-induced fibrosis in lungs of *CCR7*^{-/-} mice. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 3 :18, 2010.
- [134] W. C. Tsai, M. B. Hershenson, Y. Zhou, and U. Sajjan. Azithromycin increases survival and reduces lung inflammation in cystic fibrosis mice. *Inflamm Res*, 58(8) :491–501, Aug 2009.
- [135] W. C. Tsai, M. L. Rodriguez, K. S. Young, J. C. Deng, V. J. Thannickal, K. Tateda, M. B. Hershenson, and T. J. Standiford. Azithromycin blocks neutrophil recruitment in *Pseudomonas* endobronchial infection. *Am J Respir Crit Care Med*, 170(12) :1331–9, Dec 2004.

- [136] T. Ulrichs, G. A. Kosmiadi, V. Trusov, S. Jörg, L. Pradl, M. Titukhina, V. Mishenko, N. Gushina, and S. H. Kaufmann. Human tuberculous granulomas induce peripheral lymphoid follicle-like structures to orchestrate local host defence in the lung. *The Journal of Pathology*, 204(2) :217–228, Sept. 2004.
- [137] G. Valenza, D. Tappe, D. Turnwald, M. Frosch, C. König, H. Hebestreit, and M. Abele-Horn. Prevalence and antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from sputa of patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*, 7(2) :123–7, Mar 2008.
- [138] A. M. van Heeckeren and M. D. Schluchter. Murine models of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *Laboratory Animals*, 36(3) :291–312, July 2002.
- [139] G. R. Van Pottelberge, K. R. Bracke, S. Van den Broeck, S. M. Reinartz, C. M. van Drunen, E. F. Wouters, G. M. Verleden, F. E. Vermassen, G. F. Joos, and G. G. Brusselle. Plasmacytoid dendritic cells in pulmonary lymphoid follicles of patients with COPD. *Eur Respir J*, 36(4) :781–91, Oct 2010.
- [140] B. M. Vanaudenaerde, W. A. Wuyts, L. J. Dupont, D. E. Van Raemdonck, M. M. Demedts, and G. M. Verleden. Interleukin-17 stimulates release of interleukin-8 by human airway smooth muscle cells in vitro : a potential role for interleukin-17 and airway smooth muscle cells in bronchiolitis obliterans syndrome. *J Heart Lung Transplant*, 22(11) :1280–3, Nov 2003.
- [141] J. H. J. Vernooij, M. A. Dentener, R. J. van Suylen, W. A. Buurman, and E. F. M. Wouters. Long-term intratracheal lipopolysaccharide exposure in mice results in chronic lung inflammation and persistent pathology. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 26(1) :152–9, Jan 2002.

- [142] VLM. Registre français de la mucoviscidose-bilan des données 2013. disponible sur <http://www.vaincrelamuco.org/acceder-votre-espace/soignants-chercheurs>. 2014.
- [143] J. L. Werner and C. Steele. Innate receptors and cellular defense against pulmonary infections. *J Immunol*, 193(8) :3842–50, Oct 2014.
- [144] F. Whitwell. A study of the pathology and pathogenesis of bronchiectasis. *Thorax*, 7(3) :213–39, Sep 1952.
- [145] J. A. Wiley, L. E. Richert, S. D. Swain, A. Harmsen, D. L. Barnard, T. D. Randall, M. Jutila, T. Douglas, C. Broomell, M. Young, and A. Harmsen. Inducible bronchus-associated lymphoid tissue elicited by a protein cage nanoparticle enhances protection in mice against diverse respiratory viruses. *PLoS One*, 4(9) :e7142, 2009.
- [146] C. Wong, L. Jayaram, N. Karalus, T. Eaton, C. Tong, H. Hockey, D. Milne, W. Fergusson, C. Tuffery, P. Sexton, L. Storey, and T. Ashton. Azithromycin for prevention of exacerbations in non-cystic fibrosis bronchiectasis (EMBRACE) : a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*, 380(9842) :660–667, Aug. 2012.
- [147] D. Worlitzsch, R. Tarran, M. Ulrich, U. Schwab, A. Cekici, K. C. Meyer, P. Birrer, G. Bellon, J. Berger, T. Weiss, K. Botzenhart, J. R. Yankaskas, S. Randell, R. C. Boucher, and G. Döring. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *The Journal of clinical investigation*, 109(3) :317–325, Feb. 2002.
- [148] W. A. Wuyts, S. Willems, R. Vos, B. M. Vanaudenaerde, S. I. De Vleeschauwer, M. Rinaldi, H. M. Vanhooren, N. Geudens, S. E. Verleden, M. G. Demedts, M. Thomeer, E. K. Verbeken, and G. M. Verleden. Azithromycin

reduces pulmonary fibrosis in a bleomycin mouse model. *Experimental Lung Research*, 36(10) :602–614, Nov. 2010.

[149] K. Yadava and B. J. Marsland. Lymphoid follicles in chronic lung diseases. *Thorax*, 68(6) :597–598, May 2013.

[150] P. Zarin, E. L. Y. Chen, T. S. H. In, M. K. Anderson, and J. C. Zúñiga-Pflücker. Gamma delta T-cell differentiation and effector function programming, TCR signal strength, when and how much? *Cell Immunol*, 296(1) :70–5, Jul 2015.

Titre : Néogenèse lymphoïde induite par l'infection bactérienne bronchopulmonaire chronique.

Résumé : Introduction : Les follicules lymphoïdes (FL) sont absents du poumon normal mais ont été décrits dans les poumons de patients atteints de mucoviscidose ou de dilata-tions de bronches non mucoviscidosiques, suggérant un rôle pour l'infection bronchique dans la néogenèse lymphoïde (NL). Nous avons étudié la dynamique de la néogenèse lymphoïde dans l'infection bactérienne.

Méthodes : Les souris C57BL/6 ont reçu une instillation intratrachéale de billes d'aga-rose contenant du PAO1 ou du *S. aureus* (10^6 CFU/animal) permettant une infection prolongée et ont été comparées à des souris contrôles (billes stériles ou absence de billes). Les souris ont été sacrifiées à J1, J4, J7 et J14.

Résultats : L'instillation unique de billes d'agarose contenant du PAO1 ou du *S. aureus* induit en 14 jours des FL fonctionnels situés sous l'épithélium en regard des zones d'infec-tion. Le marquage pour CXCL12 et CXCL13 est faible chez contrôles, mais présent dans l'épithélium (CXCL13) dès J1 et présent également dans les FL (CXCL12 et CXCL13) à J14 chez les souris infectées. Le traitement des souris par un anticorps anti CXCL12 ou anti CXCL13 n'inhibe pas la formation des FL induite par l'infection à PAO1.

Conclusion : Nos données suggèrent un rôle pour l'infection bactérienne prolongée et l'épithélium respiratoire dans la NL des bronchopathies chroniques. Notre modèle per-met d'évaluer les mécanismes de la formation et de persistance des FL dans le poumon.

Title : Intrapulmonary lymphoid neogenesis induced by prolonged bacterial airway in-fection in mice.

Abstract : Introduction : Lymphoid follicles (LF) are absent in normal lungs, but are described in lungs of subjects with cystic fibrosis (CF) or non-CF bronchiectasis, sug-gesting a role for bacterial infection in lymphoid neogenesis. We aimed to study the dynamic of pulmonary lymphoid neogenesis (LN) during bacterial infection.

Methods : C57BL/6 mice were instilled intratracheally with PAO1- or *S. aureus*-coated (1.10^6 CFU/mouse) agarose beads (which produced prolonged airway infection) and compared to controls (sterile beads or no instillation). Mice were sacrificed on day (d)1, d4, d7, and d14 after instillation.

Results : Chronic pulmonary infection with PAO1 or *S. aureus* induced organised LF in 14 days after a single challenge with PAO1- or *S. aureus*-coated beads. Bacteria-induced LF were exclusively localized in the subepithelium of infected airways. Staining for CXCL12 and CXCL13 was weak in airway epithelium of controls, but was positive in airway epithelium (CXCL13) at 1 day and in LF (both) of infected mice at 14 days. Treatment with anti CXCL12 or anti CXCL13 Ab did not reduce LN induced by PAO1 infection.

Conclusions : Chronic bacterial infection and respiratory epithelium could contribute to LN in chronic airway diseases. Our unique model allows to study mechanisms for the formation and maintenance of lung LF.

Mots-clés : Néogenèse lymphoïde, iBALT, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, immunité adaptative, CXCL12, CXCL13, mucoviscidose, BPCO

Keywords : Lymphoid neogenesis, iBALT, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, CXCL12, CXCL13, cystic fibrosis, COPD